



UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por José do Egito de Paiva, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de dezembro de 2000.

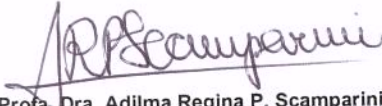
JOSÉ DO EGITO DE PAIVA

Engenheiro Agrônomo

Campinas, 20 de dezembro de 2.000

Prof^a. Dr^a. Adilma Regina Pippa Scamparini

Orientadora


Prof^a. Dra. Adilma Regina P. Scamparini
Presidente da Banca

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Novembro - 2000

Campinas - São Paulo

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

5405070020

UNIDADE	B.C.
N.º CHAMADA:	TI UNICAMP
P166p	
V.	Ex.
TOMBO BC/	43464
PROC.	16-392101
C	☐
D	☒
PREC	R\$11,00
DATA	26/01/01
N.º CPD	



CM-00153649-2

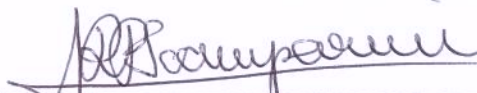
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P166p Paiva, José do Egito de
Produção de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar /
José do Egito de Paiva. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

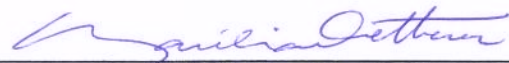
Orientador: Adilma Regina Pippa Scamparini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

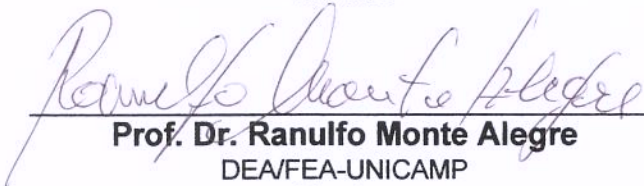
1.Bagaço de cana. 2.Candida parapsilosis IZ. 3.Xilitol.
4.Superfície de resposta – Metodologia. I.Scamparini, Adilma
Regina Pippa. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III.Título.

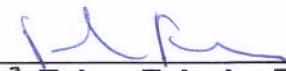
BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Adilma Regina Pippa Scamparini
DCA/FEA-UNICAMP
Orientadora


Prof. Dr. Daniel Antônio Salati Marcondes
DPV/FCA-UNESP
Membro


Prof.^a. Dr.^a. Marília Oetterer
DAAN/ESALQ-USP
Membro


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
DEA/FEA-UNICAMP
Membro


Prof.^a. Dr.^a. Telma Teixeira Franco
DPQ/FEQ-UNICAMP
Membro

Prof.^a. Dr.^a. Helena Teixeira Godoy
DCA/FEA-UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Yong Kun Park
DCA/FEA-UNICAMP
Membro

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ao meu pai (*in memorian*);

À minha mãe;

À minha esposa, Fátima; e

Aos meus filhos, Giselle, Daniela e Leonardo.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A Deus, por tudo;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Departamento de Tecnologia Rural, pela oportunidade concedida;

À Universidade Estadual de Campinas, através da Faculdade de Engenharia de Alimentos e dos Departamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade oferecida para realização desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por intermédio do Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos (PICDT), pela concessão da bolsa de estudos;

À Professora Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini, pela orientação, dedicação, confiança e amizade no decorrer do curso e na realização desta pesquisa;

À Professora Dra. Helena Teixeira Godoy, pelo incentivo, amizade e sugestões;

Ao Professor Dr. Ranulfo Monte Alegre, do Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA, pela atenção e valiosas sugestões;

À Professora Dra. Marília Oetterer, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-ESALQ / USP, pelas oportunas sugestões;

Ao Professor Dr. Daniel Antonio Salati Marcondes, da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, pelas indispensáveis sugestões;

À Professora Dra. Telma Teixeira Franco, da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pela amizade e valiosas sugestões;

À Professora Dra. Hélia Sato, pela confiança, amizade e colaboração;

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL, na pessoa do Engenheiro de Alimentos Flávio Schmidt, pela colaboração na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar;

À Merck S. A.-Indústrias Químicas;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial ao Professor Dr. Ricardo Albuquerque e ao Técnico Ari Luiz de Castro, pela determinação das substâncias macromoleculares do bagaço de cana-de-açúcar;

Ao Instituto Zimotécnico da ESALQ-USP (Piracicaba-SP); À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”(Campinas-SP); Ao “Institute for Fermentation” (Osaka-Japão) e Ao Laboratório Geral do DCA-FEA-UNICAMP, em especial a Luciana Baiocco, pela concessão e liberação dos microrganismos;

À Usina Açucareira Ester S. A., pelo fornecimento do bagaço de cana-de-açúcar;

À Tatiana pela amizade, dedicação e participação constante em todas as fases deste trabalho e a todos os demais colegas do Laboratório Geral de Ciência de Alimentos – LGCA, pela amizade, convivência, colaboração e sugestões durante estes anos, e, em especial, a Iriani, Karla, Severino, Yolanda, Janice, Cristina, Daniela, Luciana, Masaharu, Francine, Danielle, Cândida, Pâmela, Pricila; Marcelo Célia, Márcia Portilho, Beatriz.

Aos funcionários da FEA-UNICAMP: Jardete, Cosme, Edinho, Marcos, Marquinhos, Ricardo, e ao pessoal da biblioteca da FEA: Toninho (*in memorian*), Creuza, Cláudia, Geraldo e José, pela ajuda e orientação no trabalho bibliográfico;

Aos amigos que possibilitaram alegria, estímulo, amizade e apoio em diversos momentos, em especial: Pedro Marinho, Mário Rolim, Leonard, Nonato, Miguel Angel, Sandra, Tereza, Gisele, Fabiana, Juliana, Daniela, Rodrigo, Lionel, Félix Joaquim, Cláudio e demais colegas pós-graduandos;

A todos que acreditaram e cooperaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

CONTEÚDO

RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv

Capítulo 1: Produção de Xilitol a partir do Bagaço de Cana-de-Açúcar

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABELAS.....	3
1.1. Introdução.....	5
1.2. Revisão de Literatura.....	7
1.2.1. Composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos.....	9
1.2.1.1. Celulose.....	9
1.2.1.2. Lignina	11
1.2.1.3. Hemicelulose.....	12
1.2.2. Hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	17
1.2.2.1. Aspectos gerais.....	17
1.2.2.2. Aplicação de ácidos na hidrólise do bagaço.....	19
1.2.3. Xilitol.....	22
1.2.3.1. Produção.....	22
1.2.3.2. Propriedades físico-químicas e tecnológicas.....	28
1.2.3.3. Aplicações.....	32
1.2.4. Via bioquímica da produção de xilitol.....	33
1.2.5. Fatores que afetam a produção de xilitol por microrganismos.....	35
1.2.5.1. Efeito da concentração de xilose.....	35

1.2.5.2. Efeito da temperatura e do pH.....	36
1.2.5.3 Efeito da composição do meio.....	38
1.2.5.4 Efeito da taxa de aeração.....	38
1.3. Considerações Finais	41
1.4. Referências Bibliográficas.....	42

Capítulo 2: Otimização da Obtenção Seletiva do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-Açúcar

ÍNDICE DE FIGURAS.....	54
ÍNDICE DE TABELAS.....	55
ÍNDICE DE ANEXOS.....	55
RESUMO.....	57
2.1. Introdução.....	59
2.2. Material e Métodos.....	62
2.2.1. Material.....	62
2.2.2. Hidrólise seletiva de bagaço de cana-de-açúcar.....	62
2.2.3. Métodos analíticos.....	65
2.2.3.1. Determinação da umidade do bagaço.....	65
2.2.3.2. Determinação dos açúcares no hidrolisado.....	65
2.2.4. Delineamento experimental.....	65
2.2.5. Análise estatística.....	66
2.3. Resultados e Discussão.....	67
2.4. Conclusões	83
2.5. Referências Bibliográficas.....	84
2.6. Anexos.....	88
2.6. Nomenclatura.....	90

Capítulo 3: Seleção de Leveduras Produtoras de Xilitol

ÍNDICE DE TABELAS.....	92
ÍNDICE DE FIGURAS.....	92
RESUMO.....	93
3.1. Introdução.....	95
3.2. Material e Métodos.....	97
3.2.1. Preparação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.....	97
3.2.2. Microrganismos.....	97
3.2.3. Preservação das culturas.....	97
3.2.4. Preparo do inóculo.....	98
3.2.5. Condições de fermentação.....	98
3.2.6. Determinação dos açúcares, xilitol e etanol.....	99
3.2.7. Determinação da massa celular (MCS).....	99
3.2.8. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	99
3.2.9. Análise estatística.....	100
3.3. Resultados e Discussão.....	100
3.4. Conclusões.....	110
3.5. Referências Bibliográficas.....	111
3.6. Nomenclatura.....	116

Capítulo 4: Otimização da Produção de Xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710

ÍNDICE DE FIGURAS.....	119
ÍNDICE DE TABELAS.....	122
ÍNDICE DE ANEXOS.....	124
RESUMO.....	127
4.1. Introdução.....	128

4.2. Material e Métodos.....	129
4.2.1. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.....	129
4.2.2. Microrganismo.....	129
4.2.3. Manutenção do microrganismo em meio sólido.....	129
4.2.4. Esterilização dos materiais.....	129
4.2.5. Preparo do inóculo.....	130
4.2.6. Métodos de fermentação.....	130
4.2.7. Métodos analíticos.....	133
4.2.8. Delineamento experimental.....	135
4.2.9. Análise estatística.....	136
4.3. Resultados e Discussão.....	137
4.3.1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	137
4.3.2. Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.....	139
4.3.3. Processos fermentativos.....	141
4.3.3.1. Estudo da influência do meio.....	141
4.3.3.2. Estudo da influência do pH inicial do meio de cultura.....	142
4.3.3.3. Estudo da influência da aeração.....	143
4.3.3.4. Estudo da influência da temperatura e da concentração inicial de xilose.....	145
4.4. Conclusões.....	193
4.5. Referências Bibliográficas.....	195
4.6. Anexos.....	201
4.7. Nomenclatura.....	206
5.0. Conclusões gerais.....	207

Produção de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar

Autor: José do Egito de Paiva

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adilma R. Pippa Scamparini

RESUMO

No processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar usou-se um delineamento fatorial 2^2 para estudar a produção de monossacarídeos em quatro tempos de reação: 11, 18, 30 e 50 minutos. As regressões nos tempos de 11 e 18 minutos foram altamente significativas ($p \leq 0,05$) com R^2 de 0,9757 e 0,9718, respectivamente. As regressões nos tempos de 30 e 50 minutos não foram significativas ($p \geq 0,05$) com R^2 de 0,8049 e 0,7707, respectivamente. Diferente dos tempos anteriores, os resíduos apresentaram evidentes falta de ajuste. A massa de açúcares produzidos nas melhores condições (18 min de reação; 126°C e 3,10 % (v/v) de H_2SO_4), foi de 333,41 mg/g de bagaço, b.s., composto por 266,73mg de xilose; 40,09 mg de glicose e 26,59 mg de arabinose/g do bagaço, b.s. Meio sintético e hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar foram empregados para produção de xilitol por leveduras. Dentre 50 linhagens de leveduras testadas, *Candida parapsilosis* IZ 1710 foi a que apresentou melhores resultados em hidrolisado hemicelulósico: produção de xilitol = 22,85 g/L; rendimento = 0,72 g/g e produtividade = 0,31 g/L.h, na temperatura de 30°C e 31,35 g/L de xilose. Esses resultados foram estatisticamente ($p \leq 0,05$) diferentes daqueles obtidos com outras linhagens. Para a otimização da produção de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710, utilizou-se um delineamento fatorial 2^2 , com 16, 28, 40, 52, 64, 76 e 88 h de fermentação. A estimativa do efeito linear da xilose foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tempos analisados, enquanto que a temperatura apresentou efeito quadrático significativo ($p \leq 0,05$) nas mesmas condições. As condições mais adequadas para otimização do processo de fermentação e que proporcionaram maior produção de xilitol (36,05 g/L); rendimento (0,73 g/g) e produtividade (0,46 g/L.h) por *Candida parapsilosis* IZ 1710, foram estabelecidas em: 30°C e 63,0 g/L de xilose. Com 88 h de fermentação, o modelo de regressão ajustado apresentou $R^2 = 0,9727$; regressão altamente significativa ($F_c = 146,28$; $F_t = 4,46$) e erro de 0,3447. Tais parâmetros indicam que o modelo é preditivo na região estudada.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar; hidrolisado hemicelulósico; xilose; fermentação; seleção de leveduras; *Candida parapsilosis* IZ 1710; xilitol; metodologia de superfície de resposta.

Production of xylitol from sugar cane bagasse

Author: José do Egito de Paiva

Advisor: Prof^a. Dr^a. Adilma R. Pippa Scamparini

SUMMARY

In the hydrolysis process of sugar cane bagasse a 2^2 factorial design was used to study the production of monossaccharides at four reaction times: 11, 18, 30 and 50 minutes. Regression models at 30 and 50 minutes were not significant ($p \geq 0.05$), with $R^2 = 0.8049$ and 0.7707 , respectively. In contrast to the earlier times, residues presented lack of fit. The mass of sugars produced at the best condition (18 minutes of reaction, 126°C and 3.1% (v/v) of H_2SO_4) was 333.41 mg/g (d.w.) of bagasse, constituted of 266.73 mg of xylose; 40.09 mg of glucose and 26.59 mg of arabinose /g of bagasse (d.w.). Synthetic media and hemicellulosic hydrolysate of sugar cane bagasse were used for xylitol production by yeasts. Among 50 tested yeast strains, *Candida parapsilosis* IZ 1710 presented the best result (xylitol production = 22.85 g/L , yield = 0.73 g/g , productivity = 0.31 g/L.h) in hemicellulosic hydrolysate at 30°C and 31.35 g/L of xylose. The results were different ($p \leq 0.05$) from those obtained with the other strains. For optimization of xylitol production by *Candida parapsilosis* IZ 1710, it was used a 2^2 factorial design with 16, 28, 40, 52, 64, 76 and 88 h of fermentation. The linear effect estimated for xylose concentration was significant ($p \leq 0.05$) at all tested times. Temperature presented significant ($p \leq 0.05$) quadratic effect at the same conditions. The best condition for optimization of the fermentation process providing the best xylitol production (36.05 g/L), yield (0.73 g/g) and productivity (0.46 g/L.h) by *Candida parapsilosis* IZ 1710 was obtained at 30°C and 63.0 g/L of xylose. At 88 h of fermentation, the fitted regression model presented $R^2 = 0.9727$, $F_c=146.28$, $F_t=4.46$, and $\text{error}=0.3447$. Such parameters indicate the model is predictive in the studied region.

Key words: sugar cane bagasse; hemicellulosic hydrolysate; xylose; fermentation; yeast selection; *Candida parapsilosis* IZ 1710; xylitol; response-surface methodology.

Capítulo 1

Produção de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar

ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABELAS	3
1.1. Introdução	5
1.2. Revisão de Literatura	7
1.2.1. Composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos	9
1.2.1.1. Celulose	9
1.2.1.2. Lignina.....	11
1.2.1.3. Hemicelulose.....	12
1.2.2. Hidrólise de materiais lignocelulósicos	17
1.2.2.1. Aspectos gerais.....	17
1.2.2.2. Aplicação de ácidos na hidrólise do bagaço	19
1.2.3. Xilitol	22
1.2.3.1. Produção.....	22
1.2.3.1.1. Processo químico	22
1.2.3.1.2. Processo biotecnológico	25
1.2.3.2. Propriedades físico-químicas e tecnológicas	28
1.2.3.3. Aplicações.....	32
1.2.4. Via bioquímica da produção de xilitol	33
1.2.5. Fatores que afetam a produção de xilitol por microrganismos.....	35
1.2.5.1. Efeito da concentração de xilose	35
1.2.5.2. Efeito da temperatura e do pH	36
1.2.5.3. Efeito da composição do meio	38
1.2.5.4. Efeito da taxa de aeração	38
1.3. Considerações Finais	41
1.4. Referências Bibliográficas	42

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Vias de utilização de materiais lignocelulósicos (Singh & Mishra, 1995a, modificado).....	8
Figura 1.2: Composição da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (Purchase, 1995).	9
Figura 1.3: Estrutura da celulose. Parte central da cadeia molecular (Fengel & Wegener, 1989; Bledzki <i>et al.</i> , 1996).....	11
Figura 1.4: Estrutura química da lignina de faia (Fengel & Wegener, 1989).....	12
Figura 1.5: Estrutura dos açúcares presentes nas hemiceluloses (Fengel & Wegener, 1989).	13
Figura 1.6: Estrutura química parcial da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana de madeiras duras. Sendo: Xylp=1,4-D-xilopirranose; Ac=acetil e Me-GlupU=ácido 4-O-metil-glucurônico (Fengel & Wegener, 1989).....	15
Figura 1.7: Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Sendo: Xyl = 1,4-D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glucopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidrodiferúlico (Mc Dougall <i>et al.</i> , 1993).....	16
Figura 1.8: Estrutura química da arabino-4-O-metilglucuronoxilana de madeiras moles (Fengel & Wegener, 1989).	17
Figura 1.9: Etapas do processo de produção de xilose e xilitol por via química (Hyvönen <i>et al.</i> , 1982).....	25
Figura 1.10: Doçura relativa de alguns açúcares e polióis (Godshall, 1997; Clarke, 1997).....	29

Figura 1.11: Proposta para via metabólica de xilose e glicose por leveduras (Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> , 1994).....	34
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Distribuição percentual de hemicelulósicos na madeira e resíduos agrícolas (Puls & Schuseil, 1993; Singh & Mishra, 1995a).	14
Tabela 1.2: Propriedades físico-químicas do xilitol (Hyvönen <i>et al.</i> , 1982).	31

Capítulo 1

1.1. Introdução

Materiais lignocelulósicos são os mais abundantes recursos naturais renováveis presentes na terra. O processo fotossintético produz anualmente cerca de 155 bilhões de toneladas de material orgânico derivado do reino vegetal. Cerca de 1,25% do total da biomassa terrestre é usada para alimentação humana, com aproximadamente 9,0% de perda durante as operações de processamento e o resto é contabilizado como resíduos lignocelulósicos (Kuhad & Singh, 1993; Singh & Mishra, 1995a).

O Brasil é bem conhecido por seu grande potencial em recursos renováveis, tais como culturas agrícolas, florestas e resíduos agro-industriais (Roberto *et al.*, 1995b). Dentre esses resíduos, o bagaço de cana-de-açúcar representa uma fonte abundante e de baixo custo de carboidratos, os quais podem ser microbiologicamente convertidos em combustível ou outros produtos químicos (Roberto *et al.*, 1991).

Em 1995, o Brasil produziu 301,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que representou 26,3% da produção mundial (FAO, 1995). Para cada tonelada de cana de açúcar moída, produz-se cerca de 300 kg do bagaço (com 50% de umidade), equivalendo a uma produção estimada de 90,48 milhões de toneladas do bagaço por safra (Guerra & Steger, 1988).

A indústria sucro-alcooleira usa a maior parte desse bagaço para a geração de vapor. Entretanto, as caldeiras usadas para a queima do bagaço são de baixa eficiência (60-65%). Essa eficiência poderia ser aumentada para até 90%, caso fossem implementados sistemas de recuperação de energia que reduzem a temperatura final dos gases de combustão (Herrera & Rivacoba, 1999), ou ainda através da mudança do sistema de combustão para leito fluidizado, o qual poderá aumentar a eficiência na ordem de 20-25% (Rasul & Rudolph, 2000).

Deve-se considerar também que a simples queima do bagaço não é muito

valiosa devido ao seu baixo calor de combustão, que é de aproximadamente 1300 kcal kg⁻¹ (Duarte, 1989). Por outro lado, tendo-se um possível excedente da ordem de até 10% sobre o total do bagaço produzido, isso representaria cerca de 9,0 milhões de toneladas desse resíduo disponível para conversão em produtos de maior valor agregado, tal como xilitol.

Xilitol é um poliol de cinco átomos de carbono presente na natureza. É um metabólito intermediário comum de carboidratos em microrganismos, seres humanos e animais, sendo também encontrado em muitas frutas e hortaliças. A extração de xilitol dessas fontes é difícil e não econômica devido a sua baixa concentração (Emodi, 1978; Singh & Mishra, 1995c; Parajó *et al.*, 1996). Por causa de sua escassez e das suas propriedades como anticariogênico e edulcorante que não sofre reação de Maillard, xilitol é um produto de alto custo (Krull & Inglett, 1980).

As matérias-primas das quais o xilitol é obtido comercialmente são as polpas de madeira resultantes do processamento de papel e de compensado, casca da semente de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, casca e farelo de arroz e aveia, sabugos, caules e hastes de milho, além de outros resíduos agrícolas (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982). Estas matérias-primas contêm 20-35% de xilana, um polímero formado de unidades de xilose, o qual pode ser convertido para xilose por hidrólise e em seguida para xilitol, por redução.

A produção comercial de xilitol por processo químico tem sido considerada de alto custo devido a inúmeras etapas de separação e purificação, resultando no aparecimento de diversos subprodutos. Somado a isso, tem-se as drásticas condições de temperatura e pressão em que ocorre a hidrogenação catalítica. Por essa razão, tem-se proposto a exploração de métodos por bioconversão de D-xilose. Esses processos oferecem algumas vantagens em relação ao processo químico: custo menor, não formação de componentes tóxicos, os quais resultam da conversão química, além de ser realizado à pressão e temperatura ambientes.

Dentre os microrganismos mais pesquisados para essa bioconversão, as leveduras têm recebido maior atenção devido aos resultados significativos de

produtividade obtidos até o presente por esses microrganismos (Singh & Mishra, 1995c). Baseados nas informações precedentes, propôs-se como objetivos principais no presente trabalho: a) estudar o efeito de diferentes temperaturas,, concentrações de ácidos e tempo de reação, na hidrólise seletiva do bagaço de cana-de-açúcar, visando o uso do hidrolisado hemicelulósico como substrato fermentativo; b) selecionar leveduras produtoras de xilitol utilizando como substrato fermentativo o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar; c) otimizar as condições fermentativas para a produção de xilitol por leveduras, empregando-se o método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta.

1.2. Revisão de Literatura

A utilização dos materiais lignocelulósicos é praticamente inesgotável para a obtenção de diversos produtos, tais como: resinas, ácidos orgânicos, adoçantes, solventes, gomas e polímeros da celulose. A **Figura 1.1** apresenta as várias formas de utilização de materiais lignocelulósicos (Ghosh & Singh, 1993; Singh & Mishra, 1995a).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANT

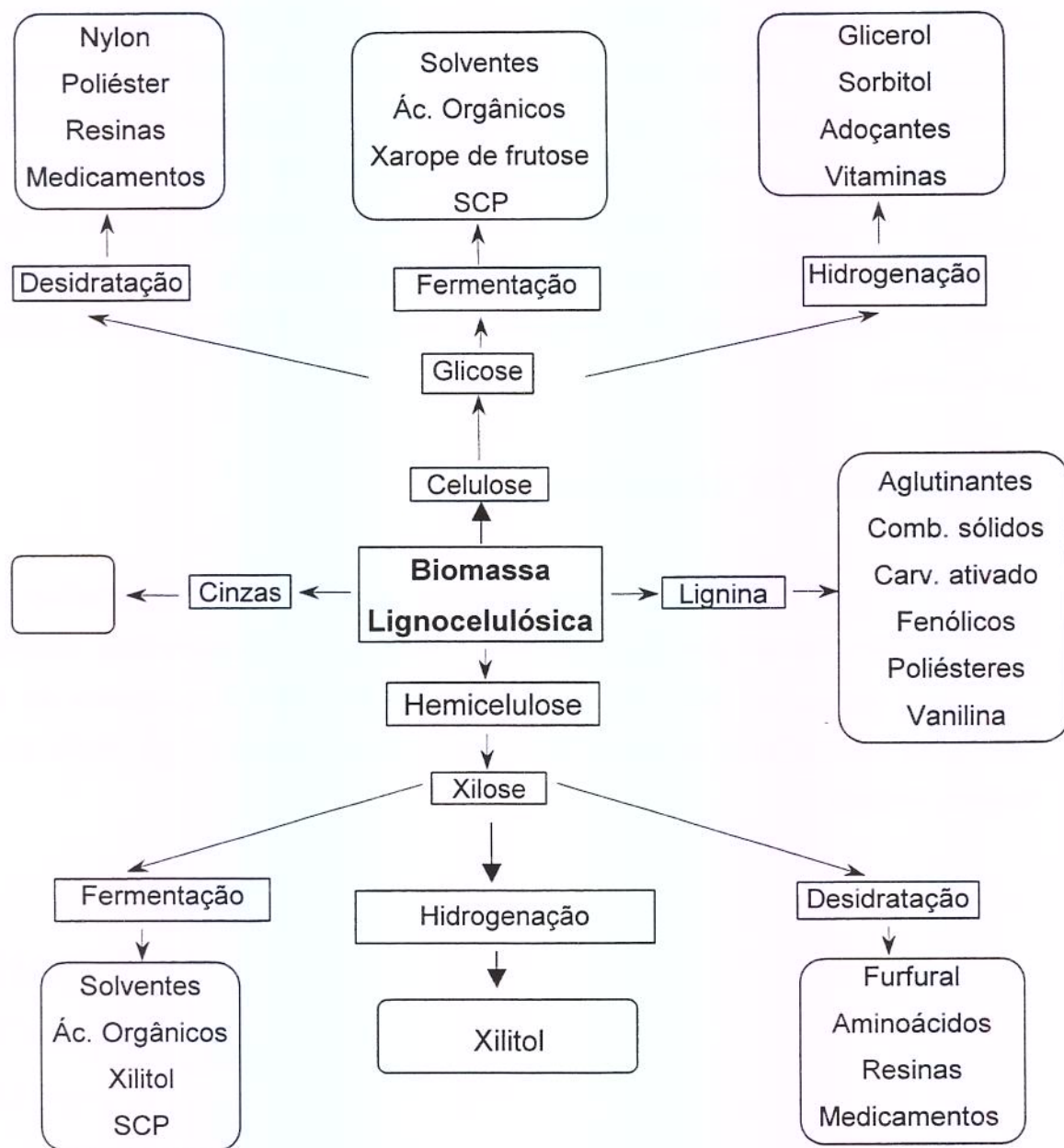


Figura 1.1: Vias de utilização de materiais lignocelulósicos (Singh & Mishra, 1995a, modificado).

Independente da origem, os três principais componentes orgânicos da biomassa vegetal são a celulose, a lignina e a hemicelulose, os quais encontram-se, na sua maioria, na proporção de 4:3:3 (Tsao, 1978). Na **Figura 1.2** observa-se a composição da fibra do bagaço de cana-de-açúcar, de acordo com Purchase (1995).

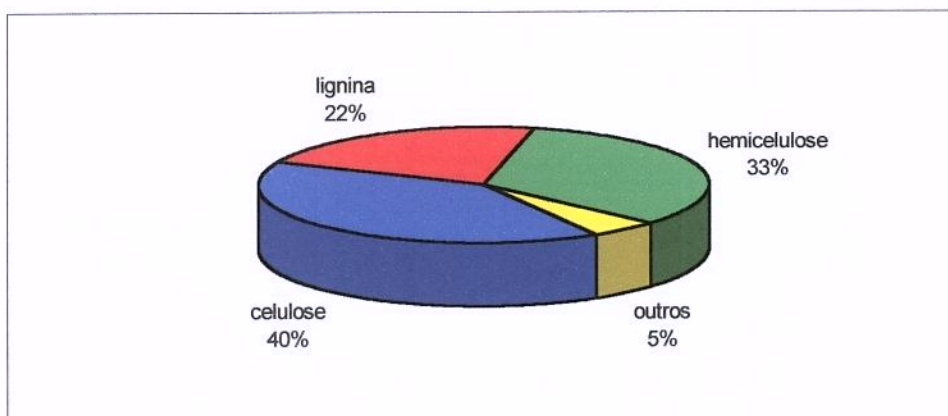


Figura 1.2: Composição da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (Purchase, 1995).

1.2.1. Composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos

1.2.1.1. Celulose

O maior constituinte dos materiais lignocelulósicos é a celulose. Esse polissacarídeo encontra-se na natureza em plantas superiores e organismos primitivos, como algas e bactérias. A estrutura primária desse polímero é constituída de unidades de glicose, unidas por ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4). A unidade repetitiva da cadeia de celulose é a celobiose, mostrada na **Figura 1.3** (Fengel & Wegener, 1989; Bledzki *et al.*, 1996).

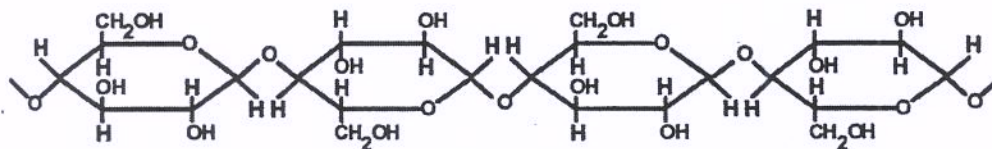


Figura 1.3: Estrutura da celulose. Parte central da cadeia molecular (Fengel & Wegener, 1989; Bledzki *et al.*, 1996).

A celulose encontra-se na parede celular das plantas, formando uma rede de microfibrilas ordenadas e paralelamente ligadas entre si por pontes de hidrogênio inter e intra-molecular, as quais conferem uma estrutura cristalina. Outras regiões menos ordenadas denominadas regiões amorfas, também existem em menor quantidade. A região cristalina e a sua associação fechada com a lignina, conferem a celulose, alta resistência à hidrólise ácida, alcalina, ou enzimática (Ladisch, 1979; Fengel & Wegener, 1989; Franzidis & Porteus, citados por Pessoa Junior, 1991).

1.2.1.2. Lignina

A lignina, o segundo maior componente da parede da fibra vegetal, possui uma estrutura polifenólica complexa que não é convertida em açúcares fermentáveis (Ladisch, 1979). A presença de lignina é característica das plantas superiores, tais como gimnospermas e angiospermas. A quantidade de lignina nas plantas varia de 20 a 40%. A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não é conhecida inteiramente. A participação dos precursores da lignina (álcool p-cumarílico; álcool coniferílico e álcool sinapílico) varia entre as espécies de plantas. Na **Figura 1.4** observa-se esquema estrutural de lignina de faia (Fengel & Wegener, 1989).

Dentre suas várias funções nas plantas, a lignina confere barreira ao ataque microbiano, contribui para resistência mecânica, além de proteger as plantas contra a penetração de água através da parede celular (Fengel & Wegener, 1989;

Goldstein, 1981).

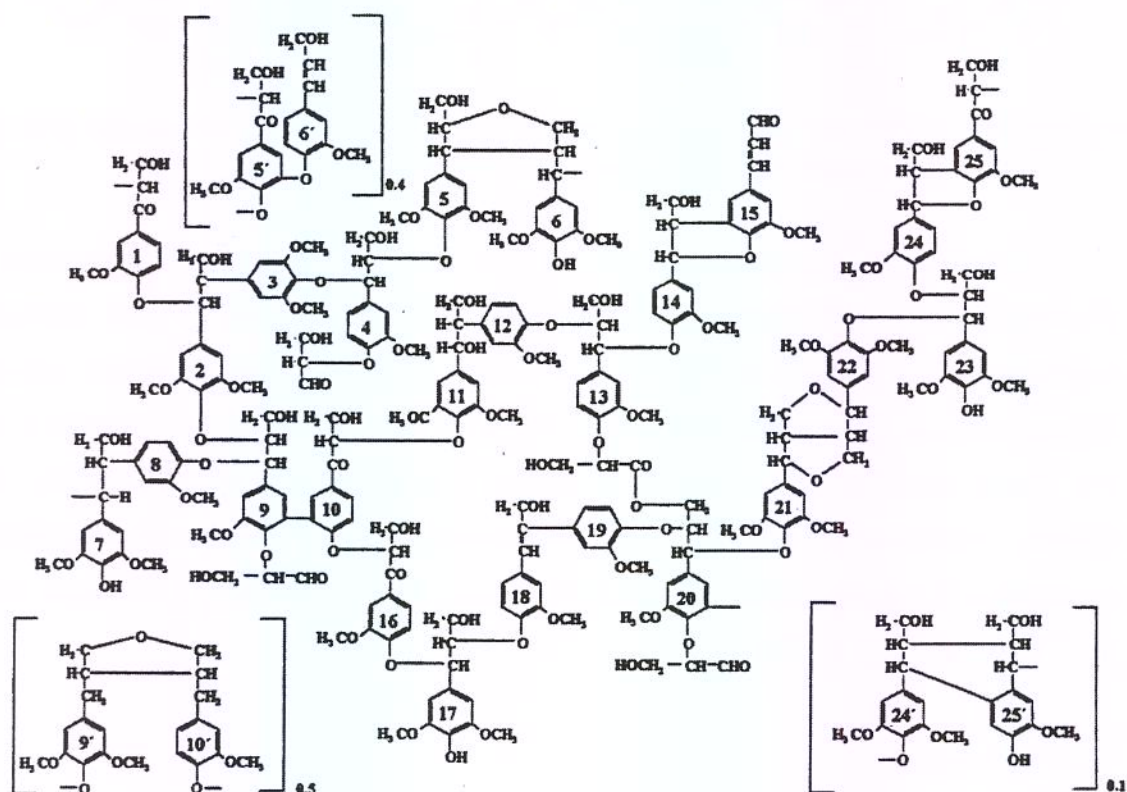


Figura 1.4: Estrutura química da lignina de faia (Fengel & Wegener, 1989).

1.2.1.3. Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos de baixo peso molecular, associadas na parede das plantas, com celulose e lignina. Hemiceluloses são heteroglicanas de cadeia linear e ramificada de hexosanas e pentosanas. D-xilose e L-arabinose são os maiores constituintes das pentosanas, enquanto D-glicose, D-galactose e D-manose são os principais constituintes das hexosanas. Constata-se ainda a presença dos ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses, conforme mostrado na **Figura 1.5** (Magee & Kosaric, 1985; Fengel & Wegener, 1989; Puls & Schuseil, 1993).

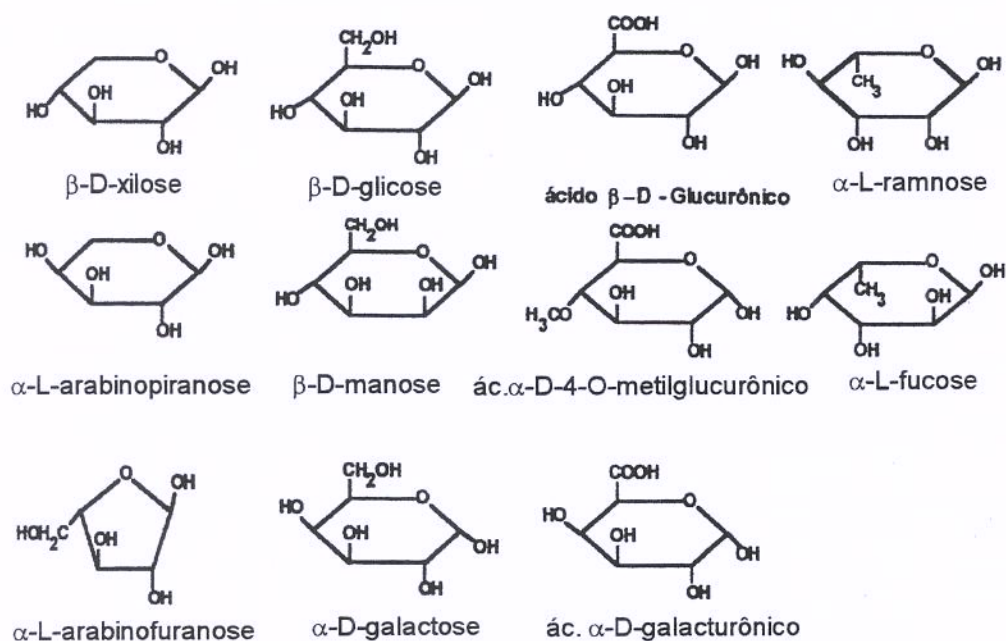


Figura 1.5: Estrutura dos açúcares presentes nas hemiceluloses (Fengel & Wegener, 1989).

Ao contrário das hemiceluloses da madeira, as hemiceluloses das gramíneas apresentam uma variedade de ligações e diferentes tipos de ramificações (Puls & Schuseil, 1993). A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, dependendo do tipo de tecido, do estágio de crescimento, condições ambientais e fisiológicas (Gong *et al.*, 1981).

Diferente da celulose, amido ou matérias pécticas, a hemicelulose mostra variabilidade em sua estrutura e constituição. A hemicelulose é comumente composta de dois a seis açúcares com grau de polimerização variando de 100 a 200 unidades de açúcar. Exceto para a galactose que apresenta ligações β -(1 $\rightarrow$ 3), a maioria dos seus constituintes têm ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), conforme Magee & Kosaric (1985) e Puls & Schuseil (1993).

As hemiceluloses permitem diferenciar as madeiras duras (folhosas) das madeiras moles (coníferas) e das gramíneas. As madeiras moles contêm alto percentual de manose, enquanto que as madeiras duras e as gramíneas são mais

ricas em xilose (Singh & Mishra, 1995a). As hemiceluloses são classificadas basicamente de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, arabinanas, mananas, glucanas, galactanas e pectinas. Na **Tabela 1.1** observa-se a distribuição dos açúcares presentes na madeira e em alguns resíduos agrícolas.

Tabela 1.1: Distribuição percentual de hemicelulósicos na madeira e resíduos agrícolas (Puls & Schuseil, 1993; Singh & Mishra, 1995a).

Substrato	Xilana	Arabinana	Galactana	Manana	Glicana
	(%)				
Madeira dura	17,4	0,5	0,8	2,5	50,1
Madeira mole	5,7	1,0	1,4	11,2	46,6
Palha	16,2	2,5	1,2	1,1	36,5
Bagaço	21,4	1,4	0,3	0,2	38,8

As xilanas representam 15-30% nas plantas anuais, 20-25% em madeiras duras e 7-12% em madeiras moles (Magee & Kosaric, 1985). As xilanas são homopolímeros formados por moléculas de xilose, unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). No caso de madeiras duras, as xilanas contêm, a intervalos irregulares, o ácido 4-O-metil glucurônico unidos por ligações α (1-2). Sete de dez unidades de xilose contêm o grupo acetil no C-2 ou no C-3, ou em ambas posições (Fengel & Wegener, 1989; Puls & Schuseil, 1993). A estrutura química parcial de uma xilana de madeira dura encontra-se representada na **Figura 1.6**.

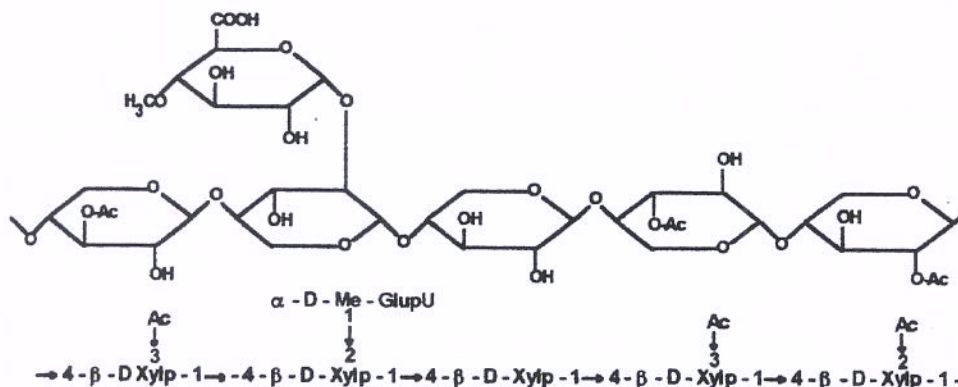


Figura 1.6: Estrutura química parcial da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana de madeiras duras. Sendo: Xylp=1,4-D-xilanopiranoose; Ac=acetil e Me-GlucU=ácido 4-O-metil-glucurônico (Fengel & Wegener, 1989).

As xilanas das gramíneas possuem o mesmo esqueleto das xilanas das madeiras duras, contudo, possuem menor quantidade de ácidos urônicos, mas são mais ramificadas. Além disso, contêm grande proporção de unidades de L-arabinofuranosil. Uma ampla variedade de estrutura de xilana existe nas gramíneas, dependendo da espécie e do tecido dentro da mesma espécie (Puls & Schuseil, 1993). As ligações glicosídicas entre os monômeros de D-xilose são menos estáveis que as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-glicose na celulose, devido principalmente à ausência de grupos CH_2OH ligados ao C-6. Por isso, os componentes da hemicelulose do bagaço são mais facilmente hidrolisados, especialmente quando comparados com os componentes da celulose (Fengel & Wegener, 1989; Purchase, 1995). A representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas encontra-se na **Figura 1.7**.

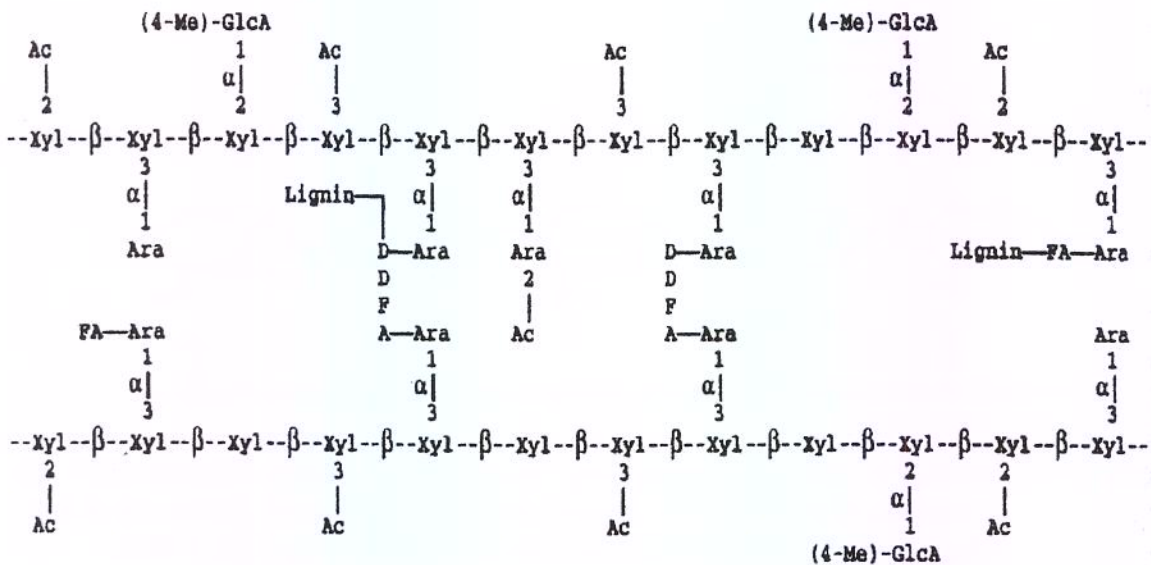


Figura 1.7: Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Sendo: Xyl = 1,4-D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glucopiranosurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidrodiferúlico (Mc Dougall *et al.*, 1993).

Todas as xilanas de madeiras moles pesquisadas até o momento consistem de uma cadeia principal formada por resíduos de D-xilopiranosose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). Aproximadamente 7 de 10 unidades de xilose são substituídas pelo ácido 4-O-metilglucurônico no C-2. Em vez de grupos acetil, como encontrados nas xilanas de madeira dura, as xilanas de madeira mole são caracterizadas pela presença de α -L-arabinofuranoses diretamente ligadas no C-3 da xilose. Uma arabinose ocorre a cada 8 ou 9 unidades de xilose (Puls & Schuseil, 1993). Essas xilanas apresentam valores de grau de polimerização (GP) entre 70 e 130, e são classificadas como arabino-4-O-metilglucuronoxilanas, conforme mostrado na **Figura 1.8** (Fengel & Wegener, 1989).

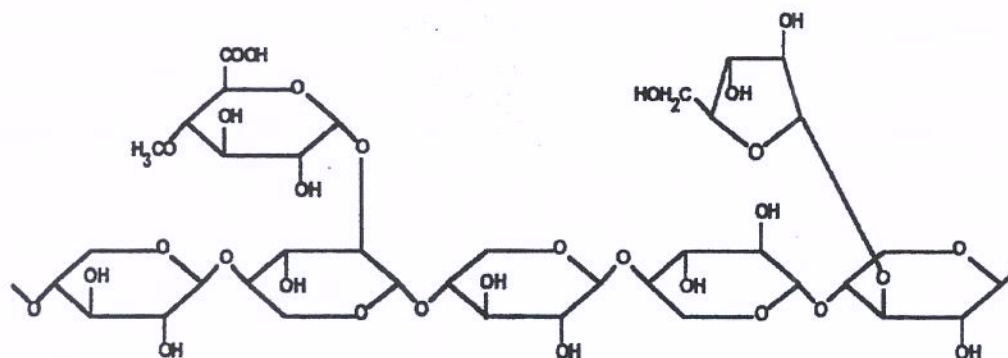


Figura 1.8: Estrutura química da arabino-4-O-metilglucuronoxilana de madeiras moles (Fengel & Wegener, 1989).

1.2.2. Hidrólise de materiais lignocelulósicos

1.2.2.1. Aspectos gerais

O rompimento da estrutura celulose-hemicelulose-lignina da biomassa lignocelulósica, além da separação seletiva desses componentes, demanda pré-tratamentos que podem levar a um completo ou parcial fracionamento. Em consequência, o principal objetivo do pré-tratamento é soltar a estrutura do material lignocelulósico, para que uma grande área superficial fique disponível, para uma eficiente ação enzimática (Kling *et al.*, 1986; Rolz *et al.*, 1987; Kuhad & Singh, 1993).

Diversas opções de pré-tratamentos têm sido propostos, incluindo físico (mecânico e por irradiação), físico-químico (térmico), químico e biológico, ou a combinação destes, visando a obtenção de cada componente polimérico dos materiais lignocelulósicos, com máximo rendimento e pureza (Singh & Mishra, 1995b).

Os principais métodos térmicos são: auto-hidrólise e explosão a vapor. A técnica de auto-hidrólise usa temperaturas variando de 170°C a 200°C, enquanto que no método de explosão a vapor, a temperatura se estende até 250°C, seguida de um rápido decréscimo de pressão (Kling *et al.*, 1987; Singh & Mishra, 1995b; Silva, 1995). Materiais lignocelulósicos quando submetidos à técnica de auto-

hidrólise são extensivamente desintegrados. A fração hemicelulose pode em seguida ser extraída com água, álcalis ou solventes orgânicos. A reação de auto-hidrólise envolve a formação de ácido acético a partir de grupos acetil localizados na fração hemicelulósica. Esse ácido formado catalisa a hidrólise da hemicelulose e também quebra a matriz lignina-celulose (Bouchard *et al.*, citado por Ghosh & Singh, 1993).

Pré-tratamentos biológicos usualmente causam degradação parcial dos materiais lignocelulósicos. A acessibilidade das enzimas a esses materiais pode ser limitada devido a muitos fatores, tais como área superficial, porosidade das fibras e tamanho dos poros da fibra. Além do mais, deve ser considerada a organização molecular da celulose e da lignina, que certamente limita o acesso das enzimas ao substrato (Viikari *et al.*, Kantelinen *et al.*, citados por Singh & Mishra, 1995b).

A combinação do pré-tratamento biológico com outros pré-tratamentos tem se mostrado eficiente. Dekker & Wallis (1983) combinaram os pré-tratamentos de auto-hidrólise e enzimático na sacarificação do bagaço de cana, resultando em mais de 80% de conversão da celulose em glicose, com 24 h de tratamento com β -glicosidase. Manonmani & Sreekantiah (1987) também combinaram dois pré-tratamentos: alcalino e um conjunto de enzimas dos fungos *Aspergillus ustus* e *Trichoderma viride* para a sacarificação do bagaço de cana, obtendo 90% de conversão.

Dentre os pré-tratamentos químicos, tem-se o alcalino, no qual destaca-se o uso de hidróxido de sódio e de amônio. Os pré-tratamentos químicos em meio básico tendem a extrair e solubilizar a hemicelulose e a lignina, separando-as da celulose. O processo alcalino causa inchamento, decréscimo do grau de polimerização e cristalinidade, separação e quebra da estrutura da lignina. A maior consequência do tratamento alcalino é a saponificação das ligações éster intermoleculares, promovendo assim o inchamento da celulose e favorecendo a penetração das enzimas na parede celular (Ghosh & Singh, 1993; Singh & Mishra, 1995b).

Rolz *et al.* (1987) avaliaram vários pré-tratamentos na hidrólise do bagaço de cana, tais como: hidróxido de sódio, carbonato de cálcio mais hidróxido de cálcio, amônia, SO₂, explosão a vapor, organosolventes e fenol-água. De acordo com os autores, praticamente toda hemicelulose foi hidrolisada pelos pré-tratamentos fenol-água e explosão a vapor. O uso de hidróxido de sódio foi superior aos pré-tratamentos com carbonato de cálcio mais hidróxido de cálcio e amônio, enquanto o tratamento com SO₂ foi inferior aos que usaram hidróxido de sódio e explosão a vapor.

1.2.2.2. Aplicação de ácidos na hidrólise do bagaço

A hidrólise ácida tem sido eficientemente empregada para a separação da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos. Ácidos como sulfúrico, clorídrico, nítrico e fosfórico foram empregados na obtenção de hidrolisado hemicelulósico por diversos pesquisadores (Ladisch, 1979; Krull & Inglett, 1980; Singh *et al.*, 1984; Toit *et al.*, 1984; Zyl *et al.*, 1988; Duarte, 1989; Roberto *et al.*, 1991; Saska & Ozer, 1995; Roberto *et al.*, 1995ab).

As técnicas de extração de açúcares da biomassa que dão preferência ao uso de condições drásticas com ácidos concentrados têm levado a muitas perdas da hemicelulose, principalmente pela degradação para furfural. Em consequência, muitos autores têm acentuado a necessidade de remover seletivamente a hemicelulose como primeiro passo no tratamento dos materiais lignocelulósicos (Magee & Kosaric, 1985). Por isso, uma hidrólise ácida sob condições moderadas tem várias vantagens. Tal hidrólise poderá: (a) prevenir a decomposição da xilose para furfural (um agente inibidor dos microrganismos), (b) limitar a produção de subprodutos por microrganismos (por exemplo: xilitol, arabitól), (c) promover a susceptibilidade da celulose para posterior hidrólise ácida ou enzimática, (d) evitar a ocorrência de problemas ambientais devido ao uso de tratamentos químicos drásticos (Magee & Kosaric, 1985; Ghosh & Singh, 1993).

Durante o processo da hidrólise ácida, o próton do catalisador interage com o oxigênio da ligação glicosídica, dando origem a um ácido conjugado. Nesse

momento, ocorre alteração na configuração da molécula de glicose acompanhada da clivagem da ligação C-O, originando um cátion carbono. Essa protonação ocorre também com menor probabilidade no oxigênio do anel de glicose, resultando na sua abertura com formação de um cátion carbono acíclico. Com a adição de uma molécula de água no cátion carbono, ocorre a formação de um produto estável e liberação de um próton (Fengel & Wegener, 1989).

Visando um melhor aproveitamento dos açúcares presentes na biomassa, tem sido proposto a hidrólise em dois estágios. Isso é possível porque a fração hemicelulose é hidrolisada facilmente quando comparada com a hidrólise da celulose (Tsao, 1978; Ladisch, 1979; Toit *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1984). Parasi (citado por Pessoa Jr., 1991) afirma que a celulose é mais lentamente hidrolisada que a hemicelulose, devido à rigidez dos anéis de glicose, unidos na estrutura cristalina por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxil e os átomos de hidrogênio das cadeias adjacentes. Por outro lado, a celulose amorfa e a hemicelulose pouco interferem na flexibilidade do anel, possibilitando, com isso, hidrólise mais rápida quando comparada com a hidrólise da celulose cristalina.

Franzidis & Porteous (citados por Pessoa Jr., 1991) estudaram o comportamento das moléculas de ácido durante o processo de hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Esses autores afirmaram que a hidrólise das regiões cristalinas da celulose ocorre em velocidade 100 vezes menor, em relação a hemicelulose e as regiões amorfas da celulose.

Por outro lado, se a hidrólise da hemicelulose ocorre em velocidade maior, é verdade também que a degradação da xilose para furfural acontece mais rápida do que a decomposição da glicose para 5-hidroximetilfurfural. De acordo com Singh & Mishra (1995b) esse processo é cinco vezes mais rápido. Para prevenir ou minimizar a decomposição dos açúcares, principalmente às pentoses, é muito importante o emprego de soluções de ácidos diluídas, curto tempo de reação, baixas temperaturas e remoção rápida do agente hidrolítico (Gong *et al.*, 1981).

Compostos presentes no hidrolisado da madeira que são inibidores do sistema microbiano podem ser produzidos por quatro fontes, conforme Leonard &

Hajny (citados por Magee & Kosaric, 1985). São estas: a) produtos da decomposição dos açúcares (ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural); b) produtos solúveis da lignina (fenóis); c) extrativos da madeira (ácido resínico, ácido tânico, terpenos, fenóis); e d) íons de metais pesados resultantes da corrosão dos equipamentos (ferro, níquel, cromo e cobre). A formação de produtos inibidores do crescimento microbiano a partir dos açúcares também foram observados por outros autores, como principal problema no aproveitamento dos hidrolisados dos materiais lignocelulósicos (Felipe *et al.*, 1996; Pfelfer *et al.*, 1996).

Morjanoff & Gray (1987) combinaram os pré-tratamentos de explosão a vapor com ácido sulfúrico para incrementar a sacarificação enzimática do bagaço de cana. As melhores condições foram: 30 segundos com vapor saturado a 200°C e adição de 1,0 g de H₂SO₄/ 100 g do bagaço seco. Os resultados mostraram que 83 % da anidroglicana e 84 % da anidroxilana foram recuperados.

Em trabalho desenvolvido por Singh *et al.* (1984) visando a produção de xilose, furfural, açúcares fermentescíveis e etanol a partir do bagaço de cana e casca de arroz, esses autores testaram várias condições do processo, tais como: tamanho da partícula, relação sólido-líquido, concentração do ácido, temperatura e tempo de reação. Os resultados indicaram que o uso de partículas menores que 495 µm não favoreceu o rendimento de açúcares redutores, enquanto que à relação sólido-líquido de 1:15 mostrou-se mais adequada para a formação de açúcares redutores. A hidrólise usando H₂SO₄ a 0,4% na temperatura de 180°C resultou em 22,5% de xilose do bagaço e 21,5% da casca de arroz por 100 g de matéria seca.

O uso de ácido diluído para hidrólise de resíduos agrícolas permite a solubilização seletiva quase total da hemicelulose, enquanto a celulose é afetada ligeiramente. Por exemplo, 95% das pentoses do sabugo de milho foram convertidas para xilose por digestão a 121°C por 50 min, com somente 0,98% de ácido sulfúrico (Dunning & Lathrop, 1945).

Outro processo usando ácido para produção de xarope rico em xilose foi desenvolvido por Saska & Ozer (1994). Esse processo consistiu na extração

aquosa, hidrólise ácida do concentrado aquoso, centrifugação e clarificação do hidrolisado. O rendimento de xilose variou de 60 a 89%, dependendo do grau de trituração do bagaço da cana.

Paiva *et al.* (1999) avaliaram o processo de hidrólise com ácido sulfúrico para a produção de D-xilose, L-arabinose e D-glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar. As melhores condições foram: 18 minutos de reação, 126°C e concentração de H₂SO₄ 3,1% (v/v). Os resultados mostraram uma excelente correlação entre os fatores estudados ($R^2=0,97$). A produção dos monossacarídeos foi (mg/g do bagaço seco): D-xilose, 266,73; L-arabinose, 26,59; D-glicose, 40,09. Esses resultados representaram 96 % do máximo teórico para anidroxilana e 100 % para glicose da hemicelulose.

1.2.3. Xilitol

Descoberto em 1891, pelo químico alemão Emil Fischer, o xilitol tem sido usado como agente adoçante desde a década de 60. Xilitol, um álcool pentahidroxiado (pentiol) de xilose, é produzido comercialmente pela hidrólise da fração hemicelulósica dos materiais vegetais ricos em xilana (Hyvönen *et al.*, 1982, Nigam & Singh, 1995).

A produção de xilitol por meio da extração de fontes naturais torna-se impraticável e não econômica devido à pequena quantidade em que ocorre em frutas e vegetais (0,014-0,9%), de acordo com Jana *et al.*, 1994.

1.2.3.1. Produção

1.2.3.1.1. Processo químico

O xilitol é produzido por processo químico através da redução da xilose purificada em presença de catalisador. De toda produção mundial de xilitol, 80,0 % usa o níquel como catalisador (Hyvönen *et al.*, 1982).

A escolha da matéria-prima para manufatura de xilitol é muito importante. A maioria das alternativas é de materiais volumosos e de baixa densidade. O ideal,

por isso, é que a matéria-prima para uma produção em larga escala esteja disponível em grandes quantidades, seja de baixo custo e apresente alto teor de xilana. Por esse motivo é que na Itália utiliza-se casca de amêndoas, enquanto que na China e Rússia usa-se a casca de arroz e de semente de algodão, respectivamente. Já na Finlândia, a maior parte da produção utiliza lascas de “birchwood” (bétula), conforme Hyvönen *et al.*, (1982).

O uso de resíduos da indústria de polpa e papel tem sido proposto como uma alternativa mais econômica. Todas essas matérias-primas contêm quantidades altas de xilose e relativamente pequenas de polímeros formados por outros açúcares, tais como glicose, manose, arabinose e galactose em suas hemiceluloses. Esses materiais, quando hidrolisados, requerem uma purificação e separação para remover aqueles açúcares da xilose e do xilitol. Apesar de tudo, é possível obter um rendimento 50 a 60% de xilitol a partir de xilana (Hyvönen *et al.*, 1982).

Manolo *et al.* (1992) obtiveram xilitol do bagaço de cana envolvendo as seguintes etapas: digestão do bagaço com NaOH, hidrólise com H₂SO₄, redução eletrolítica da xilose, purificação, evaporação e cristalização.

O processo químico é de custo elevado, uma vez que ocorre em reatores a elevadas pressão (acima de 50 atm) e temperatura (80 a 140°C), além de exigir extensivas etapas de purificação final para retirada do catalisador. Essa etapa é indispensável para que o xilitol possa ser empregado para fins alimentícios e farmacêuticos (Hyvönen *et al.*, 1982; Nigam & Singh, 1995).

O esquema apresentado na **Figura 1.9** representa o processo químico de produção de xilose e xilitol, proposto por Hyvönen *et al.* (1982).

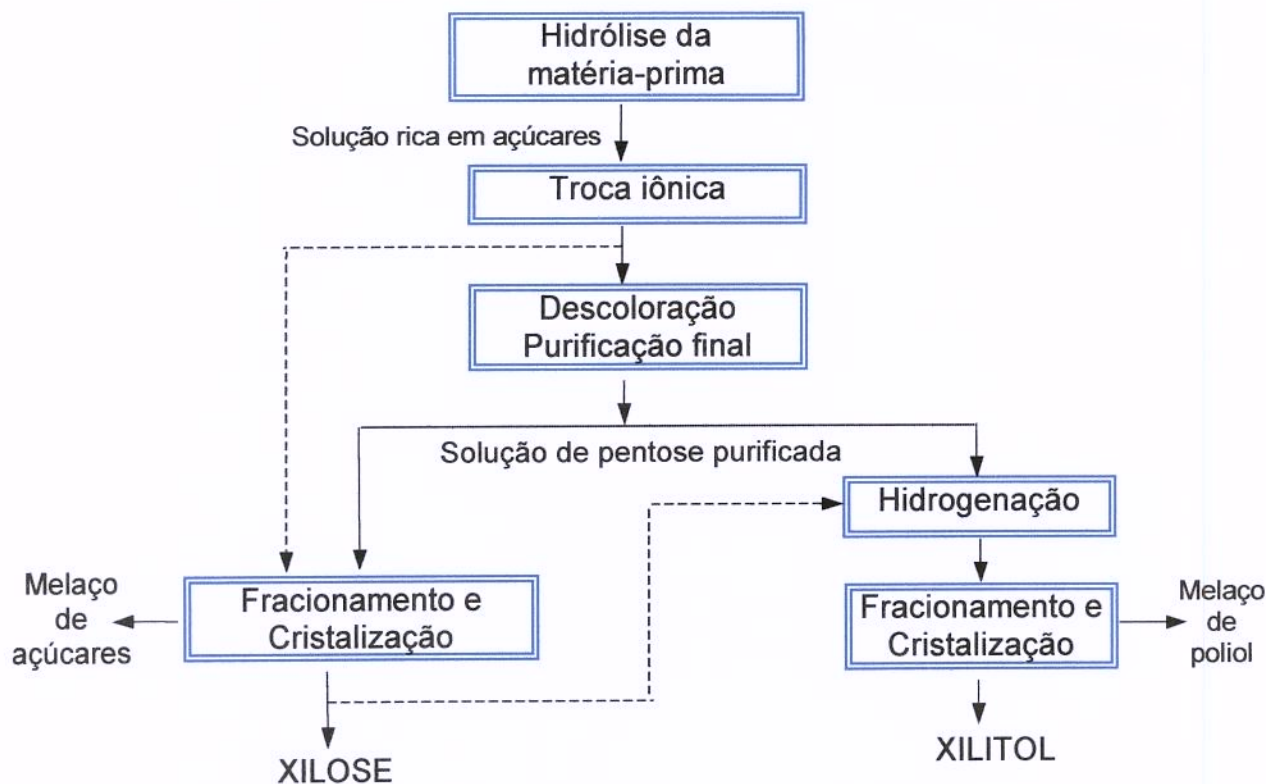


Figura 1.9: Etapas do processo de produção de xilose e xilitol por via química (Hyvönen *et al.*, 1982).

1.2.3.1.2. Processo biotecnológico

Desde que a produção de xilitol por processo químico tem sido considerada onerosa, devido às etapas de separação e purificação, tem-se proposto a exploração de métodos usando microrganismos (Preez, 1994). O processo de produção de xilitol usando microrganismos oferece algumas vantagens em relação ao processo químico, principalmente por não necessitar de uma solução de xilose de alta pureza, já que a bioconversão ocorre no próprio hidrolisado hemicelulósico e de forma seletiva. Por outro lado, a eficiência e a produtividade do processo fermentativo depende principalmente do microrganismo, das condições ambientais e nutricionais e das condições operacionais da fermentação (Preez, 1994).

Processos microbiológicos para bioconversão de xilose em xilitol por leveduras, bactérias e fungos miceliais ou a combinação de culturas foram revisados por Nigam & Singh (1995).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A conversão de D-xilose para xilitol usando uma cultura do fungo *Petromyces albertensis* foi reportado por Dahiya (1991). A conversão de D-xilose para xilitol usando as bactérias *Corynebacterium sp* e *Myobacterium smegmatis* foi estudada por Yoshitake *et al.* e Izumori & Tuzaki, respectivamente (citados por Singh & Mishra, 1995c). Nishio *et al.* (1989) estudaram a produção de xilitol por células imobilizadas de *Candida pelliculosa* e *Methanobacterium sp*, em coluna empacotada com células co-imobilizadas por duas semanas.

A produção de xilitol por leveduras tem sido a mais estudada, principalmente por aquelas pertencentes ao gênero *Candida*. Entre essas, *Candida guilliermondii* tem mostrado habilidade para a produção de xilitol com bom rendimento e produtividade (Barbosa *et al.*, 1988; Meyrial *et al.*, 1991; Roberto *et al.*, 1991; Felipe *et al.*, 1993; Nollet *et al.*, 1993; Roberto *et al.*, 1995ab; Gurgel *et al.*, 1995; Felipe *et al.*, 1996; Pfeifer *et al.*, 1996; Rodrigues, 1997; Felipe *et al.*, 1997; Mayerhoff *et al.*, 1997; Dominguez *et al.*, 1999).

Outras leveduras também têm demonstrado capacidade de metabolizar xilose para xilitol, tais como *Candida sp* (Chen & Gong, 1985); *Candida tropicalis* (Horitsu *et al.*, 1992; Yahashi *et al.*, 1996; Paiva *et al.*, 1998); *Candida mogii* (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995; Mayerhoff *et al.*, 1997); *Candida parapsilosis* (Furlan *et al.*, 1991; Nollet *et al.*, 1993; Furlan *et al.*, 1994; Preziosi-Belloy, 1997; Mayerhoff *et al.*, 1997); *Pachysolen tannophilus* (Furlan *et al.*, 1994; Roebuck *et al.*, 1995); *Debaryomyces hansenii* (Parajó *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1999; Gírio *et al.*, 2000); *Candida sp.* 11-2 (Dominguez *et al.*, 1996); *Candida sp* L-102 (Lu *et al.*, 1995); *Candida shehatae* (Preez *et al.*, 1986; Furlan *et al.*, 1994; Hintray *et al.*, 1995); *Pichia stipitis* (Preez *et al.*, 1986; Furlan *et al.*, 1994; Mahler & Guebel, 1994); *Candida boidinii* (Winklenhausen *et al.*, 1996).

Gong *et al.* (1983), testaram 20 linhagens pertencentes ao gênero *Candida* de 11 diferentes espécies quanto à capacidade de converterem xilose em xilitol. Todas as linhagens de *Candida* converteram D-xilose em xilitol, mas o rendimento foi considerado apenas moderado (10-15%).

Chen & Gong (1985), obtiveram uma concentração de 94,74 g/L de xilitol a

partir de 105,35 g/L de D-xilose em hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar após 96 h de fermentação, usando a linhagem *Candida sp* B-22. Em outro estudo realizado por Sirisansaneeyakul *et al.* (1995), onze linhagens de leveduras foram testadas para produção de xilitol a partir de xilose. Entre todas, *Candida mogii* ATCC 18364 foi a que apresentou o maior rendimento ($Y_{p/s} = 0,62$ g/g).

A capacidade de conversão de D-xilose em xilitol de 44 linhagens de 5 diferentes gêneros de levedura foi avaliada por Barbosa *et al.* (1988). Os resultados indicaram que as melhores espécies produtoras de xilitol foram: *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis*. As linhagens dessas espécies tiveram a vantagem de apresentar uma conversão rápida e eficiente, porém *Candida guilliermondii* apresentou uma outra vantagem que foi a de produzir etanol em baixa quantidade. Essa levedura produziu 77,2 g/L de xilitol a partir de 104,0 g/L de D-xilose, o que representou 81,0% de rendimento, considerando-se o valor teórico.

1.2.3.2. Propriedades físico-químicas e tecnológicas

Atualmente tem aumentado o uso de xilitol em alimentos e fármacos devido a suas propriedades físico-químicas e tecnológicas, incluindo o seu alto poder adoçante e suas propriedades anticariogênicas (Waller *et al.*, 1992; Aguirre-Zero *et al.*, 1993; Roberto *et al.*, 1995b; Felipe *et al.*, 1996).

Xilitol é um composto completamente sem atividade ótica em solução. Ao contrário de outros açúcares (sacarose, glicose e frutose), o xilitol tem um ponto de ebulição abaixo de sua decomposição. Por isso, observa-se uma discreta mudança de cor na temperatura de 216°C, nas condições abaixo da pressão atmosférica (Hyvönen *et al.* 1982).

Xilitol, como os demais polióis, é reconhecido por apresentar baixo valor calórico em relação aos carboidratos convencionais, devido a sua baixa absorção e metabolismo incompleto. Conseqüentemente, o Conselho Diretivo da Comunidade Européia tem assegurado um valor de 2,4 kcal/g para todos os polióis, o que representa uma redução calórica de 40,0% quando comparado aos

açúcares convencionais (Second ...,1992).

A maioria dos microrganismos é incapaz de utilizar xilitol. Tem sido mostrado que xilitol não é fermentado pelos microrganismos da flora bucal, principalmente *Streptococcus mutans*. Dessa forma, não ocorre a formação de ácidos, que atacam o esmalte dos dentes, durante o consumo de alimentos contendo xilitol (Emodi, 1978).

Xilitol tem uma estrutura pouco similar a sacarose, mas esses adoçantes possuem doçuras equivalentes. Isto é muito importante do ponto de vista tecnológico, uma vez que a doçura constitui um dos fatores determinantes de atração dos alimentos livres de açúcares. Os consumidores desejam o mesmo sabor doce dos alimentos tradicionais, naqueles preparados com adoçantes alternativos, como o xilitol. Por outro lado, na aplicação de produtos farmacêuticos, a doçura é freqüentemente necessária para mascarar o “flavour” dos ingredientes ativos. Na **Figura 1.10** observa-se a doçura relativa de diversos açúcares e polióis (Godshall, 1997; Clarke, 1997).

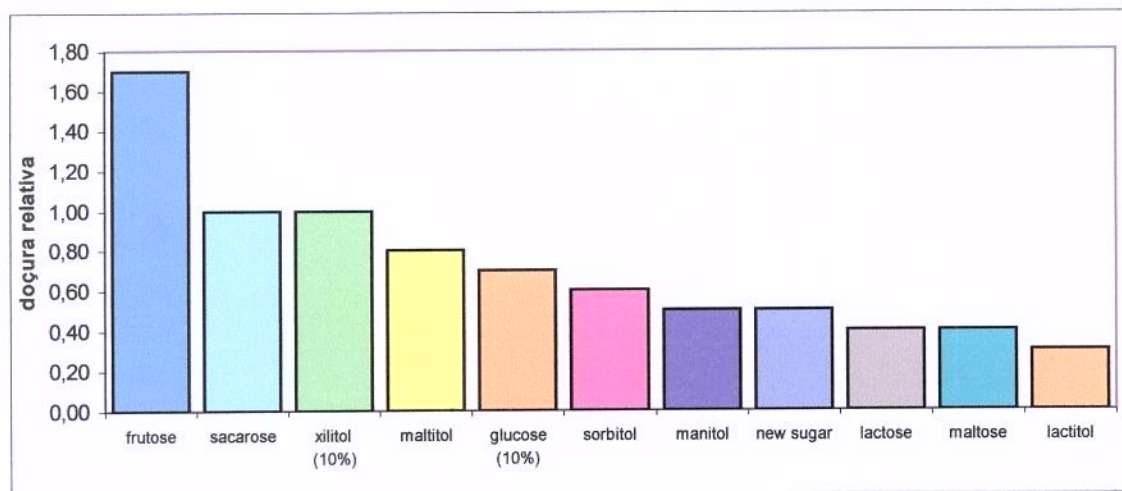


Figura 1.10: Doçura relativa de alguns açúcares e polióis (Godshall, 1997; Clarke, 1997).

Outra característica marcante de xilitol é a sua dissolução endotérmica. O calor (cal/g), requerido para dissolver 1,0 g deste pentiol é o mais alto conhecido entre os açúcares e outros polióis (sacarose, 4,34; glicose, 14,2; maltitol, 19,0;

sorbitol, 23,2 e xilitol, 36,6). Essa propriedade confere um verdadeiro efeito refrescante para os alimentos contendo xilitol sólido, como goma de mascar (Hyvönen *et al.*, 1982; Second..., 1992). Na **Tabela 1.2** estão apresentadas algumas propriedades físico-químicas de xilitol.

Devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos em sua estrutura molecular, o xilitol não participa de reações de escurecimento do tipo Maillard, constituindo-se em vantagem ou desvantagem, quando xilitol é usado como ingrediente nos alimentos (Hyvönen *et al.*, 1982).

Tabela 1.2: Propriedades físico-químicas do xilitol (Hyvönen *et al.*, 1982).

Propriedades	Características ou valores
Fórmula e peso molecular	C ₅ H ₁₂ O ₅ ; 152,15 g/mol
Aparência	pó cristalino de cor branca
Odor	nenhum
Ponto de fusão	92-96°C
Ponto de ebulição	216°C (1 atm)
pH da solução	5,6 (5%); 5,4 (40%)
Densidade da solução	1,03 g/cm ³ (10%); 1,23 g/cm ³ (60%)
Solubilidade a 30°C	68 g/100 g solução (igual a da sacarose)
Viscosidade a 20°C	1,23 cP (10%); 20,63 cP (60%)
Calor de dissolução	-36,6 cal/g
Higroscopicidade	em elevada umidade relativa, o xilitol é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol.

1.2.3.3. Aplicações

Como já descrito, o xilitol apresenta algumas propriedades que o torna potencialmente aplicável no processamento de alimentos.

Nos países da América do Sul, Dinamarca, Alemanha, Suíça, Escandinávia, Finlândia, Japão, Suécia e Canadá, o xilitol vem sendo empregado há vários anos como adoçante em goma de mascar, balas, caramelos, geléias e chocolates, entre outros produtos alimentícios (Felipe *et al.*, 1993, Jana *et al.*, 1994). Outras aplicações em alimentos incluem sorvetes, iogurtes, produtos de padaria e bebidas, indústrias de enlatados de hortaliças e frutas (Manolo *et al.*, 1992; Jana *et al.*, 1994; Parajó *et al.*, 1996). O uso de xilitol em sobremesas apresenta as seguintes vantagens: a) tem um excelente sabor e confere um efeito refrescante maior que o do sorbitol; b) propicia redução de 90 % da cárie dentária; c) pode ser usado como excelente substituto para pessoas diabéticas e d) quando usado em sorvetes, apresenta o mesmo escore sensorial em relação aos sorvetes processados com sacarose (Jana *et al.*, 1994).

Vale destacar a importância de xilitol no tratamento de pacientes diabéticos ou pessoas deficientes da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, uma vez que esse poliol não necessita de insulina para seu metabolismo. Este poliol pode ainda ser usado em muitas preparações líquidas em medicações, nutrição parenteral, devido a sua não cariogenicidade e não fermentabilidade. Em adição, não é metabolizado por microrganismos específicos (estreptococos) normalmente presentes na flora oral, em consequência, pode ser usado na prevenção da cárie dental (Emodi, 1978; Xylitol..., 1981; Magee & Kosaric, 1985; Manolo *et al.*, 1992; Jana *et al.*, 1994; Singh & Mishra, 1995c).

Estudo conduzido por Grunber *et al.*, citado por Emodi (1978), consistiu na administração de ração para ratos contendo os polióis: sorbitol, manitol e xilitol. Os autores observaram uma redução, em cerca de 30 %, na incidência de cáries naqueles animais, alimentados com rações que continham sorbitol e manitol. Quando a dieta foi à base de xilitol, observou-se uma completa eliminação da formação de cáries.

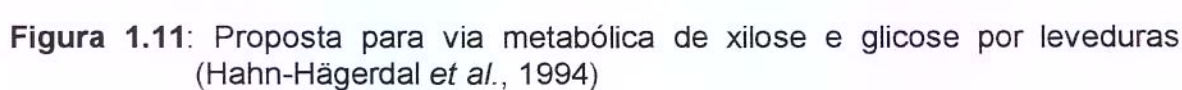
Aguirre-Zero *et al.* (1993) pesquisaram o efeito acidogênico do consumo de goma de mascar sobre a placa dentária. As pessoas envolvidas na pesquisa foram submetidas a quatro regimes: sem goma, goma com sorbitol, goma com sacarose e goma com xilitol. Ao final de duas semanas, os autores concluíram que a goma com xilitol contribuiu menos para o potencial acidogênico da placa dentária que as demais situações. Os resultados indicaram que o uso regular de goma de mascar com xilitol pode contribuir para reduzir o potencial acidogênico da placa dentária.

Estudos desenvolvidos na Finlândia por Isokangas *et al.* (1989) sugeriram um efeito, em longo prazo, do xilitol na prevenção da cárie dental pelos seguintes mecanismos: a) diminuição da incidência de *Streptococcus mutans* na placa dental, devido ao acúmulo de xilitol 5-fosfato; b) redução da formação de polissacarídeos extracelulares pelos *S. mutans*, principalmente os polissacarídeos insolúveis na água como a mutana; c) não é metabolizado pelos microrganismos acidogênicos para a formação de ácidos, principalmente o ácido láctico e d) participação na remineralização do esmalte dental.

1.2.4. Via bioquímica da produção de xilitol

A produção de xilitol por microrganismos, especialmente as leveduras, ocorre devido à capacidade desses microrganismos sintetizarem a enzima xilose redutase (XR; E.C. 1.1.1.21), a qual catalisa a redução de D-xilose para xilitol como passo inicial na utilização desse açúcar. Essa reação é dependente de NADPH ou NADH como cofatores (Jefferies, 1983; Nollet *et al.*, 1993; Preziosi-Belloy *et al.*, 1997). Xilitol é em seguida excretado das células e/ou oxidado para xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH; E.C. 1.1.1.9) com a participação do cofator NAD^+ (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994 - **Figura 1.11**). A subsequente fosforilação é catalisada pela enzima xiluloquinase (E.C. 2.7.1.17).

O requerimento de oxigênio durante a fermentação da xilose é freqüentemente atribuído ao desbalanceamento do potencial redox, o qual ocorre durante as condições anaeróbicas, devidas a diferença de cofatores exigidos



1.2.5. Fatores que afetam a produção de xilitol por microrganismos

A bioconversão de D-xilose para xilitol pode ser influenciada por fatores culturais e nutricionais. Várias pesquisas têm demonstrado a influência destes fatores e a produção de xilitol tem aumentado por otimização dos mesmos.

Segundo Horitsu *et al.* (1992), há dois caminhos para otimização das condições culturais. O primeiro utiliza um modelo cinético na produção de xilitol, a partir da xilose, e o segundo, consiste na aplicação de métodos estatísticos. O segundo método tem sido demonstrado como muito proveitoso na otimização de condições de reações de microrganismos.

A seguir, apresentam-se os principais fatores que influenciam no crescimento e rendimento dos microrganismos na produção de xilitol.

1.2.5.1. Efeito da concentração de xilose

Em geral, os valores de rendimento e produtividade de xilitol aumentam continuamente com o aumento da concentração inicial de xilose, ao passo que o rendimento, em biomassa, decresce. Esta tendência só é alterada quando se atinge concentração de substrato alta para causar inibição do microrganismo pelo mesmo.

Aplicando planejamento experimental com metodologia de superfície de resposta, Horitsu *et al.* (1992) encontraram interação significativa entre a concentração de D-xilose, concentração de extrato de levedura e taxa de aeração. A produtividade máxima de xilitol (2,67 g/L.h) pela levedura *Candida tropicalis* foi obtida quando a concentração inicial de D-xilose e a concentração de extrato de levedura foram 172,0 e 21,0 g/L, respectivamente, e a taxa de aeração foi de 451,50 mL/min (90 % de saturação de O₂).

Dominguez *et al.* (1996) pesquisaram a influência de diferentes concentrações iniciais de xilose na produção de xilitol. A produção de xilitol foi aumentada quando a concentração inicial de xilose passou de 30,0 para 50,0 g/L,

alcançando uma produção máxima de xilitol (28,90 g/L) após 48 h de fermentação. Observaram ainda que o decréscimo da produção de xilitol foi acentuado quando a concentração inicial de xilose foi aumentada. Com concentração inicial de 60,0 g/L, a maioria da xilose foi utilizada e alcançada máxima produção de xilitol (21,35 g/L) após 72 h de fermentação.

Comportamento similar foi observado por Felipe *et al.* (1997). Esses pesquisadores avaliaram a bioconversão de xilose para xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037, cultivada em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. A máxima produtividade volumétrica (0,75 g/L.h) ocorreu em testes com hidrolisado contendo 54,5 g/L de xilose. A produtividade decresceu para 0,57 g/L.h, quando a concentração de xilose aumentou para 74,2 g/L.

Paiva *et al.* (1998) estudaram a influência da composição do meio na produção de xilitol por *Candida tropicalis* IZ 1824. Os autores observaram que o crescimento celular foi crescente com o aumento da concentração de xilose e extrato de levedura. O melhor resultado de MCS (15,64 g/L) foi obtido na concentração de 75,00 g/L de xilose e 20,00 g/L de extrato de levedura. A produção de xilitol apresentou comportamento bastante diferenciado em relação aos níveis de xilose e extrato de levedura. Os melhores resultados de rendimento (0,40 g/g) e de produtividade (0,47 g/L.h) ocorreram com 50,00 g/L de xilose e 10,00 g/L de extrato de levedura. Esses autores concluíram que maior concentração inicial de xilose não favorece, necessariamente, ao aumento de produção e de produtividade de xilitol.

1.2.5.2. Efeito da temperatura e do pH

A temperatura e o pH exercem grande influência em todos os aspectos do crescimento microbiano, metabolismo, viabilidade e fermentabilidade.

A influência do pH, temperatura e a concentração inicial do substrato na fermentação de xilose por *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* foram avaliadas por Preez *et al.* (1986). O pH ótimo situou-se na faixa de 4,0-5,5 em temperatura de 30° C. A melhor concentração inicial de xilose foi de 50,0 g/L. A levedura *Pichia*

stipitis foi mais tolerante a temperatura mais elevada. O rendimento de etanol de *Candida shehatae* foi de cerca de 75%, enquanto o de *Pichia stipitis* situou-se na faixa de 85-90 % do máximo teórico.

Roebuck *et al.* (1995) aplicaram a metodologia de superfície de resposta para determinar a temperatura ótima e pH de crescimento de *Pachysolen tannophilus*, uma levedura capaz de fermentar hexoses e pentoses para produção de etanol e xilitol. Os resultados indicaram que o máximo de rendimento da densidade da biomassa correspondeu ao pH 3,7 e temperatura de 31,5°C.

A quantidade máxima de xilitol foi obtida em pH inicial de 6,0-7,0 por *Petromyces albertensis* (Dahiya, 1991), em pH 6,0 por *Candida guilliermondii* (Meyrial, *et al.*, 1991) e em pH 4,0 por *Candida tropicalis* (Horitsu *et al.* 1992).

Nolleau *et al.* (1993; 1995) avaliaram a redução de xilose para xilitol por *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* em diferentes concentrações iniciais de xilose, pH e taxa de transferência de oxigênio (OTR). Esses pesquisadores mostraram que essas leveduras apresentaram exigências das condições ambientais bem diferentes. As condições ótimas para produção de xilitol por *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* foram: concentração inicial de xilose de 100 e 300 g/L, OTR de 0,4 e 2,2 mmoles/L.h e pH de 4,75 e 6,0, respectivamente.

De acordo ainda com Nolleau *et al.* (1993; 1995) a diferença de comportamento das leveduras *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* deve ser explicado pela diferença do metabolismo inicial da xilose: a atividade da enzima xilose redutase usando o cofator NADPH é maior que quando essa enzima utiliza o cofator NADH. As leveduras *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* apresentaram baixos níveis de atividade de xilose redutase dependente de NADH, de acordo com Nolleau *et al.* (1993). Essas atividades mostraram ser dependentes do grau de aerobiose e da concentração inicial de xilose e foram correlacionadas com acumulação de xilitol.

1.2.5.3. Efeito da composição do meio

Barbosa *et al.* (1988) apontaram a importância da fonte de nitrogênio e da aeração no rendimento da produção de xilitol a partir da xilose por algumas linhagens de leveduras. Com *Candida shehatae*, a produção de xilitol foi considerada alta com fontes de nitrogênio orgânico devido à elevação da concentração da enzima desidrogenase xilitol (Palnitkar & Lachke, 1992).

O efeito de diferentes fontes de nitrogênio e nutrientes orgânicos na produção de xilitol de *Petromyces albertensis* foi bem investigado por Dahiya (1991). Esses autores concluíram que a melhor fonte de nitrogênio foi o acetato de amônio (16,7 g/L de xilitol), enquanto o extrato de levedura mostrou ser a melhor fonte de nutrientes orgânicos para aquele microrganismo (30,6 g/L de xilitol). Outro efeito considerado importante foi a suplementação de metanol no meio contendo xilose. O mesmo pesquisador observou um incremento na produção de xilitol na ordem de 8% quando adicionou ao meio 1 % (v/v) de metanol.

A influência da concentração de magnésio no crescimento, produção de xilitol e etanol por *Pichia stipitis* foi bem estudada sob condições de transferência de oxigênio constante. Um incremento significativo na produção da biomassa e etanol ocorreu quando a concentração de Mg^{2+} passou de 1,0 para 4,0 mM. Por outro lado, a produção de xilitol foi bem melhor quando a concentração de Mg^{2+} foi baixa (1,0 mM), considerando-se que 49,0 % do fluxo de carbono foi desviado da produção de etanol para xilitol, devido à acumulação de NADH intracelular (Mahler & Gueber, 1994).

1.2.5.4. Efeito da taxa de aeração

A disponibilidade de oxigênio tem significativa influência na fermentação de xilose, sendo o rendimento em xilitol dependente da velocidade de transferência de oxigênio. Por outro lado, a taxa de aeração é um aspecto fundamental de qualquer processo utilizando leveduras, uma vez que o oxigênio é necessário para a síntese de ácidos graxos insaturados, importantes na formação das membranas.

Além disso, as leveduras quando utilizam xilose como substrato requerem oxigênio para reciclar o cofator NADH, cujo acúmulo leva à interrupção na assimilação da xilose (Jeffries, 1983).

De acordo com Furlan *et al.* (1991), uma quantidade limitada de oxigênio é necessária para a formação de xilitol, entretanto, excesso do mesmo ativa o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, levando a regeneração do cofator NAD^+ , necessário para a transformação de xilose em xilulose. A xilulose formada é então degradada através da Via Pentose-Fosfato e da Via Embden-Meyerhof-Parnas e assim, à acumulação de xilitol cai com o aumento do oxigênio disponível.

Furlan *et al.* (1994) estudaram a influência do oxigênio na produção de xilitol e etanol por leveduras. *Candida parapsilosis* não foi capaz de fermentar xilose anaerobicamente (efeito Kluyver). Por outro lado, o excesso de oxigênio (500 rpm; 0,6 vvm) favoreceu o crescimento da massa celular ($Y_{x/s} = 0,29 \text{ g.g}^{-1}$), enquanto que a acumulação de xilitol decresceu consideravelmente ($Y_{p/s} = 0,10 \text{ g g}^{-1}$ e $Q_{p2} = 0,023 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Esses valores indicaram que o excesso de oxigênio favoreceu a formação da biomassa celular em prejuízo da formação de xilitol.

Ainda segundo estes autores, isso ocorreu porque o excesso de oxigênio leva a oxidação de NADH para NAD^+ e uma alta relação NAD^+/NADH conduz a oxidação de xilitol para xilulose, em consequência menos xilitol foi acumulado. Quando a produção de xilitol ocorreu em condições moderadas de oxigênio (250 rpm; 0,3 vvm) o crescimento celular foi prejudicado ($Y_{x/s} = 0,11 \text{ g.g}^{-1}$), enquanto a acumulação de xilitol foi favorecida ($Y_{p/s} = 0,65 \text{ g g}^{-1}$ e $Q_{p2} = 0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por outros pesquisadores.

Horitsu *et al.* (1992) relataram que numa produção efetiva de xilitol, deve-se inicialmente considerar uma rápida acumulação de células microbianas no meio de cultura. Isso pode ser viabilizado através da manutenção de oxigênio em nível elevado no meio de cultura. Contudo, desde que xilitol é produzido sob condições limitadas de oxigênio, mantendo um nível alto de oxigênio dissolvido no meio durante todo o período de cultivo, poderá ocorrer a produção de xilulose pela desidrogenação do xilitol formado. Por essa razão, alto nível de oxigênio

dissolvido é requerido somente na fase inicial do cultivo.

O efeito da taxa de oxigênio na produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii* foi relatado por Parajó *et al.* (1996). Esses pesquisadores concluíram que a máxima concentração de xilitol foi obtida com uma menor agitação (100 rpm). Ao contrário, quando a concentração de oxigênio dissolvido foi alta, a xilose foi preferencialmente utilizada para crescimento celular. Em condições semi-anaeróbicas a produção de xilitol pelos microrganismos *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* foi favorecida (Barbosa *et al.*, 1988; Furlan *et al.*, 1991).

Xilitol é obtido da xilose em condições aeróbicas e com concentração limitada de oxigênio, mas não na ausência desse elemento. Isto foi observado por Sirisansaneeyakul *et al.* (1995), utilizando *Candida mogii* ATCC 18364. Produção máxima (0,62 g/g) foi obtida quando a concentração inicial de xilose e a taxa específica de oxigênio foram de 53,0 g/L e 0,5 mmol O₂/g.h, respectivamente. O baixo nível de aeração favorecendo a produção de xilitol pela levedura *Candida boidinii* NRRL Y-17213 também foi registrado por Winkelhausen *et al.* (1996).

1.3. Considerações Finais

Pelos dados apresentados na literatura, observa-se que o bagaço de cana-de-açúcar constitui uma fonte abundante e barata de matéria-prima para conversões em produtos de maior valor agregado, tal como xilitol. Atualmente a disponibilidade desse resíduo agrícola poderá ser ampliada ainda mais, caso sejam implementados sistemas de recuperação das caldeiras das indústrias do setor sucro-alcooleiro. Tais medidas levariam ao aumento da eficiência dessas caldeiras e menos bagaço seria necessário para atender a demanda de energia daquelas unidades industriais. Estudos estão sendo feitos para conversão do bagaço em energia elétrica.

Apesar do pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos utilizando ácidos diluídos já ter sido extensivamente estudado, o efeito das interações temperatura, concentração do ácido e tempo de reação empregando um planejamento estatístico com análise de superfície de resposta ainda não foi bem estudado.

Desde que a produção de xilitol por processo químico tem sido oneroso devido às etapas de separação e purificação, tem se proposto a exploração por via biotecnológica.

A conversão de D-xilose para xilitol por leveduras tem sido a mais estudada, principalmente por aquelas pertencentes ao gênero *Candida*.

Ainda que a seleção de linhagens de leveduras produtoras de xilitol tenha sido objeto de várias pesquisas (Gong *et al.*, 1983; Barbosa *et al.*, 1988; Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995), deve-se procurar, em processos fermentativos, novos microrganismos que apresentem melhor desempenho na produção de xilitol.

A otimização dos processos fermentativos utilizando metodologia de superfície de resposta foi pouco estudada. Um planejamento experimental empregando essa metodologia oferece como principal vantagem a redução do número de ensaios (Box *et al.*, 1978; Barros Neto, 1995), portanto, esta metodologia será adotada neste trabalho.

1.4. Referências Bibliográficas

- 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, n. 1, p. 55-59, 1993.
- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed. Unicamp. Campinas-São Paulo, Brasil, 1996, 299 p.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed. Unicamp. Campinas São Paulo, Brasil, 1996, 299 p.
- BLEDZKI, A. K.; REIHMANE, S.; GASSAN, J. Properties and modification methods for vegetable fibers for natural fiber composites. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 59, n. 8, p. 1329-1336, 1996.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: Wiley and Sons, 1978, 653 p.
- CHEN, L. F.; GONG, C. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 226-228, 1985.
- CLARKE, M. A. Sugars in food processing-a wide range of valuable properties for baking and confectionery. **International Sugar Journal**, v. 99, n. 1179, p 114-118,120,123,124,126, 1997.

DAHIYA, J. S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 14-18, 1991.

DEKKER, R. F. H.; WALLIS, F. A. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 25, n. 12, p. 3027-3048, 1983.

DOMINGUEZ, J. M.; CRUZ, J. M.; ROCA, E.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cell. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 119-130, 1999.

DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C. S.; 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.

DUARTE, H. C. Hidrólise do bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado. Tese de Doutorado. Instituto de Química-UNICAMP, Campinas-SP, 1989, 112 p.

DUNNING, J. W.; LATHROP, E. C. The saccharification of agricultural residues. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, n.1, p. 24-29, 1945.

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

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Production Yearbook**. Roma, 1995, v. 49.

FELIPE, M. G. A.; ALVES, L. A.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I.M.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 6, n. 2,3, p. 281-283, 1996.

- FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. ; ROSA, S. A. M. Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolizate of hemicellulose obtained from sugar cane bagasse. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 103-114, 1993.
- FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.4, p.251-254, 1997.
- FENGEL, D.; WENEGER, G. (eds.) **Wood - Chemistry Ultrastructure Reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, p.610, 1989.
- FURLAN, S. A.; BOUILLLOUD, P.; CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 657-662, 1994.
- FURLAN, S.; BOUILLLOUD, P.; STREHAIANO, P.; RIBA, J. P. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 203-206, 1991.
- GHOSH, P. ; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic - microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 295-333, 1993.
- GÍRIO, F.M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**. v. 71, n. 3, p. 245-251, 2000.
- GODSHALL, M. How carbohydrates influence food flavor. **Food Technology**, v.51, n. 1, p. 63-67, 1997.

- GOLDSTEIN, I. S. **Organic Chemicals from Biomass**, Flórida, CRC Press, p. 309, 1981.
- GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Conversion of hemicellulose carbohydrates. **Advances Biochemical Engineering**, v. 20, p. 93-118, 1981.
- GONG, C.S.; CLAYPOOL, T. A.; MCCracken, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P.P.; TSAO, G. T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 25, n.1, p 85-102, 1983.
- GUERRA, J. L.; STEGER, E. Sugar cane bagasse: na alternative fuel in the brazilian citrus industry. **Food Technology**, v.45, n. 5, p. 138, 140, 141, 1988.
- GURGEL, P. V.; MANCILHA, I. M.; PEÇANHA, R. P.; SIQUEIRA, J. F. M. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolyzate. **Bioresource Technology**, v. 52, n. 3, p. 219-223, 1995.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n. 11, p. 933-943, 1994.
- HERRERA, M. C.; RIVACOBÁ, R. S. Cana de açúcar e meio ambiente. In: CONFERÊNCIA AÇUCAREIRA. FAO. Havana, 25 p., 1999. Apresentação.
- HINFRAY, C.; JOUENNE, T.; MIGNOT, L.; JENTER, G. A. Influence of the oxygenation level on d-xylose fermentation by free and agar-entrapped of *Candida shehatae*. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 682-687, 1995.
- HORITSU, H.; YAHASHI, Y.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, n. 3, p. 248-253, 1992.

- HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 373-403, 1982.
- ISOKANGAS, P.; TIEKSO, J.; ALANEN, P.; MÄKINEN, K. K. Long-term effect of xylitol chewing gum on dental caries. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v.17, p. 200-203, 1989.
- JANA, A. H.; JOSHI, N. S. S.; SHARMA, A. M. Sweeteners for frozen success-a review. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 49, p. 98-109, 1994.
- JEFFERIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.**, v.27, p. 1-32, 1983.
- KLING, S. H.; CARVALHO NETO, C.; FERRARA, M. A.; TORRES, J. C. R. ; MAGALHÃES, D. B. ; RYU, D. D. Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse by steam explosion pretreatment. **Biotchnology & Bioengineering**, v. 29, n. 8, p. 1035-1039, 1986.
- KRULL, L. H.; INGLETT, G. E. Analysis of neutral carbohydrates in agricultural residues by gas-liquid chromatography. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 28, p. 917-919, 1980.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.
- LADISCH, M. R. Fermentable Sugars from Cellulosic Residues. **Process Biochemistry**. v. 14; n. 1; p.21-25, 1979.
- LU, J.; TSAL, L. B.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida Sp.* L-102. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 167-170, 1995.
- MAGEE, R. J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 32, p. 61-93, 1985.

- MAHLER, G. F.; GUEBEL, D. V. Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipits* NRRL Y-7124. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 407-412, 1994.
- MANOLO, J. B.; BOYLES, A.; AMBAL, W. O.; ESTRELLA, R. R. Production of xylitol from sugar cane bagasse. **Philippine Journal of Science**, v. 121, n. 2, p. 181-208, 1992.
- MANONMANI, H. K.; SREEKANTIAH, K. R. Saccharication of sugar-cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 8, p. 484-488, 1987.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. **Biotechnology Letters**, v. 19 n. 5, p. 407-409, 1997.
- McDOUGALL, G.J.; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 62, n. 1, p. 1-20, 1993.
- MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-Xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 281-286, 1991.
- MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotchnology & Bioengineering**, v. 29, n. 6, p. 733-741, 1987.
- NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol-a sugar substitute. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 2, p.117-124, 1995.

NISHIO, N.; SUGAWA, K.; HAYASE, N.; NAGAI, S. Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp HU. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n. 5, p. 356-360, 1989.

NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; DELGENES, J. P.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 191-197, 1993.

NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 4, p. 417-422, 1995.

PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; PETRAUSKAS, T. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Optimization of D-xylose, L-arabinose and D-glucose production obtained from sugar cane bagasse hydrolysis process. 6th **Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Guaratinguetá, SP, Brazil, 1999.

PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; PETRAUSKAS, T. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Influência da composição do meio na produção de xilitol por *Candida tropicalis* IZ1824. In: **VI Mostra de Trabalhos Científicos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos-Unicamp, Campinas, 1998.

PALNITKAR, S.; LACHKE, A. Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p.258-262, 1992.

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

- PESSOA JUNIOR, A. Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1991, 187 p.
- PFEIFER, M. J.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 423-430, 1996.
- PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 944-956, 1994.
- PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n 6, p. 360-364, 1986.
- PREZIOSI-BELLO, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21 n. 2, p. 124-129, 1997.
- PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P.ed. **Hemicellulose and hemicellulases**, London: Portland Press, chap.1, p.1-27, 1993.
- PURCHASE, B. S. Products from sugarcane. **International Sugar Journal**, v. 97, n. 1154, p. 70-72, 77-81, 1995.
- RASUL, M. G.; RUDOLPH, V. Fluidized bed combustion of Australian bagasse. **Fuel**, v. 79, p. 123-130, 2000.

- ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 3, p. 271-275, 1991.
- ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. 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, n. 2-3, p. 255-257, 1995b.
- ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. ; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.17, n. 11, p. 1223-1228, 1995a.
- RODRIGUES, D. C. G. A. Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo alimentado. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, SP, 104 p., 1997.
- ROEBUCK, K.; BRUNDIN, A.; JOHNS, M. Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 1, p. 75-78, 1995.
- ROLZ, C.; ARRIOLA, M. C.; VALLADARES, J.; CABRERA, S. Effects of some physical and chemical pretreatments on the composition, enzymatic hydrolysis and digestibility of lignocellulosic sugar cane residue. **Process Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 17-23, 1987.
- SASKA, M.; OZER, E. Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 45, n. 6, p. 517-523, 1994.

SECOND generation polyols in bakery products. **Food Trade Review**, v. 62, n. 7, p. 372, 1992.

SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. Tese de Doutorado. Instituto de Química-UNICAMP, Campinas-SP, 1995, 106 p.

SINGH, A.; DAS, K.; SHARMA, D. K. Production of xylose, furfural, fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, n. 2, p.51-61, 1984.

SINGH, A.; MISHRA, P. Extraction of pentosans from lignocellulosic materials. In: SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995b, chap. 3, p.71-98. (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).

SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial production of xylitol. In: SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995c, chap. 10, p. 273-299. (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).

SINGH, A.; MISHRA, P. Overview of problems and potential. In: SINGH, A. ; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995a, chap. 1, p. 1-31 (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).

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

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 66-80, 1988.

- TOIT, P. J.; OLIVIER, S. P.; BILJON, P. L. V. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and amino acid composition. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1071-1078, 1984.
- TSAO, G. T. Cellulosic material as a renewable resource. **Process Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 12-14, 1978.
- VAN ZYL, C. V.; PRIOR, B. A.; Du PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, p. 357-369, 1988
- WÄLLER, S. M.; ASSEV, S.; RÖLLA, G. Xylitol 5-P formation by dental plaque after 12 week's exposure to a xylitol/sorbitol containing chewing gum. **Scandinavian Journal Dental Research**, v. 100, n. 6, p. 319-21, 1992.
- WINKENLHAUSEN, E.; PITTMAN, P.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W.; Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v. 18 n. 7, p. 753-758, 1996.
- XYLITOL as a sucrose substitute: relation to dental caries. **Nutrition Reviews**, v. 39, n. 10, p. 368-371, 1981.
- YAHASHI, Y.; HATSU, M.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a non-woven fabric. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 12, p. 1395-1400, 1996.
- ZYL, C. V.; PRIOR, B. A.; Du PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stiptis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, p. 357-369, 1988.

Capítulo 2

Otimização da obtenção Seletiva do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-Açúcar

ÍNDICE DE FIGURAS	54
ÍNDICE DE TABELAS	55
ÍNDICE DE ANEXOS	55
RESUMO	57
2.1. Introdução	59
2.2. Material e Métodos	62
2.2.1. Material	62
2.2.2. Hidrólise seletiva do bagaço de cana-de-açúcar	62
2.2.3. Métodos analíticos	65
2.2.3.1. Determinação da umidade do bagaço	65
2.2.3.2. Determinação dos açúcares no hidrolisado	65
2.2.4. Delineamento experimental	65
2.2.5. Análise estatística	66
2.3. Resultados e Discussão	67
2.4. Conclusões	83
2.5. Referências Bibliográficas	84
2.6. Anexos	88
2.7. Nomenclatura	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Obtenção do hidrolisado hemicelulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar.	63
Figura 2.2: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 11 minutos de hidrólise.	71
Figura 2.3: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 18 minutos de hidrólise.	73
Figura 2.4: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 30 minutos de hidrólise.	75
Figura 2.5: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 50 minutos de hidrólise.	75
Figura 2.6: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 11 min de hidrólise.	79
Figura 2.7: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 18 min de hidrólise.	79
Figura 2.8: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 30 min de hidrólise.	81

Figura 2.9: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 50 min de hidrólise.	81
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Variáveis independentes com diferentes níveis a serem estudadas durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.	66
Tabela 2.2: Delineamento fatorial 2^2 com os valores codificados e os resultados experimentais obtidos por hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilose.	68
Tabela 2.3: Delineamento fatorial 2^2 com os valores codificados e os resultados experimentais obtidos por hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de glicose.	69
Tabela 2.4: Delineamento fatorial 2^2 com os valores codificados e os resultados experimentais obtidos por hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de arabinose.	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 2.1: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 11 minutos de hidrólise.	88
Anexo 2.2: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 18 minutos de hidrólise.	88

Anexo 2.3: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 30 minutos de hidrólise.....	89
Anexo 2.4: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 50 minutos de hidrólise.....	89
Anexo 2.5: Análise de significância das variáveis independentes na produção de xilose nos tempos de 11, 18, 30 e 50 minutos de hidrólise.....	90

RESUMO

Um delineamento fatorial 2^2 foi usado para estudar o efeito da combinação da temperatura e concentração de ácido sulfúrico na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de monossacarídeos em quatro tempos de reação: 11, 18, 30 e 50 minutos. Os açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As regressões nos tempos de 11 e 18 minutos foram altamente significativas ($p \leq 0,05$) com R^2 excelentes, de 0,9757 e 0,9718, respectivamente. Nesses tempos, as regressões não apresentaram evidência de falta de ajuste. O valor de F_c foi cerca de 8 vezes maior que o F_t para o tempo de 11 minutos e para 18 minutos essa razão foi de 6,83. Isso significa que o modelo quadrático, no nível de 95,0 % de confiança, foi adequado para descrever a superfície de resposta nas regiões estudadas. Por outro lado, as regressões nos tempos de 30 e 50 minutos não foram significativas ($p \geq 0,05$) com R^2 de 0,8049 e 0,7707, respectivamente. Nesses tempos maiores, os resíduos apresentaram evidentes falta de ajuste, notadamente à análise de regressão no tempo de 50 minutos ($F_c=2010,81$ e $F_t=19,16$). Tais condições levam a concluir que os tempos de 30 e 50 minutos de hidrólise não foram úteis com fins preditivos e portanto, o modelo não pode ser utilizado para prever a resposta de xilose na região estudada. A massa de açúcares obtidos, nas melhores condições (18 minutos de reação; 126°C e 3,10 % (v/v) de ácido sulfúrico), foi de 333,41 mg/g do bagaço, b.s., composto por 266,73mg de xilose; 40,09 mg de glicose e 26,59 mg de arabinose/g do bagaço, b.s. Para anidroxilana, os resultados representaram 96,0 % do máximo teórico, enquanto para glicose foi cerca de 100,0 %. Além disso, as economias de tempo e de energia são significativamente relevantes usando esse tempo de hidrólise.

Palavras chave: Bagaço de cana-de-açúcar; hidrólise ácida; hemicelulose; D-xilose, L-arabinose, D-glicose, metodologia de superfície de resposta.

Capítulo 2

2.1. Introdução

Materiais lignocelulósicos, contendo celulose, hemicelulose e lignina como maiores componentes, são os mais abundantes recursos naturais renováveis presentes na terra. Esses materiais têm grande potencial, uma vez que são ecologicamente vantajosos e podem ser utilizados para obtenção de produtos químicos e combustíveis líquidos (Kuhad & Singh, 1993; Singh & Mishra, 1995a; Kern, 1998).

Entre as diversas fontes potenciais de biomassa, o bagaço de cana-de-açúcar tem sido relatado na literatura como um dos mais promissores no processo de obtenção de açúcares (Saska & Ozer, 1994). A composição da fibra dessa gramínea varia amplamente nos seus três principais componentes: celulose (40-48 %); hemicelulose (22-33 %) e lignina (20-22 %), conforme McDougall et al. 1993 e Purchase, 1995.

No Brasil, o bagaço constitui-se em um resíduo particularmente conveniente para conversão por ser produzido em quantidades significantes ($4,5 \times 10^7$ t massa seca / ano) (FAO, 1995). Além disso, as vantagens de se usar o bagaço como substrato para bioconversão é devido ao seu alto teor de carboidratos (celulose e heteroxilana), baixo custo (resíduo agro-industrial), redução da poluição ambiental e, embora seja sazonal, encontra-se disponível o ano inteiro na indústria sucro-alcooleira (Dekker & Wallis, 1983; Toit *et al.*, 1984; Zyl *et al.*, 1988; Purchase, 1995; Rodrigues *et al.*, 1988; Rasul & Rudolph, 2000).

Por outro lado, é possível hidrolisar os materiais lignocelulósicos por vários processos, tais como enzimático, físico, químico ou a combinação desses, para produção de açúcares monoméricos com máximo rendimento e pureza (Singh & Mishra, 1995b).

As técnicas de extração de açúcares da biomassa que dão preferência ao uso de condições drásticas com ácidos concentrados, têm levado a muitas perdas da hemicelulose, principalmente pela degradação para furfural. Em consequência, muitos autores têm acentuado a necessidade de remover seletivamente a

hemicelulose como primeiro passo no tratamento dos materiais lignocelulósicos (Ladisch, 1979; Magee & Kosaric, 1985). Por isso, uma hidrólise ácida sob condições moderadas tem várias vantagens. Tal hidrólise poderá: (a) prevenir a decomposição da xilose para furfural (um agente inibidor dos microrganismos), (b) limitar a produção de subprodutos por microrganismos (por exemplo: xilitol, arabitól), (c) promover a susceptibilidade da celulose para posterior hidrólise ácida ou enzimática, e (d) evitar a ocorrência de problemas ambientais devido ao uso de tratamentos químicos drásticos (Magee & Kosaric, 1985; Ghosh & Singh, 1993).

A hidrólise em dois estágios é possível porque a fração hemicelulose é hidrolisada facilmente quando comparada com a hidrólise da celulose (Dunning & Lathrop, 1945; Tsao, 1978; Ladisch, 1979; Toit *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1984).

Parasi (citado por Pessoa Jr., 1991) afirma que a celulose é mais lentamente hidrolisada que a hemicelulose, devido à rigidez dos anéis de glicose, unidos na estrutura cristalina por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxil e os átomos de hidrogênio das cadeias adjacentes. Por outro lado, a celulose amorfa e a hemicelulose pouco interferem na flexibilidade do anel, possibilitando, com isso, uma hidrólise mais rápida quando comparada com a hidrólise da celulose cristalina.

Franzidis & Porteous (citados por Pessoa Jr., 1991) estudaram o comportamento das moléculas de ácido durante o processo de hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Esses autores afirmaram que a hidrólise das regiões cristalinas da celulose ocorre em uma velocidade 100 vezes menor em relação a hemicelulose e as regiões amorfas da celulose.

Em trabalho desenvolvido por Singh *et al.* (1984) visando a produção de xilose, furfural, açúcares fermentescíveis e etanol a partir do bagaço de cana e casca de arroz, esses autores avaliaram várias condições do processo, tais como: tamanho da partícula do material, relação sólido-líquido, concentração do ácido, temperatura e tempo de reação. Os resultados indicaram que o uso de partículas menores que 495 µm não beneficiou o rendimento de açúcares redutores, enquanto que à relação sólido-líquido de 1:15 mostrou-se a mais adequada para a formação desses açúcares. A hidrólise usando H₂SO₄ a 0,4% na temperatura de

453 K (180°C) resultou em 22,5% de xilose do bagaço e 21,5% da casca de arroz por 100 g de matéria seca.

Para prevenir ou minimizar a decomposição dos açúcares, principalmente às pentoses, é muito importante o emprego de soluções de ácidos diluídas, curto tempo de reação, baixas temperaturas e remoção rápida do agente hidrolítico (Gong *et al.*, 1981).

Nesse sentido, o objetivo principal desta pesquisa foi otimizar as condições de hidrólise seletiva do bagaço de cana-de-açúcar, empregando-se a metodologia de superfície de resposta.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Material

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido da Usina Açucareira Ester S. A., situada no município de Cosmópolis, no Estado de São Paulo. O bagaço foi lavado em água corrente, seco em estufa a 60°C até peso constante e triturado em moinho de faca. Em seguida foi passado em um conjunto de peneiras (Produtest) para uniformização do tamanho das partículas (32-20 mesh). A definição do tamanho das partículas foi obtida através de ensaios preliminares.

2.2.2. Hidrólise seletiva do bagaço de cana-de-açúcar

Amostras do bagaço (3,0 g de matéria seca) foram colocadas em frascos Erlenmeyer rosqueados de 125 mL e embebidos com uma solução de ácido sulfúrico na proporção de 1:5 (sólido/líquido). A definição da relação sólido/líquido foi obtida através de ensaios preliminares.

As amostras permaneceram a temperatura ambiente durante 15 horas. Após esse período, as mesmas foram colocadas em autoclave, onde foram submetidas à injeção direta de vapor saturado. A temperatura, durante a hidrólise, foi mantida constante devido a um sistema de controle eletrônico. As amostras foram submetidas às diferentes temperaturas, concentrações de H₂SO₄ e tempos de reação de acordo com delineamento experimental (**Tabelas 2.1 e 2.2**). O bagaço hidrolisado foi submetido à prensagem (Prensa hidráulica piloto, marca CARVER) para separação da fração hemicelulósica. Essa fração teve seu pH ajustado em 5,5 por adição de hidróxido de cálcio. O precipitado foi removido por centrifugação (2, 23 x 10⁴ g; 5°C; 15 minutos). A representação esquemática da obtenção do hidrolisado hemicelulósico é registrada na **Figura 2.1**.

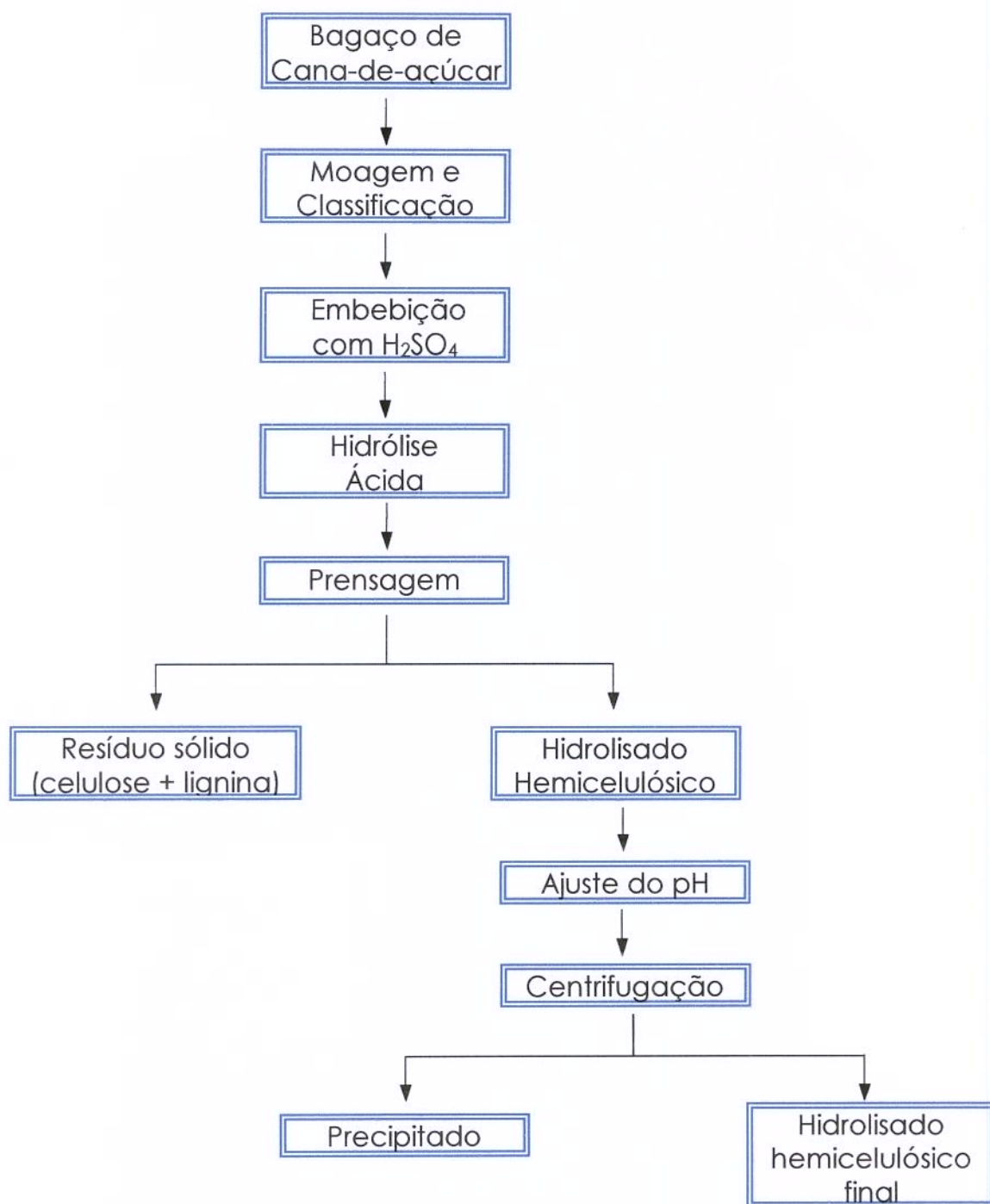


Figura 2.1: Obtenção do hidrolisado hemicelulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2.2.3. Métodos analíticos

2.2.3.1. Determinação da umidade do bagaço

O conteúdo de umidade no bagaço moído e classificado foi determinado em estufa marca FANEM, modelo 515 (105° C até peso constante), segundo o método 44-15 A da AACC (1995). Correções foram feitas para peso seco em todas amostras.

2.2.3.2. Determinação dos açúcares no hidrolisado

As concentrações dos açúcares (D-xilose, D-glicose e L-arabinose) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência–CLAE (cromatógrafo Shimadzu Co., modelo LC-10AD), equipado com detector de índice de refração RID-6A. Os açúcares foram separados em uma coluna RT-CH-CA Merck (300,0 x 6,5 mm) com a temperatura do forno a 80°C e usando água deionizada como eluente (fluxo = 0,5 mL/min), previamente degaseificada com hélio. Os padrões de D-xilose, D-glicose e L-arabinose utilizados foram da marca Merck e de grau cromatográfico.

2.2.4. Delineamento experimental

Para estudar os efeitos da temperatura e concentração de ácido sulfúrico na produção de monossacarídeos, utilizou-se um delineamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central (Box *et al.*, 1978; Barros Neto *et al.*, 1996). As variáveis foram estabelecidas com três níveis codificados como -1, 0, +1. Os valores reais correspondentes a esses níveis aparecem na **Tabela 2.1** e foram calculados segundo Box *et al.* (1978).

Esse delineamento apresentou ainda dois níveis de variáveis axiais codificados como $-\alpha$ e $+\alpha$. O valor de α é função do número de variáveis independentes ($k = 2$, no caso deste trabalho), sendo definido pela seguinte equação:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^2)^{1/4} = 1,414$$

As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável foram estabelecidas a partir de testes preliminares. O delineamento estatístico requer um número mínimo de tratamento. Neste experimento, foram usados 11 tratamentos, sendo quatro fatoriais (combinações dos níveis -1 e $+1$), quatro axiais (uma variável no nível $\pm \alpha$ e outra no nível 0), três centrais (as duas variáveis no nível 0). Os pontos centrais servem para estimar o erro experimental e determinar a precisão da equação polinomial (Cochran & Cox, 1964).

Na **Tabela 2.1**, apresentam-se os valores codificados e reais do delineamento experimental central rotacional composto para duas variáveis independentes e cinco níveis de variação. As respostas (Y) ou variáveis dependentes estudadas foram: produção de xilose, de glicose e arabinose.

2.2.5. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos em função das variáveis em estudo foram analisados pelo programa Statistica para Windows versão 5.0.

Tabela 2.1. Variáveis independentes com diferentes níveis a serem estudadas durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Variáveis	Símbolo	Níveis				
		$\alpha=-1,414$	-1	0	+1	$\alpha=+1,414$
Temperatura (°C)	A	111,5	114,0	120,0	126,0	128,5
H ₂ SO ₄ (%v/v)	B	0,20	0,70	1,90	3,10	3,60

2.3. Resultados e Discussão

Os resultados experimentais obtidos por hidrólise para produção de xilose, glicose e arabinose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, são apresentados nas **Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4**, respectivamente. Observa-se na **Tabela 2.2**, que a produção de xilose foi aumentada com o tempo. Tomando-se como exemplo o tratamento nº 7 (120°C e 3,6% de ácido sulfúrico), nota-se que a concentração de xilose liberada aumentou com o tempo de reação do processo: a 11 minutos (13,42 mg/g), a 18 (17,43 mg/g), a 30 (44,75 mg/g) e 50 minutos (80,52 mg/g), embora esses resultados tenham sido inferiores aos demais tratamentos.

Percebe-se na **Tabela 2.2** que nos menores tempos (11 e 18 minutos) os melhores rendimentos (240,24 e 266,73 mg de xilose/g do bagaço, b.s.) ocorreram no tratamento nº 4 (níveis superiores +1, +1), mostrando equilíbrio das variáveis independentes temperatura e concentração do H₂SO₄. Contudo, quando o tempo de hidrólise foi maior (30 e 50 minutos), os melhores rendimentos (277,84 e 264,71 mg de xilose/g do bagaço, b.s.) foram verificados no tratamento 3 (níveis +1 e -1), mostrando maior efeito da temperatura.

No tempo de 18 minutos (**Tabela 2.2**) de reação, o qual ocorreu maior rendimento de xilose em relação ao de 11 minutos e com maior economia de tempo e de energia, além de evitar a formação de produtos indesejáveis a partir dos açúcares formados, quando comparado aos tempos de 30 e 50 minutos; a xilose recuperada no tratamento nº 4 foi de 266,73 mg/g do bagaço seco. Esse resultado representa 96 % do máximo teórico e concorda com o reportado por Purchase (1995), além de ser superior aos relatados por Singh *et al.* (1984); Toit *et al.* (1984); e Morjanoff & Gray (1987).

É importante destacar que as condições de pré-tratamento aplicadas neste estudo foram suficientes para promoverem as primeiras reações importantes que ocorrem durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, que é a ruptura das ligações β- (1-4) entre as unidades de xilose da cadeia principal do polímero xilana (Fengel & Wegener, 1989). Tais condições podem ser consideradas moderadas

se comparadas àquelas empregadas por outros autores (Singh *et al.*, 1984; Pessoa Jr., 1991; Silva, 1995; Felipe *et al.*, 1997; Parajó *et al.*, 1998).

Tabela 2.2: Delineamento fatorial 2² com os valores codificados e os resultados experimentais obtidos por hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilose.

Número do Tratamento	Variáveis		Respostas (mg/g do bagaço, b.s.)			
	A	B	Xilose 11 min	Xilose 18 min	Xilose 30 min	Xilose 50 min
1	-1	-1	21,45	62,75	151,10	188,09
2	-1	1	95,40	254,63	266,90	264,39
3	1	-1	96,67	180,03	277,84	264,71
4	1	1	240,24	266,73	246,36	258,42
5	-1,414	0	84,18	140,32	211,41	253,44
6	1,414	0	227,56	260,03	269,21	250,46
7	0	-1,414	13,42	17,43	44,75	80,52
8	0	1,414	211,89	247,43	264,54	262,06
9	0	0	174,05	185,34	258,20	255,66
10	0	0	162,14	201,83	242,91	257,69
11	0	0	162,11	203,32	247,21	256,00

(A)-Temperatura; (B) – Ácido sulfúrico

Para a produção de glucose, verifica-se na **Tabela 2.3**, que o melhor resultado (40,09 mg de glucose/g do bagaço, b.s.), foi obtido com as variáveis independentes nos níveis superiores (+1, +1, tratamento nº 4), no tempo de 18 minutos de hidrólise. Esse resultado concorda com os reportados por Toit *et al.* (1984); Morjanoff & Gray (1987); Purchase (1995), os quais relatam valores de 38,9 a 44 mg de glicose/g do bagaço seco. Essa glicose liberada durante a hidrólise em condições moderadas originou-se possivelmente da celulose amorfa, a qual se hidrolisa numa velocidade bem superior a celulose cristalina, de acordo com Franzidis & Porteous (citados por Pessoa Jr., 1991).

Tabela 2.3: Delineamento fatorial 2² com os valores codificados e os resultados experimentais obtidos por hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de glicose.

Número do Tratamento	Variáveis		Respostas (mg/g do bagaço, b.s.)			
	A	B	Glicose 11 min	Glicose 18 min	Glicose 30 min	Glicose 50 min
1	-1	-1	16,29	16,75	17,95	19,97
2	-1	1	18,72	23,76	27,40	34,71
3	1	-1	18,98	20,68	31,92	27,35
4	1	1	32,22	40,09	23,05	39,82
5	-1,414	0	17,84	18,53	20,93	26,05
6	1,414	0	29,65	36,60	35,03	39,55
7	0	-1,414	0,00	0,00	0,00	16,24
8	0	1,414	24,34	34,00	28,90	36,01
9	0	0	21,37	23,10	29,49	30,71
10	0	0	21,97	25,10	26,56	34,32
11	0	0	20,56	24,50	27,50	38,59

(A)-Temperatura; (B) – Ácido sulfúrico

A liberação de arabinose, em diferentes tempos de hidrólise, apresentada na **Tabela 2.4**, não mostrou grandes variações a ponto de se justificar tempos excessivos para produção dessa pentose. Como já observado para xilose e glicose, o melhor rendimento (26,59 mg de arabinose/g do bagaço, b.s.) foi obtido nos níveis superiores (+1, +1, tratamento n° 4), com 18 minutos de reação. Esse resultado supera ao reportado por Toit *et al.* (1984), sendo, entretanto, inferior aos reportados por Morjanoff & Gray (1987) e Purchase (1995).

Tabela 2.4: Delineamento fatorial 2^2 com os valores codificados e os resultados experimentais obtidos por hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de arabinose.

Número do Tratamento	Variáveis		Respostas (mg/g do bagaço, b.s.)			
	A	B	Arabinose 11 min	Arabinose 18 min	Arabinose 30 min	Arabinose 50 min
1	-1	-1	19,28	20,70	24,30	22,81
2	-1	1	19,51	21,51	22,05	26,49
3	1	-1	19,22	17,57	22,90	21,38
4	1	1	24,45	26,59	17,75	25,92
5	-1,414	0	20,86	21,29	20,15	23,59
6	1,414	0	22,97	24,90	23,97	26,38
7	0	-1,414	15,81	18,18	20,17	16,28
8	0	1,414	21,81	25,04	21,10	25,93
9	0	0	21,41	21,60	21,21	23,09
10	0	0	19,95	21,89	19,28	24,94
11	0	0	20,99	21,42	20,22	28,71

(A)-Temperatura; (B) – Ácido sulfúrico

Às análises de variância (ANOVA) dos modelos de regressão elaborados a partir dos resultados para produção de xilose nos tempos de reação de 11, 18, 30 e 50 minutos são indicados nos **Anexos 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4**, e mostraram coeficientes de determinação de 0,9757; 0,9718; 0,8049 e 0,7707, respectivamente. Embora esses coeficientes de determinação (R^2) signifiquem que os modelos apresentados expliquem 97,57%; 97,18%; 80,49% e 77,07%, da variância para a concentração de xilose, nos respectivos tempos, há contudo, necessidade de analisar-se outros parâmetros estatísticos.

Observa-se que as regressões nos tempos de 11 e 18 minutos (**Anexos 2.1 e 2.2**) foram altamente significativas ($p \leq 0,05$) e os resíduos não apresentaram evidência de falta de ajuste. Este fato autoriza a utilização das equações do modelo (**Anexos 2.1 e 2.2**) com fins preditivos, já que de acordo com Box & Wetz (1973), para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil com fins de predição de resultados, o valor da razão QM_R/QM_r deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes ao valor de F_t . Esta condição foi

plenamente satisfeita nos tempos de hidrólise de 11 e 18 minutos, o que significa que o modelo quadrático, no nível de 95 % de confiança, é adequado para descrever a superfície de resposta nas regiões estudadas.

As **Figuras 2.2 e 2.3** apresentam os diagramas da superfície de resposta que mostram a variação da concentração de xilose em função das variáveis independentes (temperatura e concentração de ácido sulfúrico). Na **Figura 2.2** nota-se que a concentração de xilose aumentou com o aumento da temperatura e concentração do ácido. Verifica-se ainda que nesse tempo, a faixa é bastante limitada e exige temperatura elevada e alta concentração de ácido.

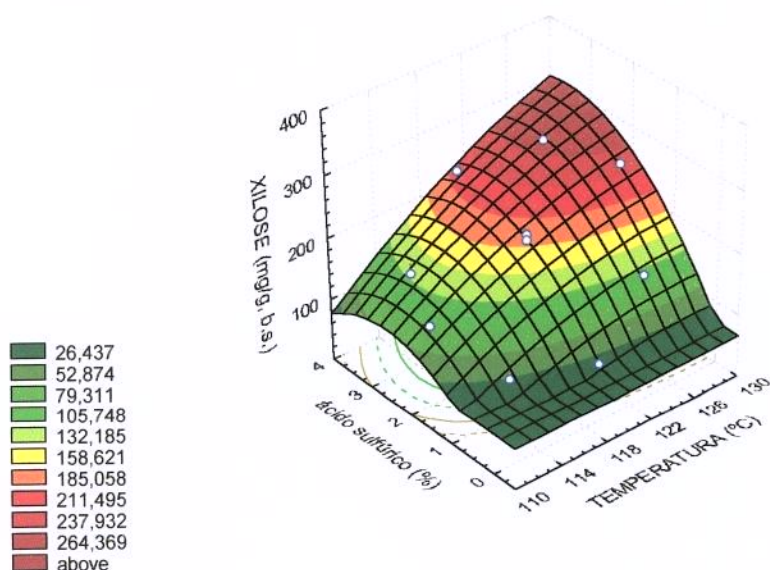


Figura 2.2: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 11 minutos de hidrólise.

Na **Figura 2.3** nota-se que maiores concentrações de ácido sulfúrico são requisitadas para se alcançar melhores rendimentos de xilose, enquanto a temperatura mostrou pouca influência na faixa estudada.

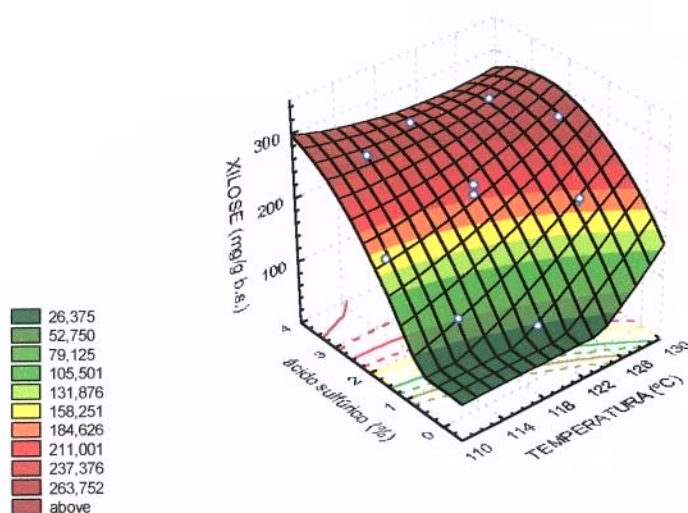


Figura 2.3: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 18 minutos de hidrólise.

Por outro lado, as regressões correspondentes aos tempos de 30 e 50 minutos (**Anexos 2.3 e 2.4**) não foram significativas ($p \geq 0,05$) e os resíduos apresentaram evidente falta de ajuste, notadamente a análise de regressão no tempo de 50 minutos ($F_c = 2\,010,81$ e $F_t = 19,16$). Tais condições levam a concluir que as equações do modelo descritas nos **Anexos 2.3 e 2.4** não foram úteis com fins de predição de resultados e, portanto, o modelo não pode ser utilizado para prever a resposta de xilose nas regiões estudadas.

As análises de superfície de resposta relacionadas com a produção de xilose nos tempos de 30 e 50 são apresentadas nas **Figuras 2.4 e 2.5**. Aqui, como já observado no tempo de 18 min, visualiza-se o efeito do ácido quando em maiores concentrações. Por outro lado, os resultados foram melhores quando a temperatura foi mínima no intervalo estudado, levando-nos a concluir que tempo e temperatura elevadas foram os principais efeitos responsáveis pelo decréscimo da concentração de xilose. Essa observação coincide com as de outros autores, que afirmaram a decomposição de xilose para furfural em condições de pré-tratamento drásticas (Magee & Kosaric, 1985; Grosh & Singh, 1993; Singh & Mishra, 1995c).

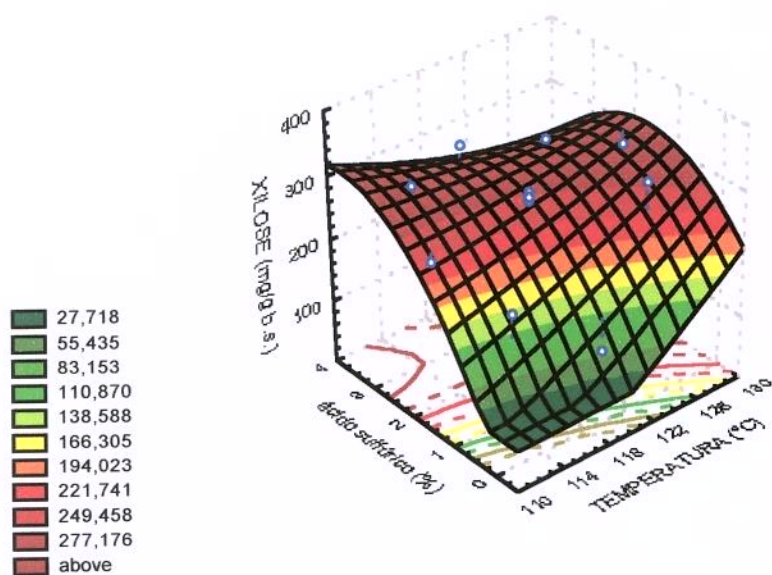


Figura 2.4: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 30 minutos de hidrólise.

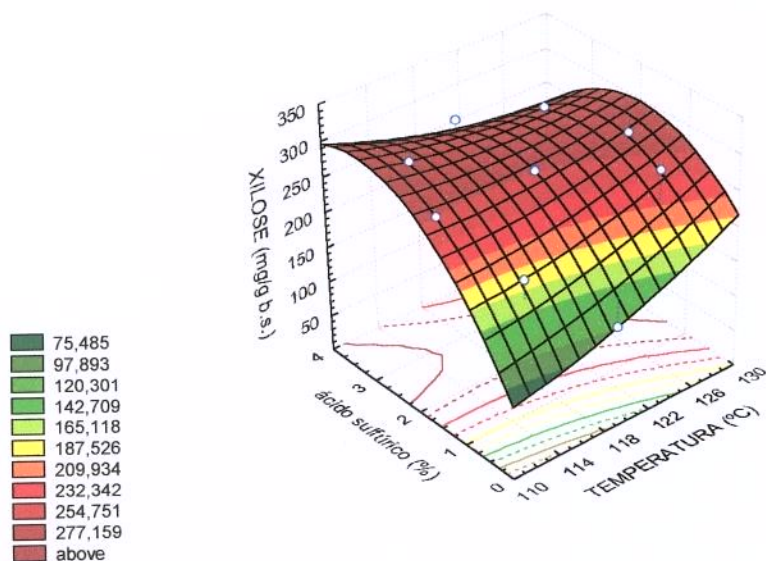


Figura 2.5: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 50 minutos de hidrólise.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



De acordo com a análise de significância (**Anexo 2.5**), verifica-se que a produção de xilose foi influenciada significativamente pelo o efeito linear da temperatura, da concentração do ácido sulfúrico e da interação de ambas variáveis em todos os tempos estudados. O efeito quadrático da concentração do H_2SO_4 também foi significativo ($p \leq 0,05$) nos quatro tempos analisados, enquanto esse efeito para temperatura só foi significativo no tempo de reação de 50 minutos.

Como já observado, em todos os tempos analisados o efeito do H_2SO_4 ocorreu, de forma crescente. Ao contrário, a variável temperatura perdeu gradativamente importância à medida que o tempo de hidrólise foi maior, fato que foi observado por Pessoa Jr. (1991). Este pesquisador notou que a temperatura teve pouca influência na recuperação de ART quando da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Os melhores resultados foram obtidos a 140°C , enquanto que as temperaturas de 150°C e 180°C mostraram ser as responsáveis pela queda acentuada na recuperação dos açúcares redutores (Pessoa Jr., 1991).

Nas **Figuras 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9** visualizam-se melhor a estimativa dos efeitos lineares, quadráticos e a interação das variáveis independentes, ao nível de 95 % de confiança, na produção de xilose nos tempos de 11, 18, 30 e 50 minutos, respectivamente.

Nos histogramas das **Figuras 2.6, 2.7 e 2.8** os efeitos lineares de H_2SO_4 e temperatura, efeito quadrático da concentração do ácido, além da interação linear dessas variáveis foram significativos, enquanto o efeito quadrático da temperatura não foi significativo. De outra parte, no histograma da **Figura 2.9** apenas o efeito linear da concentração do H_2SO_4 foi significativo.

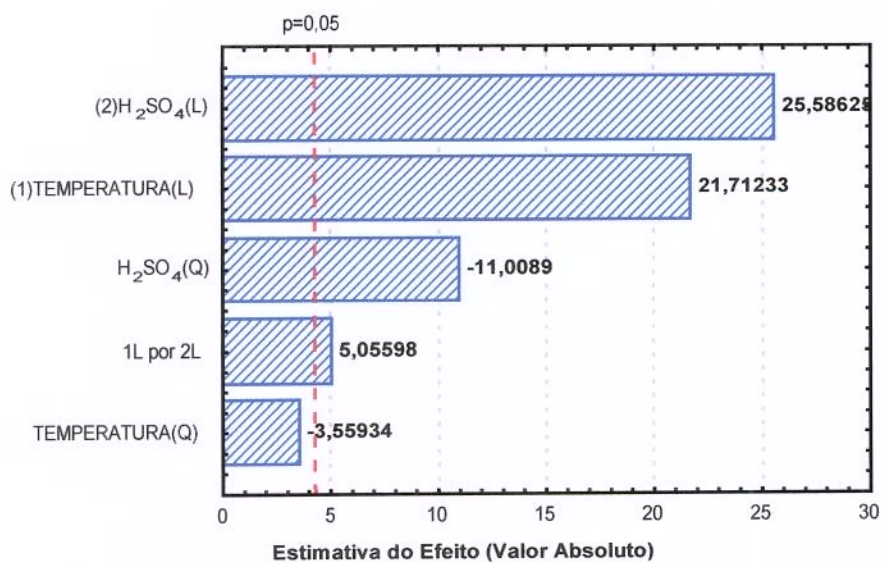


Figura 2.6: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 11 min de hidrólise.

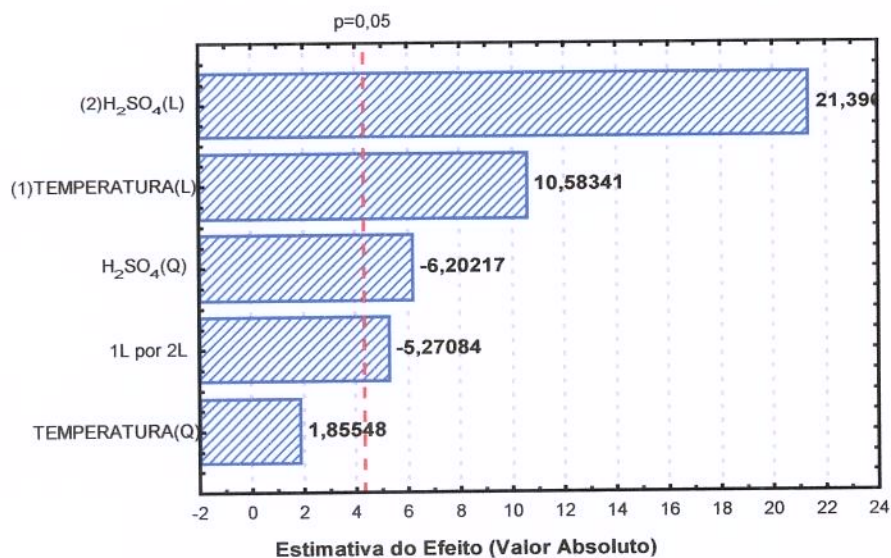


Figura 2.7: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 18 min de hidrólise.

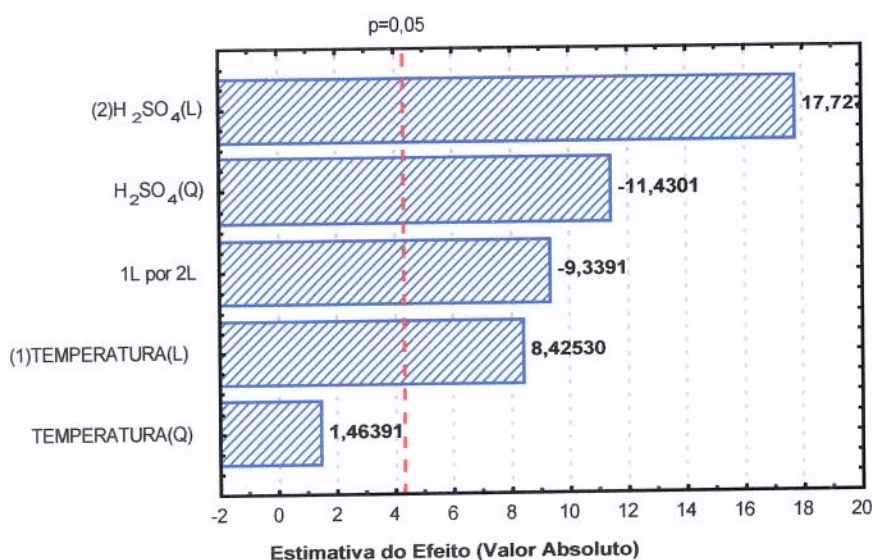


Figura 2.8: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 30 min de hidrólise.

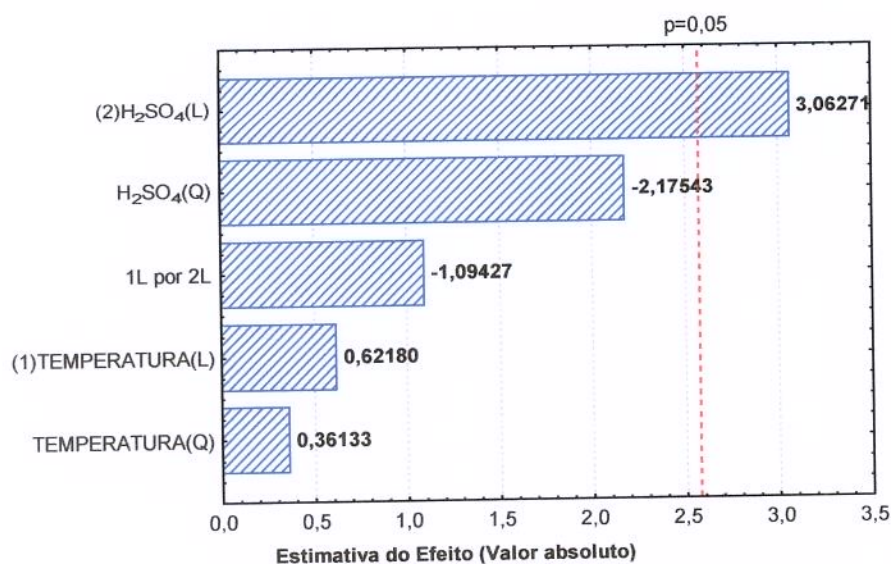


Figura 2.9: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e da concentração do ácido sulfúrico na produção de xilose do bagaço de cana-de-açúcar, a 50 min de hidrólise.

2.4. Conclusões

A combinação de duas variáveis independentes (temperatura e concentração ácido sulfúrico) visando a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de monossacarídeos (xilose, arabinose e glicose) mostrou ser efetiva tendo em vista os resultados alcançados.

O total de açúcares, nas melhores condições (tempo de reação: 18 minutos; 126°C e 3,10 % (v/v) de ácido sulfúrico), foi de 333,41 mg/g do bagaço, b.s., composto por 266,73 mg de xilose, 40,09 mg e 26,59 mg de arabinose/g do bagaço, b.s. Para anidroxilana, os resultados representaram 96,0% do máximo teórico, enquanto para glicose foi cerca de 100,0 % da composição da hemicelulose do bagaço.

Em todos os quatro tempos de hidrólise (11, 18, 30 e 50 minutos), observou-se maior efeito do ácido sulfúrico, contudo nos maiores tempos (30 e 50 minutos), esse efeito se mostrou mais evidente.

As regressões nos tempos de 11 e 18 minutos foram altamente significativas ($p \leq 0,05$) e os modelos não apresentaram evidência de falta de ajuste. O valor de F_c foi cerca de 8 vezes maior que o F_t para o tempo de 11 minutos e para 18 minutos essa razão foi de 6,83. Isso significa que o modelo quadrático, no nível de 95,0% de confiança, foi adequado para descrever a superfície de resposta nas regiões estudadas.

As regressões nos tempos de 30 e 50 minutos não foram significativas ($p \geq 0,05$) e os resíduos apresentaram evidente falta de ajuste, notadamente à análise de regressão no tempo de 50 minutos ($F_c=2010,81$ e $F_t=19,16$). Tais condições levam a concluir que os tempos de 30 e 50 minutos de hidrólise não foram úteis com fins preditivos e, portanto, o modelo não pode ser utilizado para prever a resposta da concentração de xilose na região estudada.

Os parâmetros mais adequados para otimização do processo de hidrólise foram estabelecidos com 18 minutos de reação e refere-se ao tratamento nº 4 (níveis +1 e +1) para concentração de ácido sulfúrico e temperatura.

2.5. Referências Bibliográficas

- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the AACC**, 8 ed. Saint Paul, v. 1-2, 1995.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed. Unicamp. Campinas São Paulo, Brasil, 1996, 299 p.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**: an introduction to design, data analysis, and model building. New York: Wiley and Sons, 1978, 653 p.
- BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function, University of Wisconsin. **Tecnial Report**. v. 9, 1973.
- COCHRAN, B. Y.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2 ed. New York: John Wiley, 1964.
- DEKKER, R F. H.; WALLIS, F. A. Enzymatic saccharification of sugar cane bagass pretreated by autohydrolysis-steam explosion. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 25, n. 12, p. 3027-3048, 1983.
- DUNNING, J. W.; LATHROP, E. C. The saccharification of agricultural residues. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, n.1, p. 24-29, 1945.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Production Yearbook**. Roma, 1995, v. 49.
- FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.4, p.251-254, 1997.
- FENGEL, D.; WENEGER, G. (eds.) **Wood-Chemistry Ultrastructure Reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, p. 610, 1989.

- GHOSH, P. ; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic - microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 295-333, 1993.
- GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Conversion of hemicellulose carbohydrates. **Advances Biochemical Engineering**, v. 20, p. 93-118, 1981.
- KERN, M.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; HALTRICH, D. Effect of nitrogen sources on the levels of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in the xylose-fermenting yeast *Candida tenuis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 2, p. 196-202, 1998.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.
- LADISCH, M. R. Fermentable sugars from cellulosic residues. **Process Biochemistry**, v. 14, n. 1, p. 21-25, 1979.
- MAGEE, R. J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 32, p. 61-93, 1985.
- McDOUGALL, G.J.; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 62, n. 1, p. 1-20, 1993.
- MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugar cane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 29, n. 6, p. 733-741, 1987.
- PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 59, n. 4, p. 501-506, 1998.

- PESSOA JUNIOR, A. Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1991, 187 p.
- PURCHASE, B. S. Products from sugarcane. **International Sugar Journal**, v. 97, n. 1154, p. 70-72, 77-81, 1995.
- RASUL, M. G.; RUDOLPH, V. Fluidized bed combustion of Australian bagasse. **Fuel**, v. 79, p. 123-130, 2000.
- RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 73-77, 1998.
- SASKA, M.; OZER, E. Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 45, n. 6, p. 517-523, 1994.
- SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. Tese de Doutorado. Instituto de Química - UNICAMP, Campinas-SP, 1995, 106 p.
- SINGH, A.; DAS, K.; SHARMA, D. K. Production of xylose, furfural, fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, v. 34A, n. 2, p. 51-61, 1984.
- SINGH, A.; MISHRA, P. Extraction of pentosans from lignocellulosic materials. In: SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995b, chap. 3, p. 71-98. (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).
- SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial production of xylitol. In: SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995c, chap. 10, p. 273-299. (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).

- SINGH, A.; MISHRA, P. Overview of problems and potential. In: SINGH, A. ; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995a, chap. 1, p. 1-31 (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).
- TOIT, P. J.; OLIVIER, S. P.; BILJON, P. L. V. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and aminoacid composition. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1071-1078, 1984.
- TSAO, G. T. Cellulosic material as a renewable resource. **Process Biochemistry**. v. 13, n.10, p.12-14, 1978.
- ZYL, C. V.; PRIOR, B. A.; Du PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, p. 357-369, 1988.

2.6. Anexos

Anexo 2.1: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 11 minutos de hidrólise.

$$\text{Xilose (mg/g)} = -4632,47 + 72,796*A - 0,286*A^2 - 154,25*B - 22,097*B^2 + 2,42*A*B$$

$$R^2 = 0,9757$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	60.340,11	5	12.068,02	40,21	5,05
Resíduo	1.504,99	5	300,10		
Falta de Ajuste	1.410,19	3	470,06	9,92	19,16
Erro Puro	94,80	2	47,40		
Total	61.845,10	10	-		

Anexo 2.2: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 18 minutos de hidrólise.

$$\text{Xilose (mg/g)} = 1542,69 - 38,66*A + 0,216*A^2 + 569,70*B - 18,043*B^2 - 3,65*A*B$$

$$R^2 = 0,9718$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	64.818,08	5	12.963,61	34,49	5,05
Resíduo	1.879,26	5	375,85		
Falta de Ajuste	1.680,12	3	560,04	5,62	19,16
Erro Puro	199,14	2	99,57		
Total	66.697,34	10	-		

Anexo 2.3: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 30 minutos de hidrólise.

$$\text{Xilose (mg/g)} = 379,60 - 18,68*A + 0,135*A^2 + 754,66*B - 26,28*B^2 - 5,11*A*B$$

$$R^2 = 0,8049$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	39.096,79	5	7.819,36	4,12	5,05
Resíduo	9.477,38	5	1.895,48		
Falta de Ajuste	9.353,03	3	3.117,68	50,15	19,16
Erro Puro	124,35	2	62,17		
Total	48.574,17	10	-		

Anexo 2.4: Análise de variância para modelo de regressão de produção de xilose obtida por análise de superfície de resposta, no tempo de 50 minutos de hidrólise.

$$\text{Xilose (mg/g)} = 1575,72 - 31,33*A + 0,159*A^2 + 469,10*B - 23,93B^2 - 2,87*A*B$$

$$R^2 = 0,7707$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	23.929,13	5	4.785,83	3,36	5,05
Resíduo	7.120,63	5	1.424,13		
Falta de Ajuste	.118,27	3	2.372,76	2010,81	19,16
Erro Puro	2,36	2	1,18		
Total	31.049,76	10	-		

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Meios de culturas empregados nas etapas (primeira,segunda e terceira) de seleção dos microrganismos.....	99
Tabela 3.2: Consumo de D-xilose e formação de xilitol e etanol por várias linhagens de leveduras, com 48 h de fermentação em meio sintético (continua).....	103
Tabela 3.2: (continuação) Consumo de D-xilose e formação de xilitol e etanol por várias linhagens de leveduras, com 48 h de fermentação em meio sintético.....	104
Tabela 3.3: Produção, rendimento e produtividade de xilitol, em valores médios, obtidos por 10 leveduras, durante 48 horas de fermentação, em meio sintético.....	106
Tabela 3.4: Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol, em valores médios, obtidos por 8 leveduras, durante 72 horas de fermentação, em meio contendo hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.....	107
Tabela 3.5: Produção de etanol, biomassa e pH, em valores médios, obtidos por 8 leveduras, durante 72 horas de fermentação, em hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Distribuição da porcentagem de linhagens durante 48 horas de fermentação por intervalo de produção de xilitol (g/L).....	101
---	-----

Resumo

A conversão de D-xilose em meio sintético e em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar para xilitol, por 50 linhagens de leveduras, foi conduzida em três etapas. Os resultados foram os seguintes: na primeira etapa duas leveduras (T-12 e *Pichia stipilis* CCT 2617) mostraram boa capacidade de conversão de xilose em etanol. As leveduras (LGY 33, LGY34, LGY 42 e LGY 45) apresentaram bom desempenho nas fases iniciais de seleção quando se utilizou meio sintético (0,53; 0,53; 0,45; e 0,48 g/g de xilose, respectivamente). Na terceira fase de seleção, tendo o hidrolisado hemicelulósico como substrato, essas leveduras não apresentaram resultados satisfatórios. Na terceira etapa, *Candida tropicalis* IZ 1824 e *Candida tropicalis* IFO 0618 foram mais efetivas para produção de etanol (7,17 g/L) e biomassa (7,02 g/L), respectivamente. Nas duas primeiras etapas a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 apresentou conversão de xilose em xilitol com rendimento considerado mediano (0,39 e 0,59 g/g). Na terceira etapa, entretanto, seu rendimento (0,72 g/g) foi igualado apenas pela levedura *Candida guilliermondii* IZ 1422 (0,71 g/g). Sua produção (22,85 g/L) e produtividade (0,31 g/L.h) foram estatisticamente ($p \leq 0,05$) diferentes daqueles obtidos com outras linhagens. Adicionalmente, *Candida parapsilosis* IZ 1710 foi o microrganismo que produziu a menor quantidade de etanol (4,83 g/L) e uma das menores produções de biomassa (4,71 g/L). O estudo mostrou que entre 50 linhagens de leveduras testadas quanto à capacidade de produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, *Candida parapsilosis* IZ 1710 foi a que apresentou melhor produção, rendimento e produtividade.

Palavras-chave: seleção de leveduras; hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar; D-xilose; xilitol; *Candida parapsilosis* IZ 1710.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Capítulo 3

3.1. Introdução

Xilitol é um álcool pentahidroxilado presente na natureza. Esse poliol é um produto intermediário comum de carboidratos em microrganismos, seres humanos e nos animais, sendo também encontrado em muitas frutas e hortaliças. A extração dessas fontes é difícil e não econômica devido a sua baixa concentração (Emodi, 1978; Singh & Mishra, 1995; Parajó *et al.*, 1996).

Atualmente tem aumentado o uso de xilitol em alimentos e fármacos devido a suas propriedades físico-químicas e tecnológicas, incluindo o seu alto poder adoçante e suas propriedades anticariogênicas (Wäller *et al.*, 1992; Aguirre-Zero *et al.*, 1993; Roberto *et al.*, 1995b; Felipe *et al.*, 1996).

A produção de xilitol por processo químico tem sido considerada onerosa devido às etapas de separação e purificação. Por isso, tem-se proposto a exploração de métodos usando microrganismos (Preez, 1994). Esse processo oferece algumas vantagens em relação ao processo químico, principalmente por não necessitar de uma solução de xilose de alta pureza, já que a bioconversão ocorre no próprio hidrolisado hemicelulósico e de forma seletiva.

Abundantes quantidades de xilitol podem ser produzidas a partir de D-xilose, por espécies de leveduras, selecionadas através da hidrogenação biológica, a qual resulta na secreção extracelular desse poliol como metabólico principal (Lu *et al.*, 1995).

As espécies de leveduras mais conhecidas como produtoras de xilitol, incluem aquelas pertencentes ao gênero *Candida*. Entre essas, *Candida guilliermondii* tem mostrado habilidade para a produção de xilitol com bom rendimento e produtividade (Barbosa *et al.*, 1988; Meyrial *et al.*, 1991; Roberto *et al.*, 1991; Felipe *et al.*, 1993; Nolletau *et al.*, 1993; Roberto *et al.*, 1995ab; Gurgel *et al.*, 1995; Nolletau *et al.*, 1995; Felipe *et al.*, 1996; Pfeifer *et al.*, 1996; Rodrigues, 1997; Felipe *et al.*, 1997; Mayerhoff *et al.*, 1997; Dominguez *et al.*, 1999).

Outras leveduras também têm demonstrado capacidade de metabolizar xilose para xilitol, tais como *Candida sp* (Chen & Gong, 1985); *Candida tropicalis* (Horitsu

et al., 1992; Yahashi *et al.*, 1996; Paiva *et al.*, 1998); *Candida mogii* (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995; Mayerhoff *et al.*, 1997); *Candida parapsilosis* (Furlan *et al.*, 1991; Nolletau *et al.*, 1993; Furlan *et al.*, 1994; Nolletau *et al.*, 1995; Preziosi-Belloy, 1997; Mayerhoff *et al.*, 1997); *Pachysolen tannophilus* (Furlan *et al.*, 1994; Roebuck *et al.*, 1995); *Debaryomyces hansenii* (Parajó *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1999; Girio *et al.*, 2000); *Candida sp.* 11-2 (Dominguez *et al.*, 1996); *Candida sp.* L-102 (Lu *et al.*, 1995); *Candida shehatae* (Preez *et al.*, 1986; Furlan *et al.*, 1994; Hinfray *et al.*, 1995); *Pichia stipitis* (Preez *et al.*, 1986; Furlan *et al.*, 1994; Mahler & Guebel, 1994); *Candida boidinii* (Winklenhausen *et al.*, 1996).

Gong *et al.* (1983), testaram 20 linhagens pertencentes ao gênero *Candida* de 11 diferentes espécies quanto à capacidade de converterem xilose em xilitol. Todas as linhagens de *Candida* converteram D-xilose em xilitol, mas o rendimento foi considerado apenas moderado (10-15%).

A capacidade de conversão de D-xilose em xilitol de 44 linhagens de 5 diferentes gêneros de levedura foi também avaliado por Barbosa *et al.* (1988). Os resultados indicaram que as melhores espécies produtoras de xilitol foram: *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis*. As linhagens dessas espécies tiveram a vantagem de apresentar conversão rápida e eficiente, porém *Candida guilliermondii* apresentou uma outra vantagem que foi a de produzir etanol em baixa quantidade. Essa levedura produziu 77,2 g/L de xilitol a partir de 104,0 g/L de D-xilose, o que representou 81,0% de rendimento, considerando-se o valor teórico.

A seleção de microrganismos (leveduras e fungos filamentosos) produtores de xilitol utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato também foi pesquisado por Pessoa Jr. (1991). O critério de seleção baseou-se no consumo de ART e aumento da massa celular. Aquele autor concluiu que das 22 linhagens testadas, a que apresentou melhor capacidade de crescimento no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar foi *Candida tropicalis* IZ 1824.

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar a capacidade de linhagens de leveduras para produzirem xilitol a partir de D-xilose e de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Preparação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar

As melhores condições de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foram previamente definidas no **Capítulo 2** e de acordo com Paiva *et al.* (1999). Amostras do bagaço (25 g de matéria seca) foram colocadas em frascos Erlenmeyer rosqueados de 500 mL e embebidos com 150 mL de solução de ácido sulfúrico (3,1 % v/v) na proporção de 1:6 (sólido:líquido). As amostras permaneceram à temperatura ambiente durante 15 horas. A seguir, as amostras foram autoclavadas (114°C, 30 min). O bagaço hidrolisado foi submetido à prensagem (Prensa hidráulica piloto, marca CARVER) para separação da fração hemicelulósica. Essa fração teve seu pH ajustado em 5,2 por adição de Ca(OH)_2 . O precipitado (CaSO_4) foi separado por centrifugação (2, 23×10^4 g; 5° C; 15 min).

3.2.2. Microrganismos

Os microrganismos empregados neste trabalho foram provenientes da Coleção de Culturas do Laboratório Geral do Departamento de Ciência-FEA-UNICAMP (linhagens isoladas e ainda não identificadas), do Instituto Zimotécnico da ESALQ - USP (Piracicaba-SP), da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”-Campinas-SP e do “Institute for Fermentation”, Osaka-Japão. A maioria desses microrganismos (**Tabela 3.2**) foi objeto de pesquisas visando testar sua capacidade de utilizarem pentoses e hexoses como fonte de carbono para crescimento celular, produção de etanol e de xilitol (Barbosa *et al.*, 1988; Pessoa Jr., 1991; Horitsu *et al.*, 1992; Mayerhoff *et al.*, 1997; Baiocco *et al.*, 1999).

3.2.3. Preservação das culturas

As culturas foram preservadas em tubos inclinados contendo o meio YM agar (0,5 % de peptona, 0,3 % de extrato de levedura, 0,3 % de extrato de malte, 1,0 % de glicose e 2,0 % de agar), a 4°C.

3.2.4. Preparo do inóculo

As culturas estocadas em tubos inclinados foram inoculadas em meio contendo: 0,3 % de peptona, 0,3 % de extrato de levedura, 1,5 % de glicose e 0,5 % de xilose. As condições de cultivo foram: agitação de 200 rpm, a 30°C por 24 horas. Em seguida, a solução de inóculo foi utilizada na proporção 10 % (v/v.) para fermentação.

3.2.5. Condições de fermentação

Na primeira etapa da fermentação foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL do meio constante da **Tabela 3.1**. As condições de fermentação foram: agitação de 200 rpm, a 30°C por 48 horas.

Um segundo ensaio foi realizado com 40 g/L de D-xilose como fonte de carbono e mantendo-se as demais condições da primeira etapa (**Tabela 3.1**).

A terceira etapa foi realizada com hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar suplementado com sais, conforme **Tabela 3.1**. As condições de fermentação foram as mesmas empregadas nas etapas anteriores, exceto para o tempo de fermentação que foi de 72 h.

Tabela 3.1: Meios de culturas empregados nas etapas (primeira,segunda e terceira) de seleção dos microrganismos.

Componente	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa
	Concentração (g/L)		
Extrato de levedura	3,00	3,00	3,00
Peptona	3,00	3,00	3,00
KH ₂ PO ₄	-	-	2,00
(NH ₄ PO ₄)	-	-	2,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	1,00
Xilose	20,00	40,00	34,04(1)
Glicose	-		5,92(1)
Arabinose	-		3,88(1)
pH	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2

(1) hidrolisado hemicelulósico.

3.2.6. Determinação dos açúcares, xilitol e etanol

As concentrações dos açúcares (xilose, glicose, arabinose, xilitol e etanol) foram determinadas de acordo com o item 2.2.3.2, do Capítulo 2.

3.2.7. Determinação da massa celular (MCS)

O crescimento celular foi determinado gravimetricamente: 10 mL de amostras foram coletadas, centrifugadas (2,23x10⁴ g; 5°C; 20 min); lavadas duas vezes com solução salina e centrifugadas novamente. A massa celular foi transferida para placas de Petri (50 mm de Ø), taradas e secas em estufa a 105°C. A massa celular foi seca em estufa a 55°C, resfriada em dessecador e pesada até peso constante.

3.2.8. Determinação dos parâmetros fermentativos

O fator de conversão de xilose em xilitol, e a produtividade de xilitol, foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

3.2.8.1. Fator de conversão de xilose em xilitol

$$Y_{p/s} = Mp/Ms$$

3.2.8.2. Produtividade volumétrica de xilitol

$$Q_{pv} = Mp/\Delta t_f$$

3.2.8.3. Eficiência de conversão

$$\eta = (Y_{p/s}/0,917).100$$

De acordo com Barbosa *et al.*, (1988) para cada 1,0 g de xilose consumida, 0,917 g de xilitol é formada (rendimento teórico).

3.2.9. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey através do programa Statistica para Windows versão 5.0 (1995).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Primeira etapa de seleção

O processo de seleção foi conduzido em três etapas. Na primeira, o critério adotado foi baseado na produção e rendimento de xilitol. Essa etapa foi realizada com 50 linhagens (**Tabela 3.2**), das quais 8 eram identificadas e serviram de referência as demais. Das 50 leveduras analisadas, com 48 horas de fermentação, 84 % delas apresentaram produção de xilitol entre 0 e 5 g/L, enquanto nas demais (16 %) a produção situou-se entre 5 e 10 g/L, conforme se observa na **Figura 3.1**.

Das 50 linhagens avaliadas, apenas 19 (38 %) foram capazes de converter xilose em etanol, embora em pequena quantidade. Entretanto, observa-se que duas leveduras (T-12 e *Pichia stipitis* CCT 2617) destacaram-se pela capacidade de converter xilose para etanol. Essa característica da levedura *Pichia stipitis* também foi verificada por outros pesquisadores (Barbosa *et al.*, 1988; Van Zyl *et al.*, 1988; Roberto *et al.*, 1991).

Por outro lado, verifica-se ainda (**Tabela 3.2**) que 4 linhagens isoladas em nosso laboratório (LGY33, LGY34, LGY42 e LGY 45) destacaram-se pela capacidade de acumularem xilitol em níveis superiores às leveduras citadas na literatura como produtoras de xilitol, a exemplo de *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* (Gong *et al.*, 1983; Barbosa *et al.*, 1988; Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995; Mayerhoff *et al.*, 1997). Os rendimentos de *Candida tropicalis* IFO 0618, *Candida guilliermondii* IZ 1422, *Candida parapsilosis* IZ 1710 e *Candida tropicalis* IZ 1824 foram inferiores aos das linhagens LGY 34, LGY 33, LGY 45 LGY42 e também aos citados na literatura (Pessoa Jr., 1991; Horitsu *et al.*, 1992; Mayerhoff *et al.*, 1997).

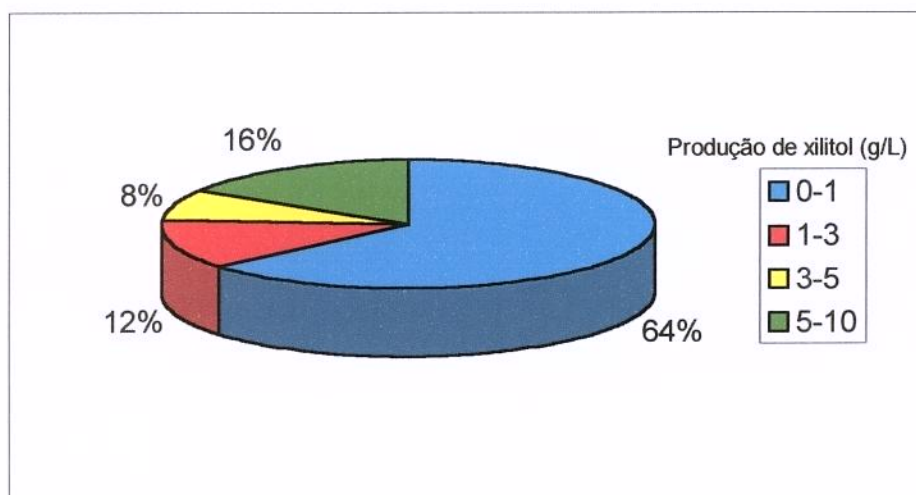


Figura 3.1: Distribuição da porcentagem de linhagens durante 48 horas de fermentação por intervalo de produção de xilitol (g/L).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

0 01 1 24



Tabela 3.2: Consumo de D-xilose e formação de xilitol e etanol por várias linhagens de leveduras, com 48 h de fermentação em meio sintético (continua).

Leveduras	Xilose M _S (g/L)	Xilitol		Etanol	
		M _{P1} (g/L)	Y _{p1/s} (g/g)	M _{P2} (g/L)	Y _{p2/s} (g/g)
LGY34	19,73	10,44	0,53	0,88	0,04
LGY33	19,54	10,12	0,53	1,65	0,08
LGY45	16,91	8,20	0,48	n.d.	-
LGY42	17,88	8,11	0,45	2,42	0,13
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	20,00	7,31	0,37	1,90	0,09
<i>C. guilliermondii</i> IZ 1422	16,51	6,77	0,41	n.d.	-
LGY7	10,78	5,86	0,54	n.d.	-
<i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	14,08	5,52	0,39	n.d.	-
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	18,51	4,72	0,25	1,12	0,06
LGY37	15,85	4,37	0,28	1,37	0,09
LGY38	15,96	4,30	0,27	0,89	0,05
T-12	14,93	3,23	0,22	6,99	0,47
LGY39	16,19	2,56	0,16	2,25	0,14
LGY19	15,53	2,09	0,13	1,12	0,07
LGY43	12,03	1,47	0,12	2,79	0,23
LGY32	7,53	1,21	0,16	n.d.	-
E 05	2,89	1,17	0,40	0,88	0,30
LGY31	7,17	1,02	0,14	n.d.	-
E 25	6,16	0,97	0,16	0,76	0,12
E 20	7,29	0,93	0,13	0,73	0,10
061	4,98	0,88	0,18	n.d.	-
<i>Pichia stipilis</i> CCT 2617	19,78	0,84	0,04	5,88	0,30
<i>P. tannophilus</i> CCT 1891	16,34	0,81	0,05	2,06	0,13
LGY18	2,80	0,59	0,21	n.d.	-
5.2L15	1,97	0,54	0,27	n.d.	-

n.d.: não detectado.

Tabela 3.2: Consumo de D-xilose e formação de xilitol e etanol por várias linhagens de leveduras, com 48 h de fermentação em meio sintético (continua).

Leveduras	Xilose M _S (g/L)	Xilitol		Etanol	
		M _{P1} (g/L)	Y _{p1/s} (g/g)	M _{P2} (g/L)	Y _{p2/s} (g/g)
LGY34	19,73	10,44	0,53	0,88	0,04
LGY33	19,54	10,12	0,53	1,65	0,08
LGY45	16,91	8,20	0,48	n.d.	-
LGY42	17,88	8,11	0,45	2,42	0,13
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	20,00	7,31	0,37	1,90	0,09
<i>C. guilliermondii</i> IZ 1422	16,51	6,77	0,41	n.d.	-
LGY7	10,78	5,86	0,54	n.d.	-
<i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	14,08	5,52	0,39	n.d.	-
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	18,51	4,72	0,25	1,12	0,06
LGY37	15,85	4,37	0,28	1,37	0,09
LGY38	15,96	4,30	0,27	0,89	0,05
T-12	14,93	3,23	0,22	6,99	0,47
LGY39	16,19	2,56	0,16	2,25	0,14
LGY19	15,53	2,09	0,13	1,12	0,07
LGY43	12,03	1,47	0,12	2,79	0,23
LGY32	7,53	1,21	0,16	n.d.	-
E 05	2,89	1,17	0,40	0,88	0,30
LGY31	7,17	1,02	0,14	n.d.	-
E 25	6,16	0,97	0,16	0,76	0,12
E 20	7,29	0,93	0,13	0,73	0,10
061	4,98	0,88	0,18	n.d.	-
<i>Pichia stipitis</i> CCT 2617	19,78	0,84	0,04	5,88	0,30
<i>P. tannophilus</i> CCT 1891	16,34	0,81	0,05	2,06	0,13
LGY18	2,80	0,59	0,21	n.d.	-
5.2L15	1,97	0,54	0,27	n.d.	-

n.d.: não detectado.

3.3.2. Segunda etapa de seleção

De acordo com a análise preliminar, optou-se pela realização da segunda etapa de seleção envolvendo 10 linhagens (LGY 33, LGY 34, LGY 42 LGY45, *Candida tropilacalis* IFO 0618, *Candida guilliermondii* IZ 1422, *Candida parapsilosis* IZ 1710, *Candida tropicalis* IZ 1824, *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Pichia stipitis* CCT 2617). Nessa etapa, objetivou-se principalmente verificar a capacidade fermentativa dessas leveduras em concentração maior do substrato (40 g/L) e medindo-se também a produtividade das mesmas.

Verifica-se na **Tabela 3.3** que pelo menos 8 linhagens apresentaram produção de xilitol superior a 10 g/L, destacando-se *Candida tropicalis* IFO 0618 e LGY33, as quais não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Observa-se ainda que duas leveduras (*Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Pichia stipitis* CCT 2617) apresentaram produção de xilitol bem inferior às demais, concluindo-se que as mesmas possuem baixa capacidade de acumular xilitol. As conversões das 8 principais leveduras (0,50-0,74 g/g) foram similares às citadas na literatura (Barbosa *et al.*, 1988; Pessoa Jr., 1991; Mayerhoff *et al.* 1997; Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995; Mayerhoff *et al.*, 1997). Observa-se ainda que as produtividades das leveduras *Candida tropicalis* IFO 0618, LGY 33 e LGY 34 (0,37 g/L.h) foram superior as demais ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Esses resultados foram inferiores aos reportados por Horitsu *et al* (1992) e Felipe *et al.* (1993), mas foram superiores aos relatados por Meyrial *et al.* (1991) e Lu *et al.* (1995).

Tabela 3.3: Produção, rendimento e produtividade de xilitol, em valores médios, obtidos por 10 leveduras, durante 48 horas de fermentação, em meio sintético.

Levedura	Xilitol		
	M _{P1} (g/L)	Y _{P1/S} (g/g)	Q _{PV} (g/L.h)
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0618	17,92 a	0,52 c	0,37 a
LGY 33	17,81 a	0,74 a	0,37 a
LGY 34	16,85 ab	0,73 ab	0,35 ab
LGY 42	14,82 b	0,64 b	0,31 b
LGY 45	14,32 b	0,63 b	0,30 b
<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	12,40 bc	0,50 c	0,26 bc
<i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710	11,79 c	0,59 bc	0,24 c
<i>Candida guilliermondii</i> IZ 1422	10,44 c	0,52 c	0,22 c
<i>Pachysolen tannophilus</i> CCT 1891	3,81 d	0,11 d	0,08 d
<i>Pichia stipilis</i> CCT 2617	1,18 e	0,03 d	0,02 e

Médias na mesma coluna, seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

3.3.3. Terceira etapa de seleção

De acordo com os resultados obtidos na etapa anterior, 8 linhagens (LGY 34, LGY 33, LGY 45 LGY42, *Candida tropicalis* IFO 0618, *Candida guilliermondii* IZ 1422, *Candida parapsilosis* IZ 1710 e *Candida tropicalis* IZ 1824) foram selecionadas para serem testadas quanto a capacidade fermentativa em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, que apresenta agentes inibidores de microrganismos, a exemplo de ácido acético, furfural e hidroximetil furfural (Magee & Kosaric, 1985; Ghosh & Singh, 1993).

As leveduras *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e *Pichia stipilis* CCT 2617 foram desconsideradas para a terceira fase de seleção, devido a baixa capacidade desses microrganismos converterem xilose em xilitol.

Das 8 leveduras testadas na terceira etapa de seleção (**Tabela 3.4**), duas (*Candida tropicalis* IZ 1824 e *Candida tropicalis* IFO 0618) consumiram 100 % da xilose

em 72 h de fermentação. A levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 consumiu 92 % da xilose no mesmo período analisado. Nota-se que *Candida parapsilosis* IZ 1710 alcançou produção de xilitol de 22,85 g/L, que difere estatisticamente em nível de 95 % de confiança, das demais leveduras.

Verifica-se ainda (**Tabela 3.4**) que os melhores rendimentos: 0,72 e 0,71 g de xilitol por g de xilose consumida foram alcançados por *Candida parapsilosis* IZ 1710 e *Candida guilliermondii* IZ 1422, respectivamente. Mayerhoff *et al.* (1997) avaliaram a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz de trinta leveduras e observaram que as leveduras *Candida parapsilosis* IZ 1710 e *Candida guilliermondii* IZ 1422 alcançaram rendimentos, respectivamente de 0,72 e 0,54 de xilitol por grama de xilose consumida. Os resultados relatados concordam com os encontrados no presente estudo, no qual *Candida parapsilosis* IZ 1710 diferiu estatisticamente ($p \leq 0,5$) na produção e produtividade, das demais leveduras avaliadas, incluindo *Candida guilliermondii* IZ 1422.

Tabela 3.4: Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol, em valores médios, obtidos por 8 leveduras, durante 72 horas de fermentação, em meio contendo hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Levedura	Xilose	Xilitol		
	M _s (g/L)	M _{P1} (g/L)	Y _{P1/S} (g/g)	Q _{PV} (g/L.h)
<i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710	31,35 ab	22,85 a	0,72 a	0,31 a
<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	34,04ab	19,13 b	0,56 bc	0,26 b
<i>Candida guilliermondii</i> IZ 1422	26,37c	18,80 b	0,71 a	0,26 b
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0618	34,04ab	14,74 c	0,43 cd	0,20 c
LGY 42	28,56bc	14,66 c	0,51 bcd	0,20 c
LGY 45	21,88d	9,44 d	0,43 cd	0,13 d
LGY 34	13,38e	6,34 e	0,47 cd	0,08 d
LGY 33	14,28e	6,32 e	0,44 cd	0,08 d

Médias na mesma coluna, seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

pH inicial do meio = 5,2

Observa-se na **Tabela 3.5** que etanol foi produzido por 100 % das leveduras avaliadas. A maior produção (7,17 g/L) foi obtida pela levedura *Candida tropicalis* IZ 1824, enquanto *Candida parapsilosis* IZ 1710 alcançou a mais baixa produção (4,83 g/L), indicando que essa levedura utiliza xilose principalmente para produção de xilitol. Barbosa *et al.* (1988) avaliando leveduras produtoras de xilitol, consideraram como ponto negativo àquelas leveduras, a produção em quantidade elevada de etanol, em prejuízo da produção de xilitol.

Embora o crescimento celular das leveduras testadas não diferiu estatisticamente entre si (**Tabela 3.5**), a levedura *Candida tropicalis* IFO 0618 apresentou a maior produção de biomassa (7,02 g/L). Por outro lado, *Candida parapsilosis* IZ 1710 obteve apenas 4,71 g de biomassa por litro. Isso reforça ao já anteriormente afirmado, ou seja, essa levedura utilizou o substrato, principalmente para a produção de xilitol, enquanto que as demais produziram mais outro metabólito (etanol) e/ou massa celular.

Nota-se ainda na **Tabela 3.5** que o pH das leveduras testadas situaram-se no final da fermentação na faixa da neutralidade (6,52-7,72). Esse fato indica que os microrganismos foram capazes de consumir ácido acético presente no hidrolisado. Rodrigues (1997) observou esse mesmo comportamento com *Candida guilliermondii*.

Tabela 3.5: Produção de etanol, biomassa e pH, em valores médios, obtidos por 8 leveduras, durante 72 horas de fermentação, em hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Levedura	Etanol (g/L)	Biomassa (g/L)	pH ⁽¹⁾ final
<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	7,17 ab	4,68 a	6,82 abc
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0618	6,87 ab	7,02 a	7,31 abc
LGY 42	6,19 abc	5,76 a	6,52 bc
LGY 45	5,51 bcd	6,58 a	7,10 abc
<i>Candida guilliermondii</i> IZ 1422	5,44 bcd	4,93 a	7,05 abc
LGY 34	4,98 cd	6,77 a	7,72 ab
LGY 33	4,93 cd	6,48 a	7,63 abc
<i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710	4,83 cd	4,71 a	6,90 abc

Médias na mesma coluna, seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

(1) pH inicial do meio = 5,2

Com a análise dos resultados das três etapas de seleção, notadamente da terceira etapa, na qual utilizou-se hidrolisado hemicelulósico como substrato, verifica-se que o microrganismo que apresentou maior capacidade de produção de xilitol, menor produção de etanol e um dos menores crescimentos celular foi a *Candida parapsilosis* IZ 1710. Esse microrganismo foi selecionado para os demais trabalhos experimentais.

3.4. Conclusões

Na primeira etapa de seleção, observou-se que duas leveduras (T-12 e *Pichia stipilis* CCT 2617) mostraram boa capacidade de conversão de xilose em etanol, o que representa uma alternativa a mais do uso de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar;

As leveduras (LGY 33, LGY34, LGY 42 e LGY 45) apresentaram bom desempenho nas fases iniciais de seleção quando se utilizou meio sintético. Na terceira fase de seleção, tendo hidrolisado hemicelulósico como substrato, notou-se que essas leveduras não obtiveram resultados satisfatórios. Isso está possivelmente relacionado com a presença de agentes inibidores no hidrolisado;

Na terceira etapa, notou-se que *Candida tropicalis* IZ 1824 e *Candida tropicalis* IFO 0618 foram mais efetivas para produção de etanol e biomassa, respectivamente;

Nas duas primeiras etapas, a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 apresentou produção de xilitol considerada apenas mediana. Na terceira etapa, entretanto, esse microrganismo obteve produção (22,85 g/L) e produtividade (0,31 g/L.h) estatisticamente ($p \leq 0,05$) diferentes das demais linhagens testadas. Seu rendimento (0,72 g/g) foi igualado apenas pela levedura *Candida guilliermondii* IZ 1422 (0,71 g/g);

Adicionalmente, *Candida parapsilosis* IZ 1710 foi o microrganismo que produziu a menor quantidade de etanol (4,83 g/L) e uma das menores produções de biomassa (4,71 g/L).

3.5. Referências Bibliográficas

- 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, n. 1, p. 55-59, 1993.
- BAIOCCO, L. M.; PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R. SCAMPARINI, A. R. P. Seleção de linhagens de leveduras produtoras de etanol. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumos, p. 257, 1999. Salvador-BA.
- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.
- CHEN, L. F.; GONG, C. S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 226-228, 1985.
- DOMINGUEZ, J. M.; CRUZ, J. M.; ROCA, E.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cell. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 119-130, 1999.
- DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C. S.; 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.
- EMODI, A. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technology**, v. 32, n. 1, p. 28-32, 1978.

- FELIPE, M. G. A.; ALVES, L. A.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I.M.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 6, n. 2,3, p. 281-283, 1996.
- FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. ; ROSA, S. A. M. Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolyzate of hemicellulose obtained from sugar cane bagasse. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 103-114, 1993.
- FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 251-254, 1997.
- FURLAN, S. A.; BOUILLLOUD, P.; CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 657-662, 1994.
- FURLAN, S. A.; BOUILLLOUD, P.; STREHAIANO, P.; RIBA, J. P. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 203-206, 1991.
- GHOSH, P.; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic - microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 295-333, 1993.
- GÍRIO, F.M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 3, p. 245-251, 2000.
- GONG, C.S.; CLAYPOOL, T. A.; MCCracken, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P.P.; TSAO, G. T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 25, n.1, p 85-102, 1983.

- GURGEL, P. V.; MANCILHA, I. M.; PEÇANHA, R. P.; SIQUEIRA, J. F. M. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolyzate. **Bioresource Technology**, v. 52, n. 3, p. 219-223, 1995.
- HINFRAY, C.; JOUENNE, T.; MIGNOT, L.; JENTER, G. A. Influence of the oxygenation level on d-xylose fermentation by free and agar-entrapped of *Candida shehatae*. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 682-687, 1995.
- HORITSU, H.; YAHASHI, Y.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, n. 3, p. 248-253, 1992.
- LU, J.; TSAL, L. B.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida Sp. L-102*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 167-170, 1995.
- MAGEE, R. J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 32, p. 61-93, 1985.
- MAHLER, G. F.; GUEBEL, D. V. Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. . **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 407-412, 1994.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. . **Biotechnology Letters**, v. 19 n. 5, p. 407-409, 1997.
- MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-Xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 281-286, 1991.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; DELGENES, J. P.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 191-197, 1993.

- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 4, p. 417-422, 1995.
- PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; PETRAUSKAS, T. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Optimization of D-xylose, L-arabinose and D-glucose production obtained from sugar cane bagasse hydrolysis process. **6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Guaratinguetá, SP, Brazil, 1999.
- PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; PETRAUSKAS, T. M.; SCAMPARINI, A. R. P. . Influência da composição do meio na produção de xilitol por *Candida tropicalis* IZ1824. In: **VI Mostra de Trabalhos Científicos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos-Unicamp, Campinas, 1998.
- PARAJÓ, J. C.; DOMINGUÉZ, H.; DOMINGUÉZ, J. M. Xylitol from wood: study of some operational strategies. **Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 531-535, 1996.
- PESSOA JUNIOR, A. Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1991, 187 p.
- PFEIFER, M. J.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry and Biotechnenology**, v. 57/58, p. 423-430, 1996.
- PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16 n. 11, p. 944-956, 1994.
- PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Cândida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.8, n. 6, p. 360-364, 1986.

- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21 n. 2, p. 124-129, 1997.
- ROBERTO, I. C. ; SATO, S. ; MANCILHA, I. M. ; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.17, n. 11, p. 1223-1228, 1995a.
- ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 3, p. 271-275, 1991.
- ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. 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, n. 2-3, p. 255-257, 1995b.
- RODRIGUES, D. C. G. A. Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo alimentado. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, SP, 104 p., 1997.
- ROEBUCK, K.; BRUNDIN, A.; JOHNS, M. Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 1, p. 75-78, 1995.
- SINGH, A. ; MISHRA, P. Microbial production of xylitol. In: SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial pentose utilization**: current applications in biotechnology, Amsterdam: Elsevier, 1995, chap. 10, p. 273-299. (Progress in Industrial Microbiology, v. 33).
- SIRISANSANEEYAKUL, S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p. 565-570, 1995.

- VAN ZYL, C.; PRIOR, B. A. PREEZ, J.C. Production of ethanol from sugar cane hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnenology**, v. 13, p. 357-369, 1988.
- WÄLLER, S. M.; ASSEV, S.; RÖLLA, G. Xyitol 5-P formation by dental plaque after 12 week's exposure to a xylitol/sorbitol containing chewing gum. **Scandinavian Journal Dental Research**, v. 100, n. 6, p. 319-21, 1992.
- WINKENLHAUSEN, E.; PITTMAN, P.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W.; Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v. 18 n. 7, p. 753-758, 1996.
- YAHASHI, Y.; HATSU, M.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a non-woven fabric. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 12, p. 1395-1400, 1996.

3.6. Nomenclatura

$Y_{p1/s}$ = fator de conversão de xilose em xilitol (g/g)

$Y_{p2/s}$ = fator de conversão de xilose em etanol (g/g)

M_{P1} = massa de xilitol produzida (g/L)

M_{P2} = massa de etanol produzida (g/L)

M_S = massa de xilose consumida (g/L)

Q_{PV} = produtividade volumétrica de xilitol (g/L.h)

Δt_f = tempo total de fermentação

η = eficiência de conversão de xilose em xilitol = $(Y_{P/S}/0,917).100$

CAPÍTULO 4

Otimização da produção de xilitol por *Candida parapsilosis*

IZ 1710

ÍNDICE DE FIGURAS	119
ÍNDICE DE TABELAS	122
ÍNDICE DE ANEXOS	124
RESUMO	127
4.1. Introdução	128
4.2. Material e Métodos	129
4.2. 1. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar	129
4.2.2. Microrganismo	129
4.2.3. Manutenção do microrganismo em meio sólido.....	129
4.2.4. Esterilização dos materiais	129
4.2.5. Preparo do inóculo.....	130
4.2.6. Métodos de fermentação	130
4.2.6.1. Estudo da influência dos nutrientes	130
4.2.6.2. Estudo da influência do pH.....	131
4.2.6.3. Estudo da influência da aeração.....	132
4.2.6.4. Estudo da influência da temperatura e da concentração inicial da xilose.	132
4.2.7. Métodos Analíticos	133
4.2.7.1. Determinação de umidade do bagaço	133
4.2.7.2. Determinação dos açúcares, xilitol e etanol	133
4.2.7.3. Determinação do ácido acético.....	133
4.2.7.4. Determinação de furfural e hidroximetilfurfural	133
4.2.7.5. Determinação da matéria mineral.....	134
4.2.7.6. Determinação da celulose, hemicelulose e lignina.	134

4.2.7.7. Determinação da massa celular (MCS).....	134
4.2.7.8. Determinação dos parâmetros fermentativos	135
4.2.8. Delineamento experimental	135
4.2.9. Análise estatística.....	136
4.3. Resultados e Discussão	137
4.3.1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	137
4.3.2. Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.....	139
4.3.3. Processos fermentativos	141
4.3.3.1. Estudo da influência do meio.....	141
4.3.3.2. Estudo da influência do pH inicial do meio de cultura.....	142
4.3.3.3. Estudo da influência da aeração.....	143
4.3.3.4. Estudo da influência da temperatura e da concentração inicial de xilose.	145
4.3.3.4.1. Análise em diferentes tempos de fermentação	145
4.3.3.4.2. Análise do rendimento e produtividade de xilitol	169
4.3.3.4.3. Análise estatística da produção de xilitol	171
4.4. Conclusões.....	193
4.5. Referências Bibliográficas	195
4.6. Anexos	201
4.7. Nomenclatura	206

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 4.1:** (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 1: 25°C e 27 g/L de xilose..... 151
- Figura 4.2:** (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 2: 25°C e 57 g/L de xilose..... 153
- Figura 4.3:** (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 3: 35°C e 27 g/L de xilose..... 155
- Figura 4.4:** (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 4: 35°C e 57 g/L de xilose..... 157
- Figura 4.5:** (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 5: 23°C e 42 g/L de xilose 159

Figura 4.6: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (O) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 6: 37°C e 42 g/L de xilose 161

Figura 4.7: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (O) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 7: 30°C e 21 g/L de xilose 163

Figura 4.8: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (O) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 8: 30°C e 63 g/L de xilose 165

Figura 4.9: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (O) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamentos 9, 10 e 11 (pontos centrais): 30°C e 42 g/L de xilose. 167

Figura 4.10: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 52 horas de fermentação. Modelo completo. 177

Figura 4.11: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 52 horas de fermentação. Modelo completo. 177

Figura 4.12: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 52 horas de fermentação. Modelo ajustado.	179
Figura 4.13: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 52 horas de fermentação. Modelo ajustado.	179
Figura 4.14: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 64 horas de fermentação. Modelo completo.	181
Figura 4.15: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 64 horas de fermentação. Modelo completo.	181
Figura 4.16: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 64 horas de fermentação. Modelo ajustado.	183
Figura 4.17: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 64 horas de fermentação. Modelo ajustado.	183
Figura 4.18: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 76 horas de fermentação. Modelo completo.	185
Figura 4.19: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 76 horas de fermentação. Modelo completo.	185
Figura 4.20: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 76 horas de fermentação. Modelo ajustado.	187

Figura 4.21: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 76 horas de fermentação. Modelo ajustado.	187
Figura 4.22: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 88 horas de fermentação. Modelo completo.	189
Figura 4.23: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 88 horas de fermentação. Modelo completo.	189
Figura 4.24: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 88 horas de fermentação. Modelo ajustado.	191
Figura 4.25: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xilitol, com 88 horas de fermentação. Modelo ajustado.	191

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Meios de cultura utilizados para produção de xilitol por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710.....	131
Tabela 4.2. Meio de cultura utilizado para testar a influência do pH e aeração na produção de xilitol por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710	131
Tabela 4.3. Meio de cultura empregado na fermentação da levedura <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710 no delineamento experimental 2 ²	132

Tabela 4.4: Variáveis independentes com diferentes níveis a serem estudadas durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710.	136
Tabela 4.5. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar bruto e hidrolisado	138
Tabela 4.6. Composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana bruto e neutralizado.	141
Tabela 4.7. Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710 durante 50 horas de fermentação nos meios de cultura A, B e C.	142
Tabela 4.8. Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol obtidas por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710 durante 64 horas de fermentação, em valores diferentes de pH inicial.	143
Tabela 4.9. Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol obtidas por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710 durante 48 horas de fermentação, em diferentes condições de aeração.	145
Tabela 4.10: Delineamento fatorial 2^2 com os resultados experimentais de rendimento e produtividade de xilitol obtidos por fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710 (continua).....	170
Tabela 4.10: (continuação) Delineamento fatorial 2^2 com os resultados experimentais de rendimento e produtividade de xilitol obtidos por fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710.....	170
Tabela 4.11: Delineamento fatorial 2^2 com os resultados experimentais de produção de xilitol obtidos por fermentação do hidrolisado do bagaço de	

cana-de-açúcar por <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710,. nos tempos de 52, 64, 76 e 88 h.....	175
---	-----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 4.1: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 52 horas de fermentação.....	201
Anexo 4.2: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 52 horas de fermentação.....	201
Anexo 4.3: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 64 horas de fermentação.....	202
Anexo 4.4: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 64 horas de fermentação.....	202
Anexo 4.5: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 76 horas de fermentação.....	203
Anexo 4.6: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 76 horas de fermentação.....	203
Anexo 4.7: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 88 horas de fermentação.....	204

Anexo 4.8: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 88 horas de fermentação.....	204
Anexo 4.9: Análise de significância das variáveis independentes (modelo completo), na produção de xilitol nos tempos de 52, 64, 76 e 88 horas de fermentação.....	205
Anexo 4.10: Análise de significância das variáveis independentes (modelo ajustado), na produção de xilitol nos tempos de 52, 64, 76 e 88 horas de fermentação.....	205

RESUMO

Hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado para produção de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710. Inicialmente, analisou-se suplemento nutricional do hidrolisado hemicelulósico, o pH do meio e as melhores condições de aeração. Em seguida, um delineamento fatorial 2^2 foi usado com três repetições no ponto central e duas variáveis independentes: temperatura (23 a 37°C) e concentração inicial de xilose (21 a 63 g/L). O tempo completo de fermentação foi de 88 horas, com amostras sendo retiradas em intervalo regulares de fermentação. Os resultados obtidos previamente indicaram uma faixa ótima de pH de 4,82 a 6,32 ($p \leq 0,05$). As condições de aeração que proporcionaram melhores resultados para xilitol foram a 200 rpm (Erlenmeyer não aletado) e 100 rpm (Erlenmeyer aletado). Mg^{2+} influenciou positivamente na conversão de xilose para xilitol. Verificou-se que as variáveis independentes tiveram efeito significativo na produção de xilitol em todos os tempos analisados (52, 64, 76 e 88 h). A estimativa do efeito linear da xilose foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tempos, enquanto que a temperatura apresentou efeito quadrático significativo ($p \leq 0,05$) nas mesmas condições. De maneira geral, o efeito da concentração de xilose mostrou maior importância do que o da temperatura em todos os tempos de fermentação. Os parâmetros mais adequados para otimização do processo de fermentação e que proporcionaram maior rendimento (0,73 g/g); produtividade (0,46 g/L.h) e produção de xilitol (36, 05 g/L) por *Candida parapsilosis* IZ 1710, correspondeu ao tratamento 8: 30°C e 63 g/L de xilose, com 52 e 88 h de fermentação, respectivamente. No tempo 88 h a análise de variância para o modelo de regressão ajustado apresentou $R^2=0,9727$; regressão altamente significativa ($F_c=146,28$; $F_t=4,46$) e erro de 0,3447. Tais parâmetros indicam que o modelo é preditivo na região estudada.

Palavras chave: hidrolisado hemicelulósico; fermentação, *Candida parapsilosis* IZ 1710; xilose; temperatura; xilitol; metodologia de superfície de resposta

4.1. Introdução

No Brasil, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para bioconversão apresenta grandes vantagens por tratar-se de um resíduo agro-industrial abundante, barato e, embora seja sazonal, encontra-se disponível o ano inteiro na indústria sucro-alcooleira. A composição dos três principais componentes dessa biomassa é a seguinte: celulose, 40%; hemicelulose, 33% e lignina, 22% (Purchase, 1995).

A fração hemicelulósica do bagaço pode ser seletivamente hidrolisada para seus açúcares, tendo xilose como principal componente. Essa pentose, por sua vez, pode ser convertida para outros produtos, dentre eles o xilitol.

Xilitol é um adoçante que apresenta inúmeras propriedades físico-químicas que o torna potencialmente aplicável no processamento de alimentos, na indústria farmacêutica e na área de saúde. Esse poliol é anticariogênico. De outra parte, o mesmo pode ser usado por pessoas diabéticas, uma vez que seu metabolismo independe de insulina (Emodi, 1978; Horitsu *et al.*, 1992). Seu poder adoçante é equivalente ao da sacarose, apresenta ainda baixa viscosidade e dissolução endotérmica. Essa última propriedade confere um verdadeiro efeito refrescante nos alimentos, o que torna o xilitol especialmente aplicável na indústria de confeitaria (Hyvonen, 1982; Lu, 1995).

Xilitol pode ser produzido por métodos químicos ou biológicos. O processo de hidrogenação biológica da xilose pode ser realizado por diversas leveduras (**Capítulo 3**), dentre elas *Candida parapsilosis*. A capacidade dessa levedura em converter xilose em xilitol foi reportada por outros pesquisadores (Furlan *et al.*, 1991; Nollet *et al.*, 1993; Furlan *et al.*, 1994; Nollet *et al.*, 1995; Preziosi-Belloy, 1997; Mayerhoff *et al.*, 1997). No **Capítulo 3**, desenvolveu-se um processo de seleção de leveduras produtoras de xilitol, resultando na escolha de *Candida parapsilosis* IZ 1710, entre 50 linhagens testadas.

O presente trabalho teve o objetivo de otimizar a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, por *Candida parapsilosis* IZ 1710. Inicialmente, os parâmetros meio de crescimento, pH e

aeração foram avaliados. Na etapa final, o efeito de duas variáveis independentes (temperatura e concentração inicial de xilose) foi testado através de planejamento experimental por análise de superfície de resposta.

4.2. Material e Métodos

4.2. 1. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar

Utilizou-se os parâmetros previamente definidos no **Capítulo 2** e de acordo com Paiva *et al.* (1999): tempo de reação de 18 minutos, 126°C e 3,10 % (v/v) de ácido sulfúrico.

4.2.2. Microrganismo

Utilizou-se neste trabalho a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710, pertencente ao Instituto Zimotécnico da ESALQ-USP (Piracicaba-SP) e previamente selecionada, conforme **Capítulo 3**.

4.2.3. Manutenção do microrganismo em meio sólido

A cultura foi mantida a 4°C em tubo inclinado contendo o meio previamente esterilizado a 121°C por 15 min YM agar (0,5 % de peptona bacteriológica, 0,3 % de extrato de levedura, 0,3 % de extrato de malte, 1,0 % de glicose e 2,0 % de agar), fechados com tampões de algodão hidrófobo e gaze.

4.2.4. Esterilização dos materiais

Todas as soluções e vidrarias usadas na manipulação do microrganismo, foram previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para evitar perdas por degradação, como reações tipo Maillard, as soluções de açúcares e do

hidrolisado hemicelulósico foram autoclavadas a 111°C (pressão manométrica de 0,5 atm) durante 15 minutos.

4.2.5. Preparo do inóculo

A levedura foi transferida com auxílio de alça de platina para frascos Erlenmeyer 125 mL contendo 50 mL de meio (0,3 % de peptona bacteriológica, 0,3 % de extrato de levedura, 1,5 % de glicose e 0,5 % de xilose). As condições de cultivo foram: agitação de 200 rpm, a 30°C, por 24 horas, em agitadores rotatórios com ambiente controlado, modelo G 25 (New Brunswick Scientific Co.). Essa solução foi utilizada para inocular os meios de fermentação na proporção 1:10 (v/v).

4.2.6. Métodos de fermentação

4.2.6.1. Estudo da influência dos nutrientes

O estudo da influência do meio teve o seguinte procedimento: 10 mL do inóculo foram adicionados em 100 mL do meio constante da **Tabela 4.1**, contidos em erlenmeyers de 500 mL. A fermentação foi conduzida a 29°C, 150 rpm por 50 horas em agitadores rotatórios com ambiente controlado, modelo G 25 (New Brunswick Scientific Co.).

Tabela 4.1. Meios de cultura utilizados para produção de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710.

Composição	Meios de cultura (%)		
	A	B	C
Extrato de levedura	0,3	0,3	0,9
Peptona bacteriológica	0,3	0,3	0,9
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	0,2	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	-	0,1
Xilose	4,0	4,0	4,0
Glicose	0,4	0,4	0,4
pH	5,80	5,80	5,80

4.2.6.2. Estudo da influência do pH

O estudo da influência do pH teve o seguinte procedimento: 10 mL do inóculo foram adicionados em 100 mL do meio constante da **Tabela 4.2**, contidos em erlenmeyers de 500 mL. A fermentação foi conduzida a 29°C, 150 rpm por 64 horas em agitadores rotatórios com ambiente controlado, modelo G 25 (New Brunswick Scientific Co.)

Tabela 4.2. Meio de cultura utilizado para testar a influência do pH e aeração na produção de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3,0
Peptona bacteriológica	3,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Xilose	40,0
Glicose	4,0

4.2.6.3. Estudo da influência da aeração

O estudo da influência da aeração teve o seguinte procedimento: 10 mL do inóculo foram adicionados em 100 mL do meio constante da **Tabela 4.2**, contidos em erlenmeyers de 500 mL. A fermentação foi conduzida a 29°C, por 48 horas, em agitadores rotatórios com ambiente controlado, modelo G 25 (New Brunswick Scientific Co.). Estabeleceu-se quatro condições de aeração (A, B, C e D), conforme consta na **Tabela 4.9**.

4.2.6.4. Estudo da influência da temperatura e da concentração inicial da xilose.

O estudo da influência da temperatura e da concentração inicial de xilose teve o seguinte procedimento: 15 mL do inóculo foram adicionados em 150 mL do meio constante da **Tabela 4.3**, contidos em Erlenmeyers de 500 mL. A fermentação foi conduzida em agitadores rotatórios com ambiente controlado, modelos G 25, G 27 e Innova 4335 (New Brunswick Scientific Co.), a 200 rpm. As condições de temperatura e concentração inicial de xilose constam na **Tabela 5.4**.

Tabela 4.3. Meio de cultura empregado na fermentação da levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 no delineamento experimental 2².

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3,0
Peptona bacteriológica	3,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Hidrolisado hemicelulósico:	
Xilose	*
Glicose	5,92
Arabinose	3,88
pH	5,60 ± 0,2

* De acordo com o planejamento experimental o hidrolisado foi diluído ou concentrado com xilose anidra (**Tabela 4.4**).

4.2.7. Métodos Analíticos

4.2.7.1. Determinação de umidade do bagaço

Foi determinada em estufa marca FANEM, modelo 515, a 105°C, até peso constante, seguindo método 44 -15 A da AACC (1995).

4.2.7.2. Determinação dos açúcares, xilitol e etanol

As concentrações dos açúcares (xilose, glicose, arabinose), xilitol e etanol, foram determinadas de acordo com item 2.2.3.2, do **Capítulo 2**.

4.2.7.3. Determinação do ácido acético

Antes das análises, as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose (0,45 μm x 25 mm, marca Sigma) e a fase móvel foi filtrada a vácuo em membrana éster de celulose (0,45 μm x 47 mm, marca Millipore). A concentração de ácido acético foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (cromatógrafo Shimadzu Co., modelo LC-10 AD), equipado com detector de arranjo diodos SPD-10A (comprimento de onda de 200 nm). O ácido foi separado em coluna SCR-101H Shimadzu (300,0X7,9 mm) com a temperatura do forno a 50°C e usando ácido perclórico, com pH ajustado para 1,9, como fase móvel (fluxo de 0,8 mL/min). O padrão do ácido acético (99,7 %) foi da marca Synth.

4.2.7.4. Determinação de furfural e hidroximetilfurfural

Antes das análises, as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose (0,45 μm x 25 mm, marca Sigma) e a fase móvel foi filtrada a vácuo em membrana éster de celulose (0,45 μm x47mm, marca Millipore). As

concentrações de furfural (2-furaldeído) e 5-(hidroximetil) furfural foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (cromatógrafo Shimadzu Co., modelo LC-10 AD), equipado com detector de arranjo diodos SPD-10A (comprimento de onda de 276 nm para 5-(hidroximetil) furfural e 260 nm para furfural (2-furaldeído). Os componentes foram separados em coluna CLC-ODS (M) Shimadzu (250,0X4,6 mm), com a temperatura do forno a 30°C e usando acetonitrila/água (1:8) com 1,0 % de ácido acético, como fase móvel (fluxo de 0,6 mL/min). Os padrões de furfural (2-furaldeído) e 5-(hidroximetil) furfural (99,0 %) foram da marca Aldrich.

4.2.7.5. Determinação da matéria mineral

Foi calculada após calcinação da amostra em mufla a 550°C até peso constante, segundo as recomendações do método 08-01, da AACC (1995).

4.2.7.6. Determinação da celulose, hemicelulose e lignina.

Foram determinadas de acordo com as metodologias de Van Soest *et al.* (1991):

Celulose: calculada por diferença entre os valores obtidos para fibra em detergente ácido (FDA) e lignina.

Lignina: foi separada da celulose por meio de ácido sulfúrico 72 %. O ácido digeriu a FDA, tendo como resíduos a lignina e cinzas insolúveis. Por diferença de peso, antes e após calcinação em mufla, calculou-se o teor de lignina.

Hemicelulose: foi calculada por diferença entre os valores obtidos por fibra em detergente neutro (FDN) e FDA.

4.2.7.7. Determinação da massa celular (MCS)

O crescimento celular foi determinado gravimetricamente: 10 mL de amostras foram coletadas, centrifugadas ($2,23 \times 10^4$ g; 5°C; 20 min); lavadas duas

vezes com solução salina e centrifugadas novamente. A massa celular foi transferida para placas de Petri (50 mm de Ø), taradas e secas em estufa a 105°C. A massa celular foi seca em estufa a 55°C, resfriadas em dessecador e pesadas até peso constante.

4.2.7.8. Determinação dos parâmetros fermentativos

O fator de conversão de xilose em xilitol, produtividade e eficiência de conversão foram calculados de acordo com o item 3.2.8, do **Capítulo 3**.

4.2.8. Delineamento experimental

Para estudar os efeitos da temperatura e concentração de xilose na produção, rendimento e produtividade de xilitol, utilizou-se um delineamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central (Box, 1978; Barros Neto *et al.*, 1996). As variáveis foram estabelecidas com três níveis codificados como -1, 0, +1. Os valores reais correspondentes a esses níveis aparecem na **Tabela 4.4** e foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = \frac{(X_i - Z)}{\Delta X_i}$$

Onde:

x_i = valor codificado da variável X_i ;

X_i = valor real da variável;

Y = valor real da variável no ponto central;

ΔX_i = módulo de diferença entre dois valores consecutivos.

Esse delineamento apresentou ainda dois níveis de variáveis axiais codificados como $-\alpha$ e $+\alpha$. O valor de α é função do número de variáveis independentes ($k=2$, no caso deste trabalho), sendo definido pela seguinte equação:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^2)^{1/4} = 1,414$$

As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável foram estabelecidas a partir de testes preliminares.

O delineamento estatístico requer um número mínimo de tratamento. Neste experimento, foram usados 11 tratamentos, sendo quatro fatoriais (combinações dos níveis -1 e $+1$), quatro axiais (uma variável no nível $\pm \alpha$ e outra no nível 0), três centrais (as duas variáveis no nível 0). Os pontos centrais servem para estimar o erro experimental e determinar a precisão da equação polinomial (Cochran & Cox, 1964).

Na **Tabela 4.4**, apresentam-se os valores codificados e reais do delineamento experimental central rotacional composto para duas variáveis independentes e cinco níveis de variação. As respostas (Y) ou variáveis dependentes estudadas foram: produção, rendimento e produtividade de xilitol em diferentes tempos de fermentação.

Tabela 4.4: Variáveis independentes com diferentes níveis a serem estudadas durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por *Candida parapsilosis* IZ 1710.

Variáveis	Símbolo	Níveis				
		$\alpha = -1,414$	-1	0	$+1$	$\alpha = +1,414$
Temperatura (°C)	A	23	25	30	35	37
Xilose (g/L)	B	21	27	42	57	63

4.2.9. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos em função das variáveis em estudo foram analisados pelo programa Statistica para Windows versão 5.0 (1995).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

A **Tabela 4.5** mostra a composição do bagaço de cana-de-açúcar bruto e hidrolisado com ácido sulfúrico diluído. Do total do bagaço hidrolisado, 39,11% foi solubilizado. Esse resultado é concordante com o observado por Silva (1995). Este autor utilizou a técnica de explosão a vapor na hidrólise do bagaço, combinando tempo e temperatura. A maior quantidade do bagaço solubilizado (40%) foi obtida com 210°C por 30 min. Tais condições foram bem mais drásticas das empregadas neste trabalho.

Nota-se ainda na **Tabela 4.5** que as condições de hidrólise seletiva foram adequadas para recuperação da fração hemicelulósica, que representou 93,12% em relação ao conteúdo da hemicelulose no bagaço bruto. Esse resultado foi superior ao reportado por Parajó *et al.* (1998), que obtiveram apenas 87,15% da fração hemicelulósica com hidrólise de madeira dura. Porém, Lacôte *et al.* (1986) utilizando o processo de auto-hidrólise em bagaço de cana, obtiveram 100 % de hidrólise dessa poliose. Tal resultado deve-se, provavelmente, as condições drásticas de temperatura e pressão utilizadas no método de auto-hidrólise. Além disso, o bagaço hidrolisado destinava-se a ração animal, que exige uma hidrólise completa.

O valor da hemicelulose no bagaço bruto (27,75%) foi superior aos relatados por Lacôte *et al.* (1986), McDougall *et al.* (1993), Silva (1995) e Parajó *et al.* (1998). Entretanto, foi bem abaixo daqueles assinalados por Purchase (1995) e Rolz *et al.* (1987), que relataram valores de 33,0 % e 38,0 %, respectivamente.

Conforme a **Tabela 4.5**, as frações de celulose e lignina apresentaram valores superiores no bagaço hidrolisado, o que já era esperado, considerando que no processo de hidrólise utilizado objetivava-se atingir o menos possível esses componentes do bagaço. Isso foi comparável aos resultados relatados por Parajó *et al.* (1998). Os autores verificaram que a celulose aumentou de 43,2 %

para 59,7 %, enquanto a lignina passou de 25,8 % para 30,6 %, após hidrólise ácida de madeira dura (*Eucalyptus globulus*).

Tabela 4.5. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar bruto e hidrolisado

Componentes	Bagaço ⁽¹⁾	
	Bruto	Hidrolisado
Umidade	5,25	2,75
Celulose	53,83	68,45
Hemicelulose	27,75	1,91
Lignina	14,16	26,44
Matéria mineral	0,74	0,56
Bagaço solubilizado	-	39,11
Bagaço não solubilizado	-	60,89

⁽¹⁾ resultados expressos em % da matéria seca.

A concentração de lignina no bagaço bruto foi comparável ao reportado por Lacôte *et al.* (1986), que obtiveram 14,89 %. Por outro lado, McDougall *et al.* (1993), Saska & Ozer (1995), Purchase (1995) relataram valores superiores aos obtidos nesta pesquisa (20,00; 22,6 e 22,0 %), respectivamente.

O teor de celulose no bagaço bruto (53,83 %) supera aos relatados por outros pesquisadores. Os resultados de 44,69 %, 43,3 %, 48,00 % e 40,0 % foram obtidos, respectivamente, por Lacôte *et al.* (1986), Rolz *et al.* (1987), McDougall *et al.* (1993) e Purchase (1995).

O conteúdo da matéria mineral (**Tabela 4.5**) situou-se abaixo daqueles reportados por Lacôte *et al.* (1986), Rolz *et al.* (1987) e Silva (1995), os quais quantificaram 2,73 %; 2,40 % e 1,50 %, respectivamente.

De modo geral, os resultados obtidos foram às vezes discordantes daqueles reportados por outros pesquisadores quanto à composição química do bagaço. As possíveis fontes de variações são: o método de análise escolhido e principalmente a origem e as condições culturais da cana-de-açúcar.

4.3.2. Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar

As composições dos hidrolisados hemicelulósicos do bagaço de cana bruto (pH 1,13) e após ajuste do pH para 5,60, encontram-se na **Tabela 4.6.** e os valores foram bem próximos entre si. Vê-se que sob as condições de hidrólise empregada foram obtidos três monossacarídeos, sendo a xilose o maior componente quando relacionada com glicose e arabinose. Esses dados conferem com outros pesquisadores (Saska & Ozer, 1995; Felipe *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 1998), os quais constataram essa mesma predominância da xilose em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

A concentração de glicose foi superior aos resultados relatados em outras pesquisas (Parajó *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1998). Todavia, resultados bem acima foram registrados por Felipe *et al.*, (1993); Van Zyl *et al.* (1988) e Saska & Ozer, (1995). Os valores daqueles autores foram 7,0; 7,2 e 9,2 g/L, respectivamente. Pessoa Jr. (1991) obteve resultado (5,1 g/L) concordante com o aqui registrado.

A concentração de arabinose no hidrolisado bruto (3,499 g/L) ficou bem acima daqueles obtidos por Rodrigues *et al.*, 1998 (1,7 g/L) e Saska & Ozer, 1995 (1,9 g/L). Van Zyl *et al.* (1988) encontraram concentrações diferentes para arabinose quando o bagaço de cana foi hidrolisado com ácido sulfúrico (5,0 g/L) e ácido fosfórico (4,7 g/L). Esses valores situaram-se um pouco acima do obtido neste trabalho.

A concentração de xilose no hidrolisado bruto (35,024 g/L), conforme **Tabela 4.6**, ultrapassou aos obtidos por Pessoa Jr.(1991) e Rodrigues *et al.* (1998) (18,5 g/L); Felipe *et al.*(1993) (17,0 g/L) e Parajó *et al.*,1998 (18,1 g/L). Van Zyl *et al.* (1988) encontraram resultados conflitantes quando o bagaço de cana foi hidrolisado com ácidos diferentes. Com ácido sulfúrico, o resultado foi 46,0 g de xilose por litro e com ácido fosfórico, 36,8 g/L. Esses resultados foram superiores aos obtidos no presente trabalho.

Saska & Ozer (1995) também estudando diferentes processos de hidrólise perceberam resultados discordantes. Num processo de hidrólise aquoso, aqueles pesquisadores obtiveram 43,4 g/L de xilose, enquanto que no processo de hidrólise ácida a concentração dessa pentose foi de 35,9 g/L. O primeiro resultado situou-se acima do obtido neste trabalho, mas o segundo foi concordante.

Os resultados para ácido acético no hidrolisado bruto (8,56 g/L), conforme consta na **Tabela 4.6**, situaram-se acima dos obtidos por Pessoa Jr., 1991 (3,7 g/L); Rodrigues *et al.*, 1998 (6,5 g/L); Felipe *et al.*, 1993 (1,3 g/L) e Parajó *et al.*, 1998 (2,2 g/L). No entanto, Van Zyl *et al.*, (1988) registraram resultados diferentes quando o bagaço de cana foi hidrolisado com ácido sulfúrico (10,0 g/L) e com ácido fosfórico (8,8 g/L). Tais resultados situaram-se bem próximos aos obtidos na presente pesquisa.

Verifica-se que o hidrolisado bruto apresentou 0,643 g/L de furfural (**Tabela 4.6**). Tal resultado foi abaixo do obtido por Felipe *et al.*, 1993 (1,8 g/L) e Pessoa Jr., 1991 (2,0 g/L). O valor obtido por Rodrigues *et al.*, (1998) foi, no entanto, bem menor (0,034 g/L). Todavia, outros pesquisadores reportaram valores concordantes com os aqui registrados, tais como Van Zyl *et al.*, 1988 (0,6 g/L) e Parajó *et al.*, 1998 (0,71g/L).

Como já era esperado, o produto da degradação das hexoses, ou seja, hidroximetilfurfural, apresentou valores (0,016 g/L) bem abaixo daquele verificado para furfural (**Tabela 4.6**). Quando comparado com os da literatura, verifica-se que esse resultado foi superior ao relatado por Rodrigues *et al.*, 1998 (0,009 g/L), contudo, foi inferior aos registrados por Van Zyl *et al.* 1988 (0,04 g/L); Felipe *et al.*, 1993 (0,06g/L) e Pessoa Jr., 1991 (0,08 g/L).

As variações observadas na composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar do presente trabalho e os reportados por outros pesquisadores colocam em evidência que diversas fontes podem contribuir para resultados diferentes, tais como: a origem do bagaço, a natureza do tratamento empregado e o método de análise usado.

Tabela 4.6. Composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana bruto e neutralizado.

Componentes	Hidrolisado ⁽¹⁾	
	Bruto	Neutralizado
Glicose	5,695	5,594
Xilose	35,024	35,732
Arabinose	3,499	3,567
Ácido acético	8,560	9,020
Furfural	0,643	0,654
Hidroximetilfurfural	0,016	0,017
pH	1,13	5,60

⁽¹⁾-resultados expressos em g/L

4.3.3. Processos fermentativos

4.3.3.1. Estudo da influência do meio

Pelo teste de médias de Tukey, verifica-se que os meios A, B e C (**Tabela 4.7**) testados para a produção de xilitol pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 não revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em função das respostas de produção, rendimento e produtividade de xilitol. No entanto, observa-se que o meio B obteve a menor produção de xilitol (16,58 g/L), indicando que à ausência do Mg^{2+} influenciou negativamente a conversão de xilose para xilitol. Tal observação é concordante com Mahler & Gueber (1994), quando registraram concentração de 1,0 mM de Mg^{2+} causando o desvio do metabolismo de etanol para xilitol por *Pichia stipitis*, devido à acumulação de NADH intracelular.

Analizando-se os meios A e C, nota-se que ambos possuem qualitativamente nutrientes iguais, embora em concentrações diferentes (**Tabela 4.1**). Por outro lado, os mesmos apresentaram produção e produtividade bem próximas, mas o meio A permitiu obter melhor rendimento (0,76 g/g), apesar da concentração da fonte de nitrogênio ser apenas 33,33 % daquela empregada no

meio C. Isto levou-nos a optar pelo meio A para dar continuidade ao estudo dos demais parâmetros.

Tabela 4.7. Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante 50 horas de fermentação nos meios de cultura A, B e C.

Meios de cultura ⁽¹⁾	Xilose	Xilitol		
	M _S (g/L)	M _P (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _{PV} (g/L.h)
A	27,06 b	20,73 a	0,76 a	0,41 a
B	27,19 b	16,58 a	0,61 a	0,33 a
C	30,64 a	21,45 a	0,70 a	0,42 a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

(1)-Meios de cultura preparados conforme **Tabela 4.1**

4.3.3.2. Estudo da influência do pH inicial do meio de cultura

Pelo teste de médias de Tukey, verifica-se que os valores de pH (6,32; 4,82; 3,92) testados para a produção de xilitol pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 não revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em função das respostas de produção e rendimento de xilitol. Quanto à produtividade, observa-se que o pH 3,92 foi estatisticamente igual ao pH 4,82, mas diferiu do pH 6,32. Pelos dados obtidos (**Tabela 4.8**) permite-se concluir que nas condições estudadas, *Candida parapsilosis* IZ 1710 prefere um pH situado entre os valores de 4,82 e 6,32, o que corresponde ao pH de 5,60. Tal conclusão é um pouco discordante do relatado na literatura para esse mesmo microrganismo. Nolleau *et al.* (1993, 1995) avaliaram a redução de xilose para xilitol por *Candida parapsilosis* em diferentes condições de concentração inicial de xilose, pH e taxa de transferência de oxigênio (OTR). O melhor pH para produção de xilitol foi 4,75. Contudo, as condições ambientais foram bastante diferentes das empregadas nesta pesquisa. Outros microrganismos também apresentaram exigências

bastante diferentes em relação ao pH para produção de xilitol. A quantidade máxima de xilitol foi obtida a pH inicial de 6,0-7,0 por *Petromyces albertensis* (Dahiya, 1991), a pH 6,0 por *Candida guilliermondii* (Meyrial, et al., 1991) e a pH 4,0 por *Candida tropicalis* (Horitsu et al., 1992).

Tabela 4.8. Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol obtidas por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante 64 horas de fermentação, em valores diferentes de pH inicial.

pH inicial	Xilose M _s (g/L)	Xilitol		
		M _p (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	QPV (g/L.h)
6,32	32,27 a	24,45 a	0,75 a	0,38 a
4,82	31,84 ab	23,67 a	0,74 a	0,37 ab
3,92	30,05 b	21,71 a	0,72 a	0,34 b

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

4.3.3.3. Estudo da influência da aeração

Para testar a influência da aeração na produção de xilitol, foram estabelecidas quatro condições: A (velocidade do “shaker” a 100 rpm, com Erlenmeyer de 500 mL não aletado), B (velocidade do “shaker” a 100 rpm, com Erlenmeyer de 500 mL aletado), C (velocidade do “shaker” a 200 rpm, com Erlenmeyer de 500 mL não aletado) e D (velocidade do “shaker” a 200 rpm, com Erlenmeyer de 500 mL aletado), conforme **Tabela 4.9**.

Pelo teste de médias de Tukey, nota-se (**Tabela 4.9**) que as condições A, B, C e D testadas para a produção de xilitol pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em função das respostas de produção, rendimento e produtividade de xilitol. Em condições restritas de aeração (A), o microrganismo mostrou o mais baixo consumo de xilose, mas apresentou rendimento superior, sendo estatisticamente diferente das demais condições testadas ($p \leq 0,05$). Na condição D, onde a taxa de aeração era

mais alta, a levedura mostrou boa capacidade de consumo de xilose. Em contraste, obteve a mais baixa produção, rendimento e produtividade de xilitol. Isto confirma que em condições ótimas de aeração, o microrganismo desvia seu metabolismo principalmente para o crescimento celular.

As condições B e C revelaram uma situação intermediária quanto a taxa de aeração. Nessas condições, o consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol não diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) e foram superiores as demais condições, exceto para rendimento de xilitol.

Há um consenso entre os pesquisadores que a disponibilidade de oxigênio para as leveduras é fundamental na fermentação de xilose e que em condições limitadas desse elemento, a acumulação de xilitol é favorecida. A questão, entretanto, é estabelecer essa limitação para cada microrganismo. Nesse ponto os dados são bastante discordantes. Furlan *et al.* (1994) pesquisaram a influência do oxigênio na produção de xilitol e etanol por *Candida parapsilosis*. Quando a produção de xilitol ocorreu em condições moderadas de oxigênio (250 rpm; 0,3 vvm); o crescimento celular foi prejudicado e acumulação de xilitol foi favorecida. Entretanto, Parajó *et al.* (1996) obtiveram máxima concentração de xilitol em condições restritas de oxigênio (100 rpm) com a levedura *Debaryomyces hansenii*. Neste trabalho optou-se pela condição C para dar continuidade aos demais experimentos.

Tabela 4.9. Consumo de xilose, produção, rendimento e produtividade de xilitol obtidas por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante 48 horas de fermentação, em diferentes condições de aeração.

Aeração	Xilose	Xilitol		
	M _S (g/L)	M _P (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _{PV} (g/L.h)
(A)100 rpm (não aletado)	26,16 a	19,37 a	0,74 a	0,40 a
(B)100 rpm (aletado)	34,91 bc	22,93 b	0,65 b	0,48 b
(C)200 rpm (não aletado)	35,39 b	23,84 b	0,67 b	0,49 b
(D)200 rpm (aletado)	32,89 c	10,52 c	0,32 c	0,22 c

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, com 95% de confiança.

4.3.3.4. Estudo da influência da temperatura e da concentração inicial de xilose.

4.3.3.4.1. Análise em diferentes tempos de fermentação

A fim de observar-se a influência das variáveis temperatura e concentração inicial de xilose sobre a produção, rendimento e produtividade de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710, estabeleceu-se um planejamento fatorial 2², tendo-se fixado outras variáveis previamente testadas. Assim, o meio de fermentação foi o hidrolisado hemicelulósico do bagaço suplementado com sais e fonte de N, pH inicial de 5,60 e 200 rpm de agitação.

Os resultados das fermentações (consumo de xilose, glicose e arabinose; produção de xilitol, etanol e crescimento da massa celular e variação de pH) estão plotados nas **Figuras 4.1 a 4.9**.

Nos tratamentos 1 e 2 (**Figuras 4.1 e 4. 2**), quando a temperatura foi fixada em 25°C, a concentração de xilose influenciou significativamente a produção de xilitol. Considerando-se o tempo de 28 h de fermentação, onde a concentração de xilose ainda era alta, em ambos os tratamentos, a produção de xilitol foi praticamente a mesma. Porém, no tempo de 52 h de fermentação, onde a

concentração de xilose no tratamento 1 era de apenas 3,07 g/L e 22,40 g/L no tratamento 2, a produção de xilitol nesses tratamentos foram bem divergentes, 13,97 e 19,70 g/L, respectivamente. De outra parte, notou-se que a MCS não foi prejudicada pela menor concentração de xilose no tratamento 1, o qual apresentou produção de MCS acima do tratamento 2.

Quando se variou a concentração de xilose com uma temperatura mais elevada (35°C), nos tratamentos 3 e 4 (**Figuras 4.3 e 4.4**) observou-se que a produção de xilitol foi superior aos valores obtidos na temperatura de 25°C (tratamentos 1 e 2). Isso indica que em temperaturas mais elevadas, a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 direciona seu metabolismo principalmente para produção de xilitol. Esse fato é confirmado por Preez *et al* (1986). Esses autores observaram que a produção de xilitol foi incrementada somente quando a levedura *Pichia stipitis* foi cultivada a temperatura de 36°C.

Nas **Figuras 4.5 e 4.6**, visualiza-se que os tratamentos 5 e 6 (concentração inicial de xilose fixa e temperaturas de 23°C e 37°C, respectivamente), apresentaram valores de concentração de xilitol diferentes. As condições no tratamento 5 (23°C) foram altamente favoráveis aos metabolismo da xilose e crescimento celular e, conseqüentemente, maior produção de xilitol. As condições do tratamento 6 (37°C) mostraram-se altamente prejudiciais ao microrganismo, que apresentou baixa fermentação da xilose e baixo crescimento celular, o qual foi o menor entre os aqui testados. A produção de xilitol também foi afetada. Esse fato demonstra que a partir da temperatura de 37°C, a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 tem seu metabolismo afetado.

As **Figuras 4.7 e 4.8** representam os tratamentos 7 e 8 (temperatura de 30°C e concentração de xilose nos pontos $-\alpha$ (21 g/L) e $+\alpha$ (63 g/L), respectivamente). No tratamento 7, a acumulação de xilitol ocorreu até 64 h de fermentação e a partir daí, ocorreu pequeno decréscimo, o qual pode está associado a sua parcial reassimilação ou mesmo devido á sensibilidade do método de determinação. No tratamento 8, a alta concentração de xilose parece ter inibido o crescimento celular nas primeiras horas de fermentação, enquanto que a produção de xilitol foi crescente e máxima em todos os tempos analisados.

No ponto central (**Figura 4.9**), onde a temperatura de 30°C é considerada ótima para a maioria das leveduras, a concentração de xilose não foi adequada e no final da fermentação observou-se discreto declínio da concentração de xilitol, conforme já comentado no tratamento 7.

Nolleau *et al.* (1993, 1995) avaliaram a redução de xilose para xilitol por *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* em meios diferentes de concentrações de xilose inicial, pH e taxa de transferência de oxigênio (OTR). Estes pesquisadores observaram que essas leveduras apresentam exigências das condições ambientais bem diferentes. As condições ótimas para produção de xilitol por *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* foram: concentração inicial de xilose de 100 e 300 g/L, OTR de 0,4 e 2,2 mmoles/L.h e pH de 4,75 e 6,0, respectivamente.

De acordo ainda com Nolleau *et al.* (1993; 1995) a diferença de comportamento das leveduras *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* deve ser explicado pelo metabolismo inicial da xilose: a atividade da enzima xilose redutase usando o cofator NADPH é maior que quando essa enzima utiliza o cofator NADH. As leveduras *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* apresentaram baixos níveis de atividade de xilose redutase dependente de NADH, de acordo com Nolleau *et al.* (1993). Essas atividades mostraram ser dependentes do grau de aerobiose e da concentração inicial de xilose e foram correlacionadas com acumulação de xilitol.

Nota-se através das **Figuras 4.1 a 4.9** que em todos os tratamentos analisados, o pH do meio aumentou ligeiramente para próximo de 7,0. Tal fato deveu-se possivelmente ao consumo do ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico pela levedura. Esse mesmo comportamento também foi observado em fermentações conduzidas com *Pichia stipitis* (Van Zyl *et al.*, 1988) e por *Candida guilliermondii* (Felipe *et al.*, 1996; Rodrigues, 1997). Ácido acético, em geral, é inibidor para leveduras, embora muitas leveduras e bactérias sejam hábeis para utilizarem esse ácido para crescimento e manutenção (Van Zyl, 1991). Felipe *et al.* (1995) avaliaram o efeito do ácido acético em fermentação de hidrolisado semissintético e concluíram que em baixas concentrações houve

favorecimento da produtividade e rendimento de xilitol por *Candida guilliermondii*. Nos ensaios com concentrações acima de 3,0 g/L de ácido acético, esses autores notaram que a concentração do ácido baixou e foi acompanhada por um aumento de pH.

De maneira geral, a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 utilizou os açúcares presentes no hidrolisado, para crescimento celular, produção de xilitol e etanol. A assimilação de glicose foi rápida com exaustão dentro de 16 h em todos os tratamentos. Em contraste, à assimilação de arabinose foi lenta e aparentemente foi reprimida pela glicose e xilose, vez que essa pentose só passou a ser assimilada após a exaustão da hexose e decréscimo da concentração de xilose. Apenas nos tratamentos 1 e 7, onde as concentrações iniciais de xilose foram baixas, é que houve o completo consumo de arabinose (**Figura 4.1 e 4.7**). Isso também foi constatado por outras pesquisas utilizando diferentes microorganismos.

Meyer *et al.* (1992) trabalhando com hidrolisado simulado do bagaço de cana e usando a levedura *Candida blankii*, verificaram o consumo de toda glicose (15,0 g/L) com apenas 5 h de fermentação. Por outro lado, Felipe *et al.* (1997) utilizando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana como substrato, observaram que toda glicose (18 g/L) foi esgotada em 16 h de fermentação por *Candida guilliermondii*. Outros autores (Roberto *et al.*, 1995a; Felipe *et al.*, 1996; Rodrigues, 1997) também comprovaram essa utilização preferencial da glicose. Silva *et al.* (1996) testaram a habilidade de *Candida guilliermondii* produzir xilitol na ausência de glicose. Os autores observaram uma eficiência de conversão de 45 % em meio contendo os monossacarídeos glicose e xilose e um incremento de 66 % quando glicose foi omitida. Ainda, de acordo com esses autores, a presença de glicose no meio de fermentação reduz a eficiência de conversão de xilose em xilitol devido possivelmente, a parcial repressão da enzima xilose redutase.

Tavares *et al.* (2000), obtiveram incremento de produtividade e rendimento de xilitol da ordem de 30 %, quando o meio de cultivo foi adicionado de glicose na proporção de 10 % em relação a concentração de xilose inicial. À acumulação de outro metabólito (etanol) foi correlacionada com o metabolismo da glicose, devido

à direta relação entre o aumento da concentração de etanol e o aumento de glicose no meio de cultivo.

Estudos realizados por Preziosi-Belloy *et al.* (1997), em hidrolisado de madeira com *Candida parapsilosis*, mostraram que o crescimento celular (70-80 %) foi assegurado principalmente pela glicose no início da fermentação.

De acordo com Meyer *et al.* (1992) a diauxia e a utilização preferencial de substratos são freqüentemente observadas quando microrganismos são expostos a diferentes fontes de carbono, tal como ocorre em hidrolisados hemicelulósicos.

Essa assimilação seqüencial de açúcares também foi observada neste trabalho, entretanto, em relação ao crescimento celular, notou-se que o mesmo foi contínuo e que a levedura utilizou outras fontes de carbono presentes no meio, principalmente xilose.

Durante o mesmo período de 16 h de fermentação, notou-se em todos os tratamentos, exceção dos tratamentos 3 e 7, que houve intensa produção de etanol, indicando que o mesmo foi formado principalmente a partir da glicose. Tal observação é concordante com Preziosi-Belloy *et al.* (1997), que notaram produção de etanol até o final de consumo de glicose.

Em relação ao crescimento celular, verifica-se que o mesmo não foi inibido pela concentração de etanol presente no meio. Ao contrário, à medida que os níveis de açúcares, principalmente xilose, foram se exaurindo, etanol foi sendo consumido. Isso foi notado a partir das 40 h de fermentação, chegando à exaustão nos tratamentos 6 e 7 no final do período analisado.

Essa assimilação de etanol também foi registrada por Preziosi-Belloy *et al.* (1997). Por outro lado, verificou-se que a produção de etanol só veio acontecer com 52 h de fermentação no tratamento 7, possivelmente a partir da xilose (**Figura 4.7**).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

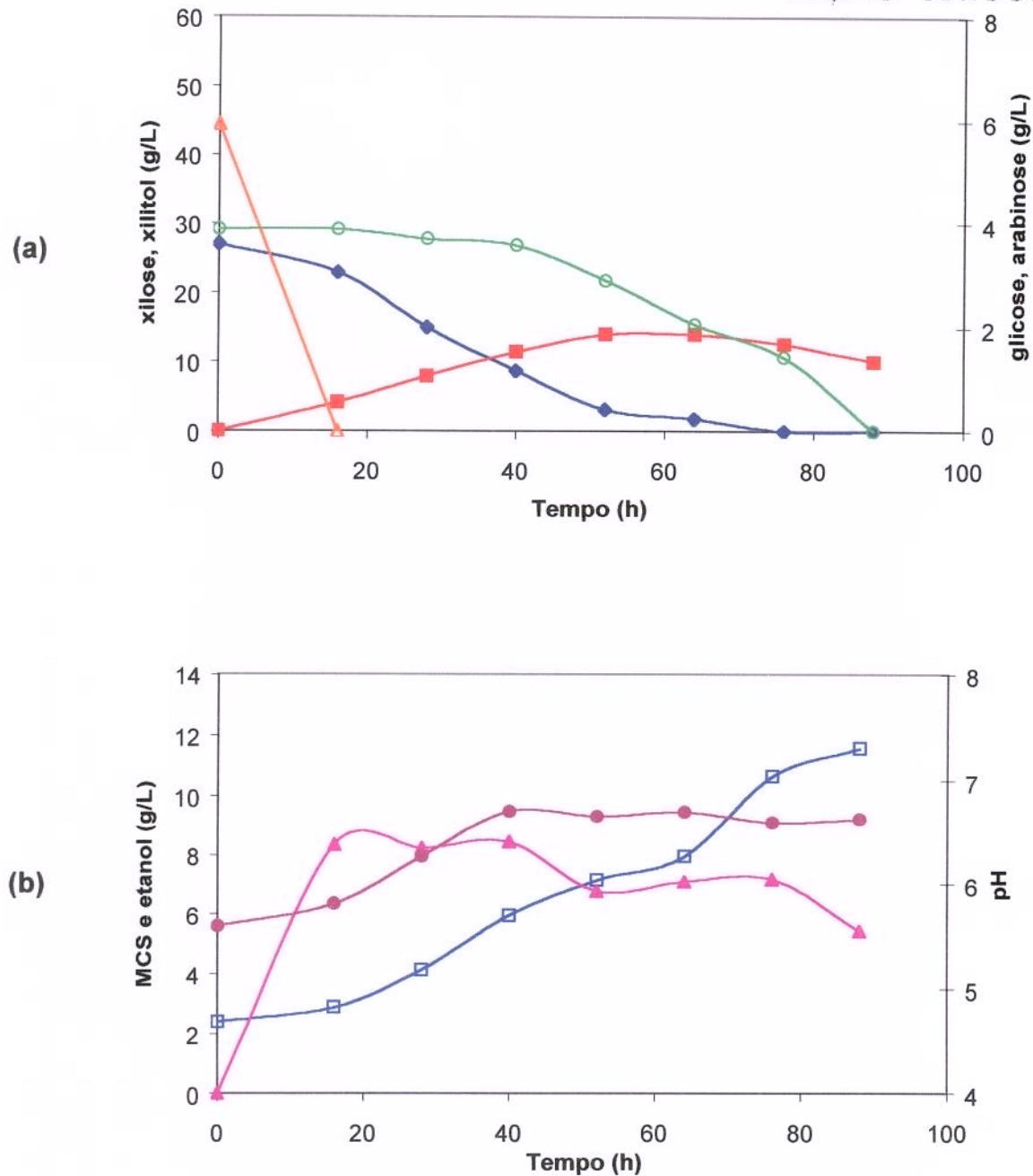


Figura 4.1: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 1: 25°C e 27 g/L de xilose.

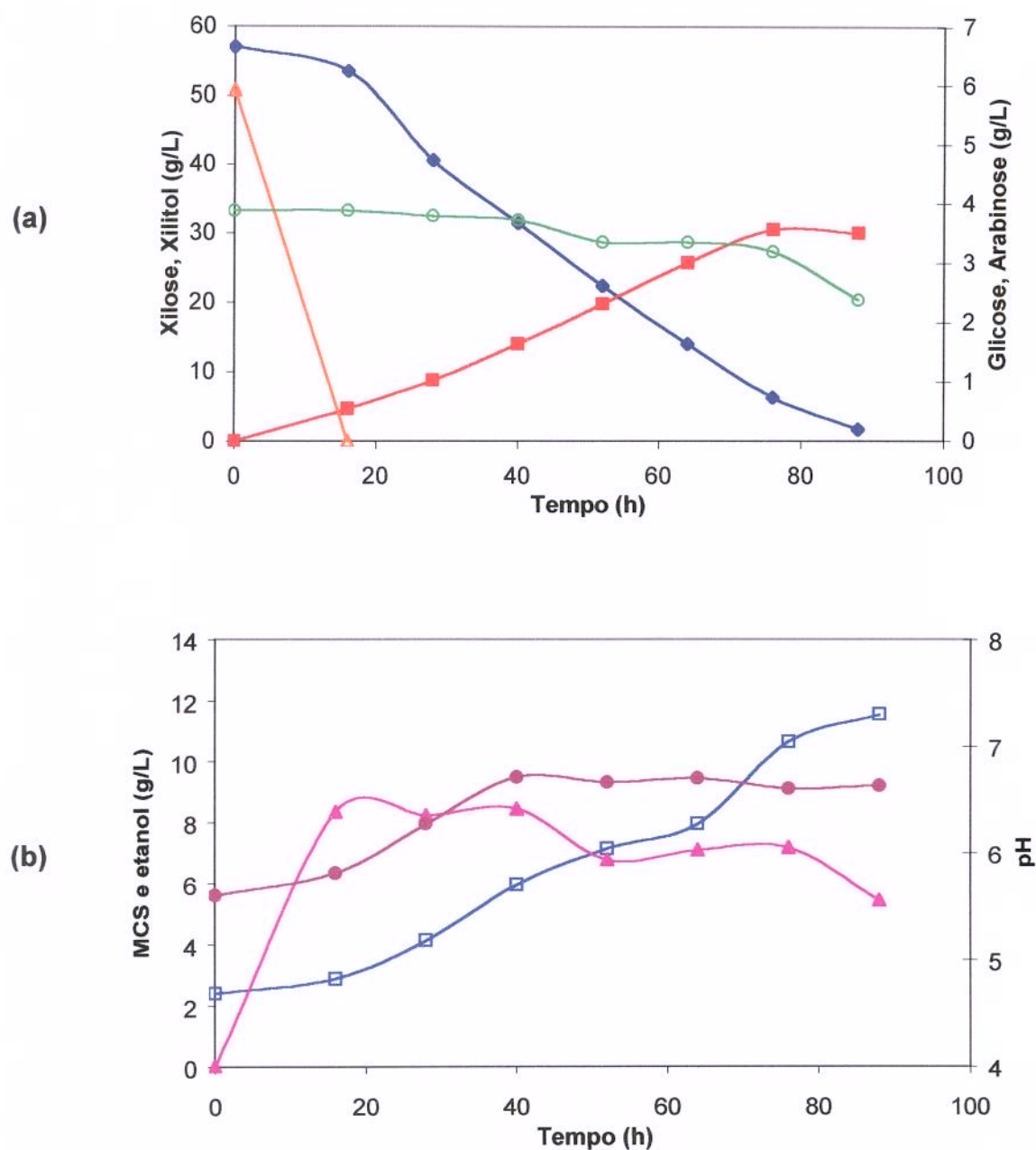


Figura 4.2: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 2: 25°C e 57 g/L de xilose.

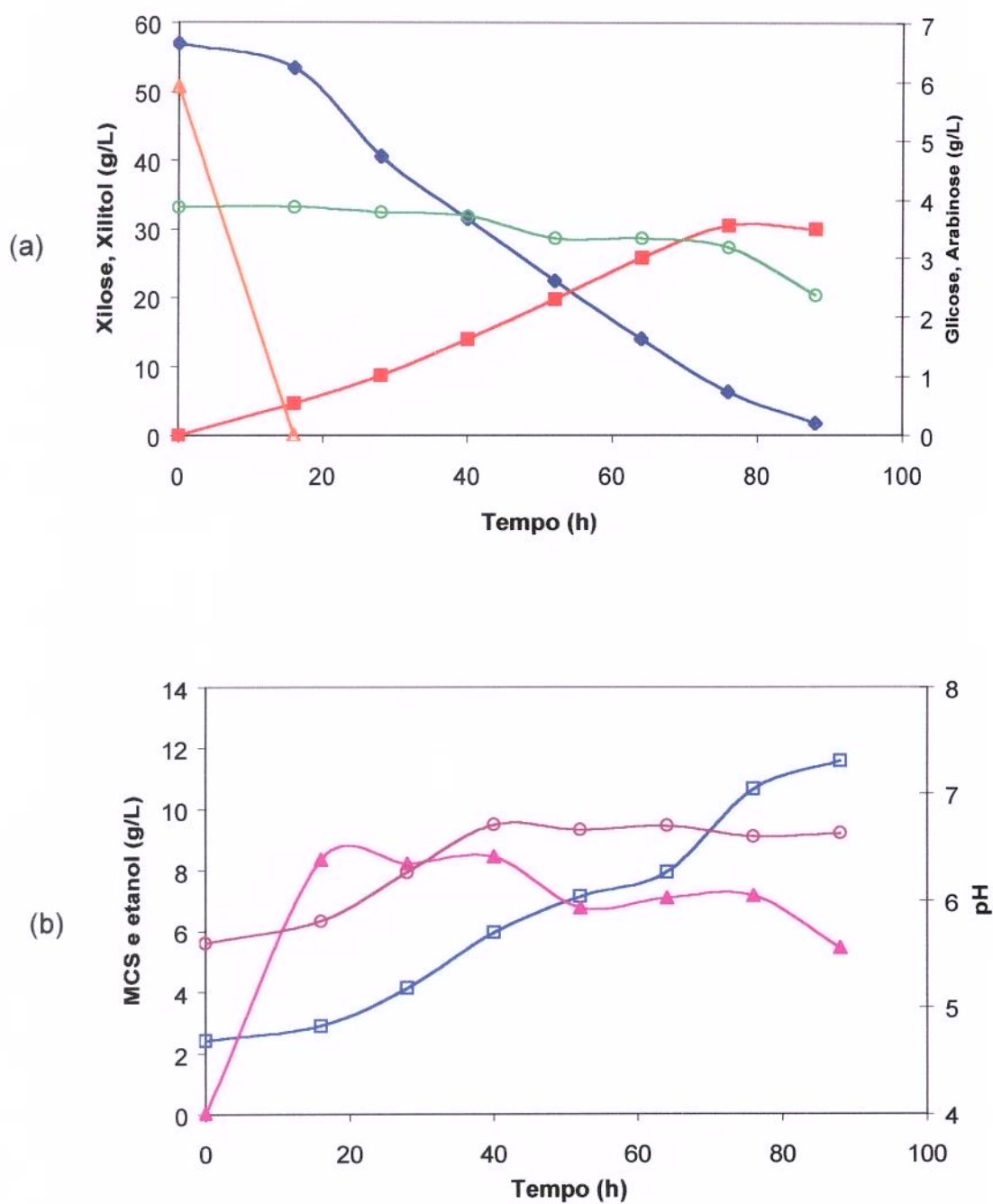


Figura 4.3: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 3: 35°C e 27 g/L de xilose.

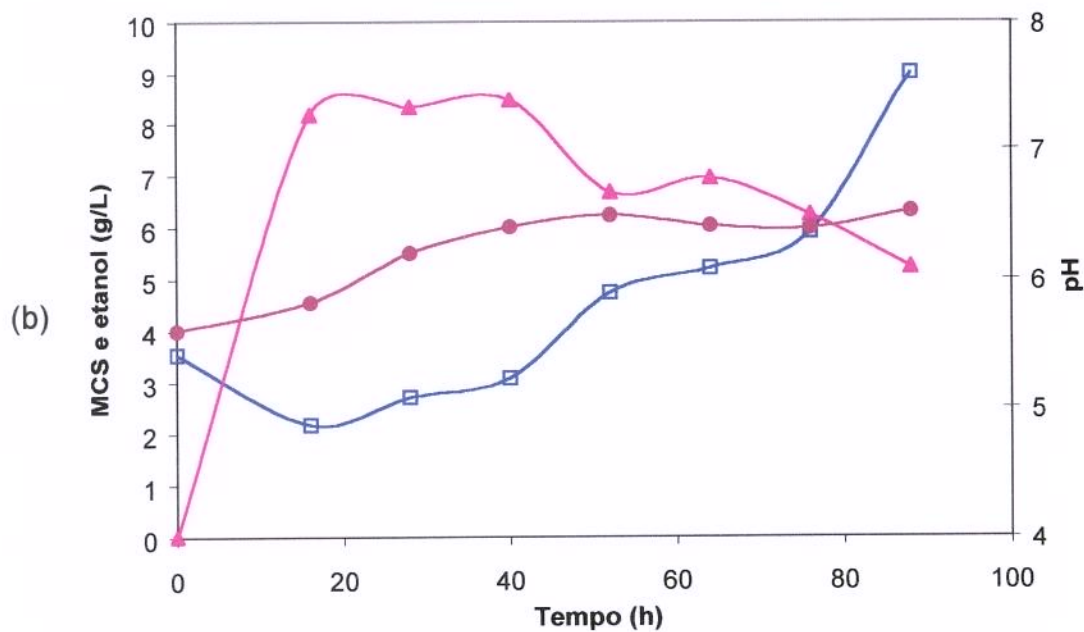
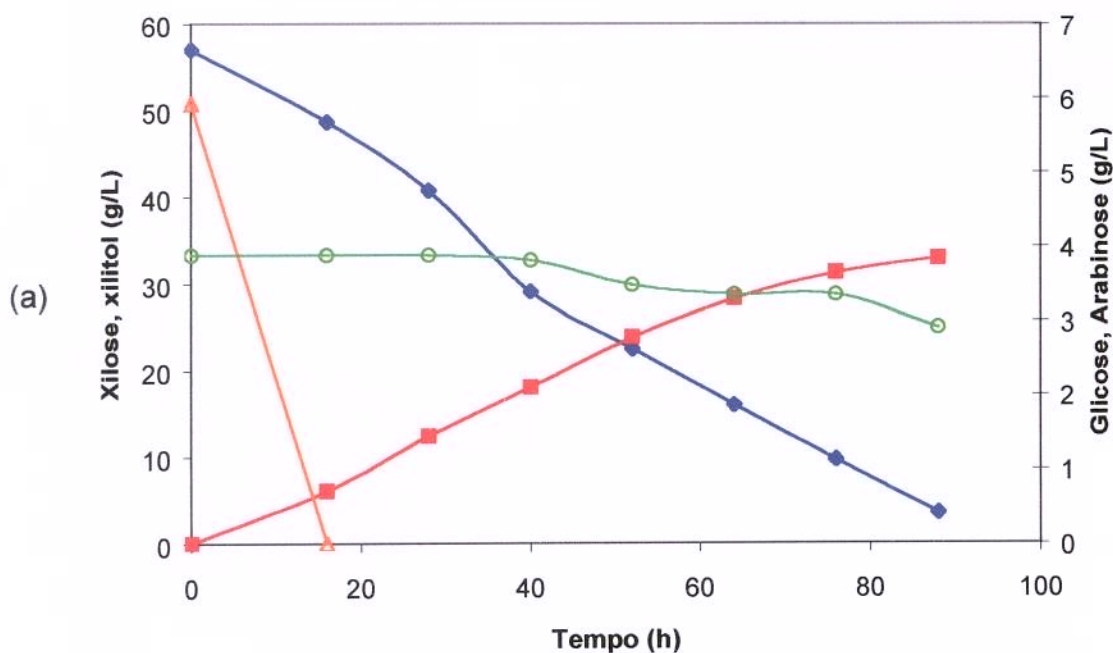


Figura 4.4: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 4: 35°C e 57 g/L de xilose

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

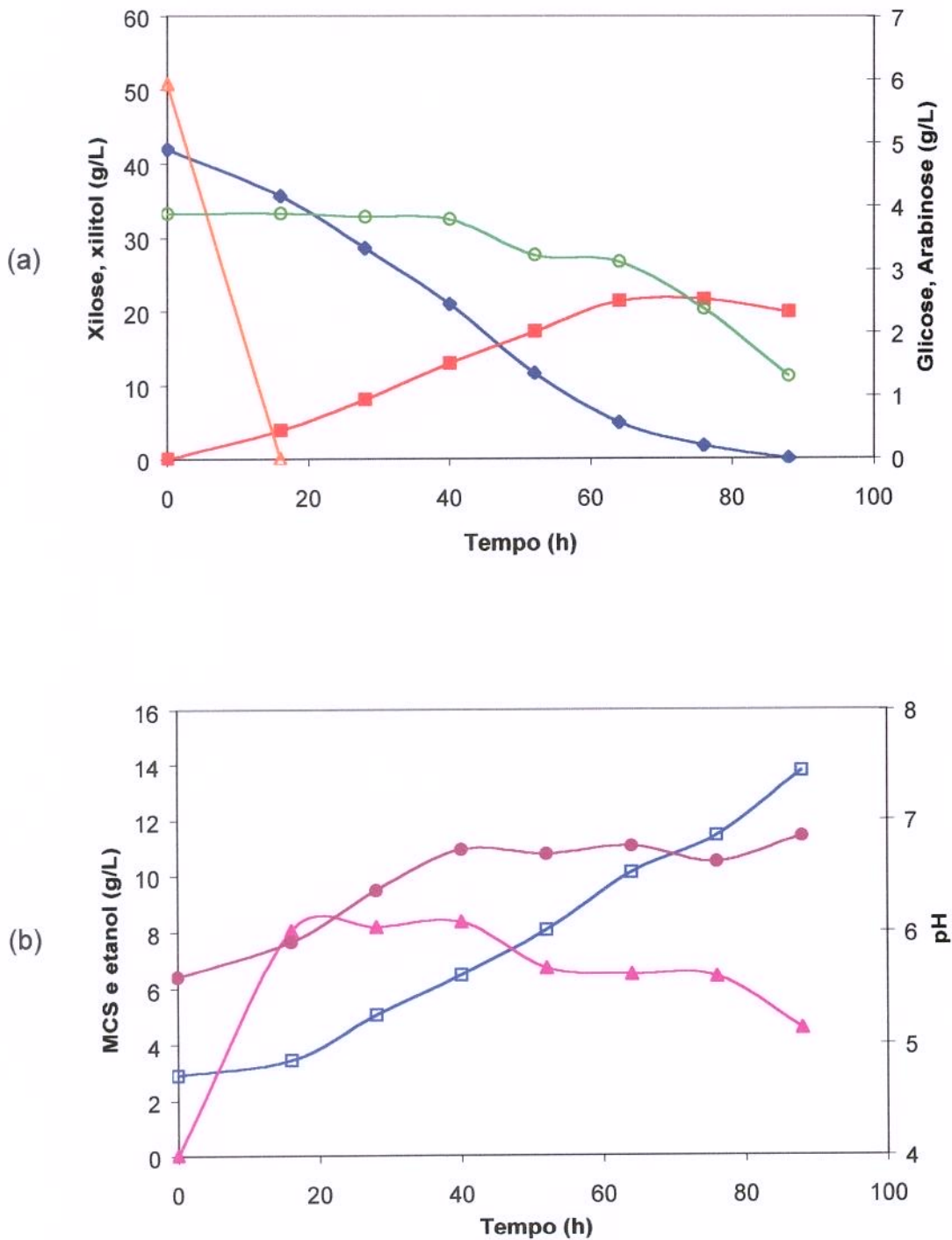


Figura 4.5: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 5: 23°C e 42 g/L de xilose

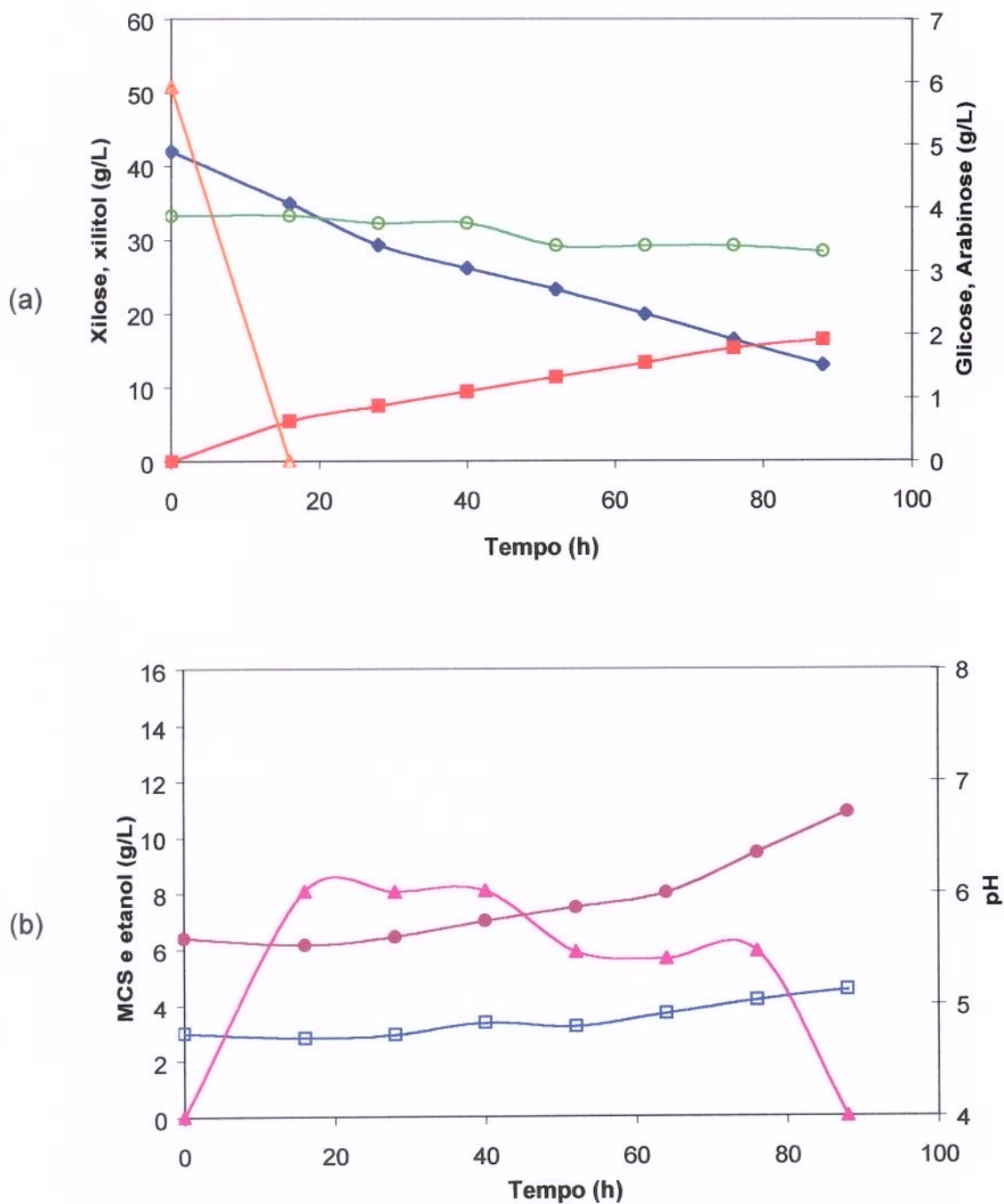


Figura 4.6: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 6: 37°C e 42 g/L de xilose

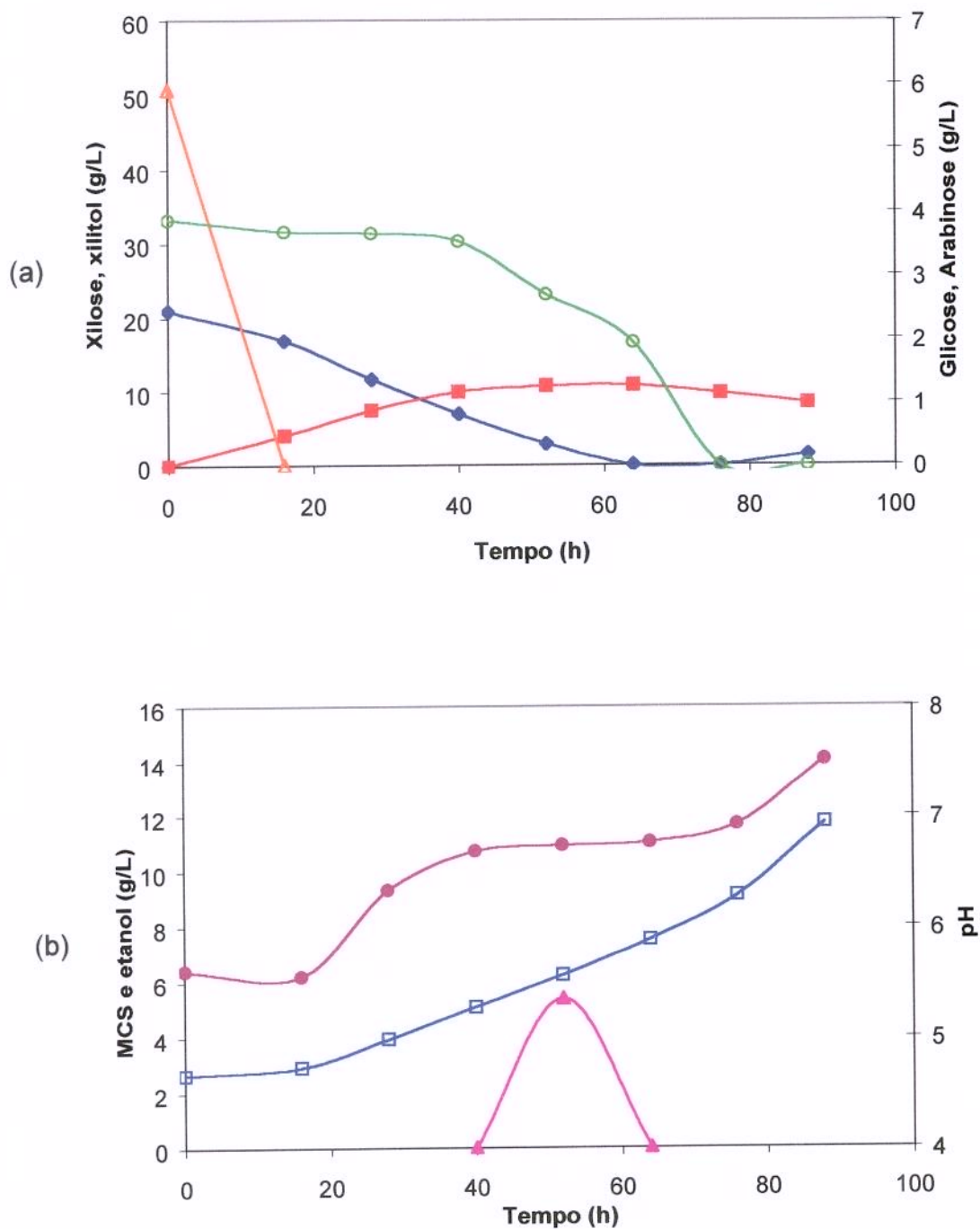


Figura 4.7: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 7: 30°C e 21 g/L de xilose

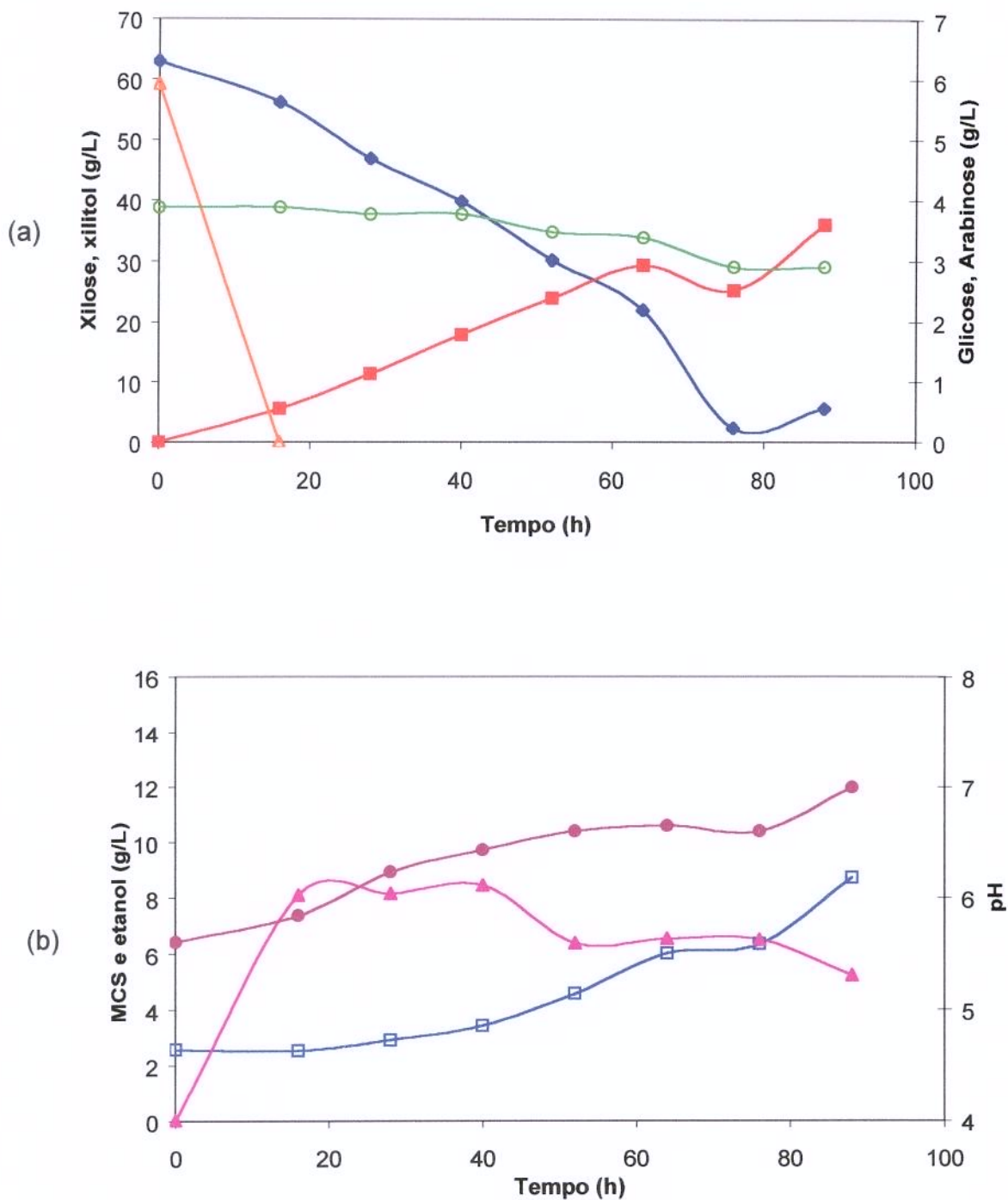


Figura 4.8: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamento 8: 30°C e 63 g/L de xilose

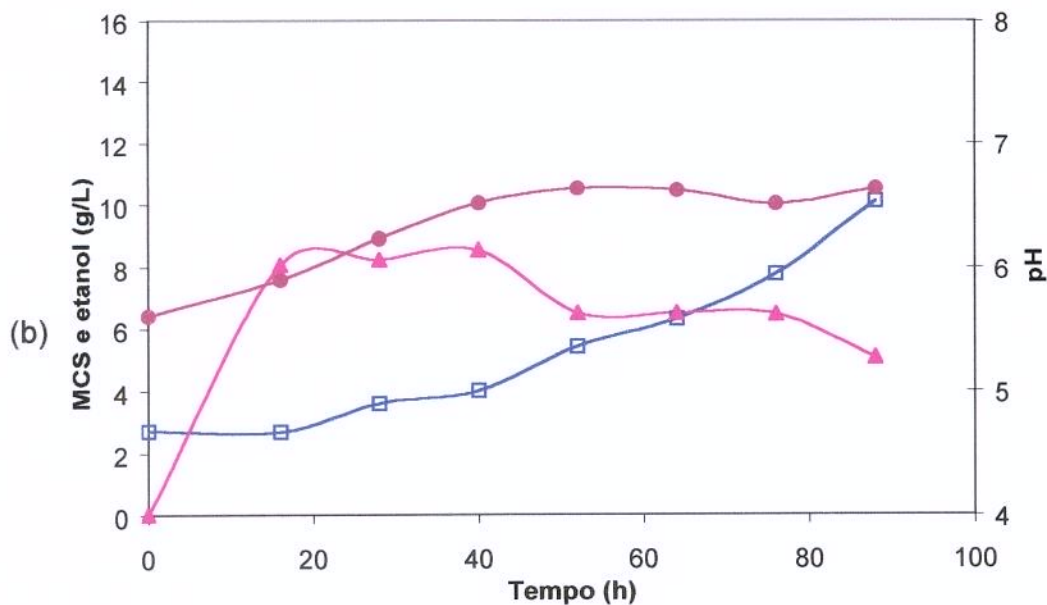
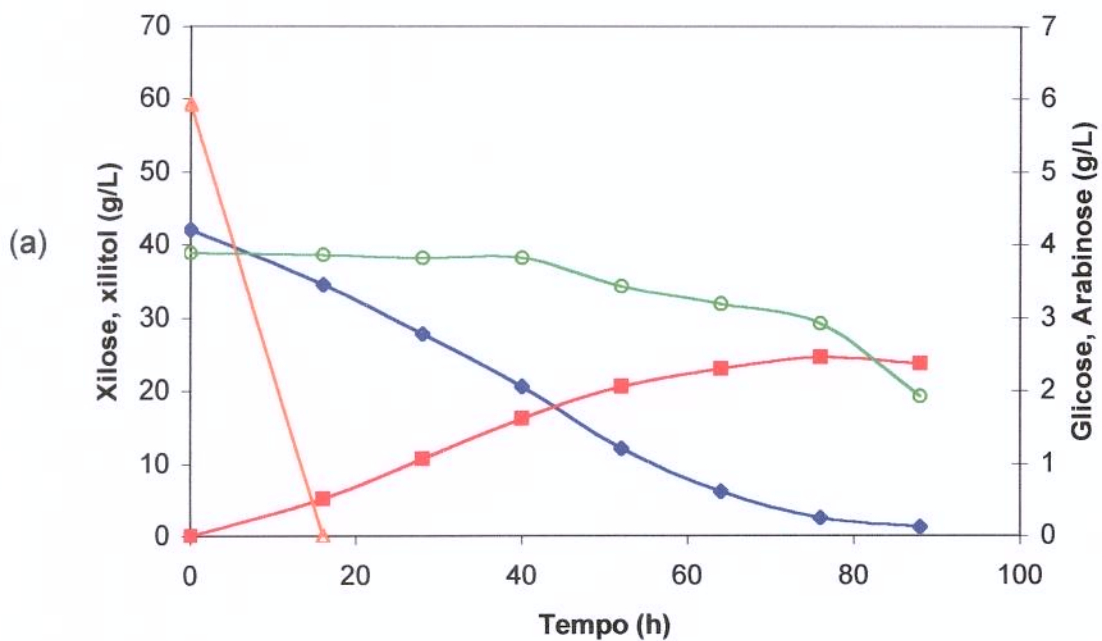


Figura 4.9: (a) Consumo de xilose (◆), glicose (△) e arabinose (○) e produção de xilitol (■); (b) produção de etanol (▲), MCS-massa celular seca (□) e pH (●), por *Candida parapsilosis* IZ 1710 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de do bagaço de cana-de-açúcar. Tratamentos 9, 10 e 11 (pontos centrais): 30°C e 42 g/L de xilose.

4.3.3.4.2. Análise do rendimento e produtividade de xilitol

Dos tempos analisados, optou-se pela discussão do rendimento e produtividade de xilitol nos 4 últimos (52, 64, 76 e 88 h de fermentação), considerando que o tratamento 7 (menor concentração de xilose inicial) apresentou apenas 13,70% de xilose residual a partir de 52 h de fermentação (**Tabelas 4.4 e 4.10**).

Observa-se na **Tabela 4.10** que o melhor rendimento (0,73 g/g), foi obtido no tratamento 8, com tempo de 52 h de fermentação. Esse rendimento representa 79,61% de eficiência de conversão (η), segundo Barbosa *et al.* (1988). Resultados similares com *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* foram obtidos por Nollet *et al.* (1993, 1995), Mayerhoff *et al.* (1997) e Rodrigues *et al.* (1998), que obtiveram rendimento de 0,74, 0,75, 0,72 e 0,78 g/g, respectivamente.

Resultados inferiores foram relatados por Furlan *et al.* (1994) (0,61 g/g), Pfeifer *et al.* (1996) (0,61 g/g), Paiva *et al.* (1988) (0,33 g/g). De outra parte, Lu *et al.* (1995) relataram resultados superiores de rendimento (0,87 g/g) e eficiência (96 %) com *Candida* sp. L-102.

De acordo com a **Tabela 4.10**, a melhor produtividade (0,46 g./L.h), foi obtida nos tratamentos 4 e 8, com tempo de 52 h de fermentação. Estes resultados diferem dos reportados por Furlan *et al.* (1994); Pfeifer *et al.* (1996) e Paiva *et al.* (1988), os quais assinalaram 0,26, 0,38 e 0,27 g/L.h, respectivamente. De outra parte, Dominguez *et al.* (1996) reportaram produtividade de 0,60 g/L.h com *Candida* sp. 11-2 em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, o qual foi superior ao obtido neste trabalho.

Tabela 4.10: Delineamento fatorial 2^2 com os resultados experimentais de rendimento e produtividade de xilitol obtidos por fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por *Candida parapsilosis* IZ 1710 (continua).

Número do Tratamento	Variáveis		Respostas			
			52 h		64 h	
	A	B	Y _{P/S}	Q _{PV}	Y _{P/S}	Q _{PV}
1	25	27	0,58	0,27	0,65	0,22
2	25	57	0,57	0,38	0,60	0,40
3	35	27	0,63	0,29	0,62	0,24
4	35	57	0,69	0,46	0,69	0,44
5	23	42	0,57	0,33	0,58	0,33
6	37	42	0,60	0,22	0,60	0,21
7	30	21	0,59	0,21	0,51	0,17
8	30	63	0,73	0,46	0,72	0,46
9 ⁽¹⁾	30	42	0,73	0,41	0,65	0,37
10 ⁽¹⁾	30	42	0,66	0,38	0,62	0,35
11 ⁽¹⁾	30	42	0,68	0,39	0,65	0,36

(1)-ponto central; (A)-temperatura (°C); (B)-concentração de xilose (g/L).

Tabela 4.10: (continuação) Delineamento fatorial 2^2 com os resultados experimentais de rendimento e produtividade de xilitol obtidos por fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por *Candida parapsilosis* IZ 1710.

Número do Tratamento	Variáveis		Respostas			
			76 h		88 h	
	A	B	Y _{P/S}	Q _{PV}	Y _{P/S}	Q _{PV}
1	25	27	0,47	0,17	0,37	0,11
2	25	57	0,60	0,40	0,54	0,34
3	35	27	0,54	0,19	0,50	0,15
4	35	57	0,66	0,41	0,61	0,37
5	23	42	0,54	0,28	0,47	0,23
6	37	42	0,59	0,20	0,56	0,19
7	30	21	0,46	0,13	0,43	0,10
8	30	63	0,42	0,33	0,63	0,41
9 ⁽¹⁾	30	42	0,62	0,33	0,58	0,27
10 ⁽¹⁾	30	42	0,63	0,33	0,57	0,26
11 ⁽¹⁾	30	42	0,61	0,31	0,59	0,27

(1)-ponto central; (A)-temperatura (°C); (B)-concentração de xilose (g/L).

4.3.3.4.3. Análise estatística da produção de xilitol

Dos tempos de fermentação analisados, no item anterior, optou-se pela análise estatística dos 4 últimos (52, 64, 76 e 88 h), os quais apresentaram maiores consumos de xilose e conseqüentemente maiores produções de xilitol.

Os resultados da produção de xilitol com 52 h de fermentação pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 se encontram na **Tabela 4.11**. Os modelos de regressões elaborados a partir dos dados experimentais foram definidos através da análise de variância (ANOVA) e da equação de regressão que expressa a variação de xilitol em função das duas variáveis do processo de fermentação (temperatura e concentração inicial de xilose), encontram-se nos **Anexos 4.1** e **4.2**.

O modelo de regressão completo (Anexo 4.1) apresentou coeficiente de correlação ($R^2=0,8135$), que explica 81,35 % da variação da produção de xilitol. Entretanto, a regressão correspondente não foi significativa ($F_c = 4,36$; $F_t = 5,05$). Isso indica a necessidade de um ajuste do modelo, que consiste na eliminação dos efeitos não significativos da equação da regressão, ao nível de 95 % de confiança (Box & Wetez, 1973).

O modelo ajustado (Anexo 4.2), mostrou pequeno declínio no coeficiente de correlação ($R^2=0,7742$), mas o valor de F_c foi significativo ($F_c = 13,71$; $F_t = 4,46$) e a falta de ajuste não significativo ($F_c = 12,99$; $F_t = 19,33$). Embora este modelo apresente regressão significativa e não exista evidência de falta de ajuste, o mesmo pode ser utilizado apenas para estabelecer a tendência da resposta na região estudada, vez que o F_c da regressão não foi altamente significativo (Box & Wetez, 1973).

A estimativa dos efeitos (Anexo 4.9, Figuras 4.11 e 4.13), indica que a produção de xilitol no tempo analisado, revelou-se dependente das duas variáveis, sendo que a concentração de xilose proporcionou efeito de maior significância (de primeira ordem), enquanto a temperatura proporcionou efeito de segunda ordem de acordo com a probabilidade P.

As Figuras 4.10 e 4.12 mostram o efeito da temperatura e da concentração de xilose na produção de xilitol com 52 h de fermentação. Como já anteriormente observado, as maiores produções de xilitol corresponderam a concentrações mais altas de xilose, enquanto o efeito da temperatura situou-se na região de 30 a 35°C.

Os resultados da produção de xilitol com 64 h de fermentação pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 encontram-se na Tabela 4.11. Os modelos de regressão elaborados a partir dos dados experimentais foram definidos através da análise de variância (ANOVA) e da equação de regressão que expressa a variação de xilitol em função das duas variáveis do processo de fermentação (temperatura e concentração inicial de xilose), se encontram nos Anexos 4.3 e 4.4.

O modelo de regressão completo (Anexo 4.3) apresentou coeficiente de correlação ($R^2=0,8973$), que explica 89,73 % da variação da produção de xilitol. Apesar da regressão correspondente ter sido significativa ($F_c = 8,74$; $F_t = 5,05$), o modelo apresenta evidente falta de ajuste ($F_c = 27,70$; $F_t = 19,16$). Optando-se, neste caso, pelo ajuste desse modelo.

O modelo ajustado (Anexo 4.4), mostrou ligeiro declínio no coeficiente de correlação ($R^2=0,8685$), mas devido o valor de F_c ter sido altamente significativo ($F_c = 26,42$; $F_t = 4,46$), o modelo não apresentou evidência de falta de ajuste ($F_c = 17,83$; $F_t = 19,33$). Nessas condições, pode-se utilizar a equação do modelo ajustado com fins preditivos na região estudada. De acordo com Box & Wetz (1973) para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil com fins preditivos, o valor da razão QMR/QMr deve ser de 4 a 5 vezes ao valor de F_t . Tal condição foi atendida nas condições aqui analisadas.

A estimativa dos efeitos (Anexo 4.9, Figuras 4.15 e 4.17), indica que a produção de xilitol no tempo 64 h de fermentação, revelou-se dependente das duas variáveis, sendo que a concentração de xilose proporcionou efeito de maior significância (de primeira ordem), enquanto a temperatura proporcionou efeito de segunda ordem ($p \leq 0,05$).

As **Figuras 4.14 e 4.16** apresentam os diagramas da superfície de resposta correspondentes aos modelos completo e ajustado, respectivamente. Nota-se que os efeitos da temperatura e da concentração de xilose influenciaram na produção de xilitol. Como já anteriormente observado, as maiores produções de xilitol corresponderam a concentrações mais altas de xilose (acima do ponto +1), enquanto o efeito da temperatura situou-se na faixa de 28 a 34°C.

Os valores obtidos para xilitol com 76 h de fermentação pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 são apresentados na **Tabela 4.11**. Os modelos de regressão elaborados a partir dos dados experimentais foram definidos através da análise de variância (ANOVA) e da equação de regressão que expressa a variação da concentração de xilitol em função das duas variáveis do processo de fermentação (**Anexos 4.5 e 4.6**).

De acordo com o modelo de regressão completo (**Anexo 4.5**) o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,8583, explicando 85,83 % da variação da produção de xilitol. Apesar da regressão correspondente ter sido significativa ($F_c = 6,05$; $F_t = 5,05$), o modelo apresenta evidente falta de ajuste ($F_c = 197,86$; $F_t = 19,16$). Tais valores levam à necessidade de se elaborar um modelo ajustado, desprezando-se os efeitos não significativos.

O modelo ajustado (**Anexo 4.6**), apesar de praticamente não ter alterado o coeficiente de correlação ($R^2=0,8576$), mostrou pouca melhoria na regressão e na falta de ajuste. O valor de F_c da regressão foi significativo ($F_c = 9,03$; $F_t = 4,53$), todavia o modelo apresentou evidência de falta de ajuste ($F_c = 149,04$; $F_t = 19,25$). Nessas condições, não se pode utilizar a equação do modelo ajustado com fins preditivos na região estudada (Box & Wetz, 1973).

A estimativa dos efeitos para os modelos completo e ajustado (**Anexo 4.9, Figuras 4.19 e 4.21**), indicam que a produção de xilitol no tempo 76 h de fermentação, revelou-se dependente das duas variáveis, sendo que a xilose, como já anteriormente observado, proporcionou efeito de maior significância (de primeira e segunda ordem), enquanto a temperatura, apesar de também ter apresentado

efeitos linear e quadrático significativos, os valores são bem menores, de acordo com a probabilidade P.

As Figuras 5.18 e 5.20 apresentam os diagramas da superfície de resposta correspondentes aos modelos completo e ajustado, respectivamente. Nota-se que os efeitos da temperatura e da concentração de xilose influenciaram na produção de xilitol. Como já anteriormente observado, as maiores produções de xilitol corresponderam a concentrações mais altas de xilose (acima do ponto central), enquanto o efeito da temperatura situou-se na região de 25 a 35°C.

A partir dos resultados experimentais (**Tabela 4.11**) estabeleceu-se o modelo de regressão completo (**Anexo 4.7**) para xilitol produzido no tempo de 88 h de fermentação. Verifica-se pela análise de regressão (ANOVA) que a equação de regressão foi altamente significativa ($F_c = 37,57$; $F_t = 5,05$), mas o resíduo apresentou falta de ajuste ($F_c = 40,59$; $F_t = 19,16$). O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9741$) indicou um excelente ajuste aos dados experimentais.

A eliminação dos coeficientes não significativos através do Programa Statistica, permitiu a obtenção do modelo ajustado (**Anexo 4.8**). A análise de variância correspondente a este modelo não apresentou alteração do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9727$), além de ter apresentado acentuada melhoria na significância da regressão ($F_c = 146,28$; $F_t = 4,46$). De outra parte, o resíduo apresenta falta de ajuste significativo ($F_c = 21,42$; $F_t = 19,33$), mas este fato pode ser considerado irrelevante, uma vez que a significância é devida ao baixo erro experimental mostrado pela ANOVA ajustada (**Anexo 4.8**), conforme Waszczyński *et al.*, citado por Céspedes (1999). Como a regressão foi altamente significativa, pode-se considerar o modelo ajustado com fins preditivos na região estudada.

A estimativa dos efeitos para os modelos completo e ajustado (**Anexo 4.9**, Figuras 4.23 e 4.25), indicam que a produção de xilitol no tempo 88 h de fermentação, revelou-se dependente das duas variáveis, sendo que a xilose, como já anteriormente observado, proporcionou efeito de maior significância (de primeira ordem), enquanto a temperatura apresentou efeito quadrático significativo de acordo com a probabilidade P.

As Figuras 5.22 e 5.24 apresentam os diagramas da superfície de resposta correspondentes aos modelos completo e ajustado, respectivamente. Nota-se que os efeitos da temperatura e da concentração de xilose influenciaram na produção de xilitol. Como já anteriormente observado, as maiores produções de xilitol corresponderam a concentrações mais altas de xilose (acima do ponto central), enquanto o efeito da temperatura situou-se na região de 25 a 35°C.

Tabela 4.11: Delineamento fatorial 2^2 com os resultados experimentais de produção de xilitol obtidos por fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar por *Candida parapsilosis* IZ 1710, nos tempos de 52, 64, 76 e 88 h.

Número do Tratamento	Variáveis Independentes		Respostas (g/L)			
	A	B	Xilitol 52 h	Xilitol 64 h	Xilitol 76 h	Xilitol 88 h
1	25	27	13,97	13,97	12,58	10,03
2	25	57	19,70	25,71	30,52	30,00
3	35	27	15,29	15,44	14,48	13,62
4	35	57	23,83	28,22	31,23	32,89
5	23	42	17,26	21,37	21,64	19,91
6	37	42	11,35	13,27	15,24	16,38
7	30	21	10,69	10,80	9,71	8,41
8	30	63	23,91	29,36	25,22	36,05
9 ⁽¹⁾	30	42	21,36	23,42	24,80	23,74
10 ⁽¹⁾	30	42	19,82	22,18	24,77	23,31
11 ⁽¹⁾	30	42	20,41	23,34	24,17	24,14

(1)-ponto central; (A)-temperatura (°C); (B)-concentração de xilose (g/L).

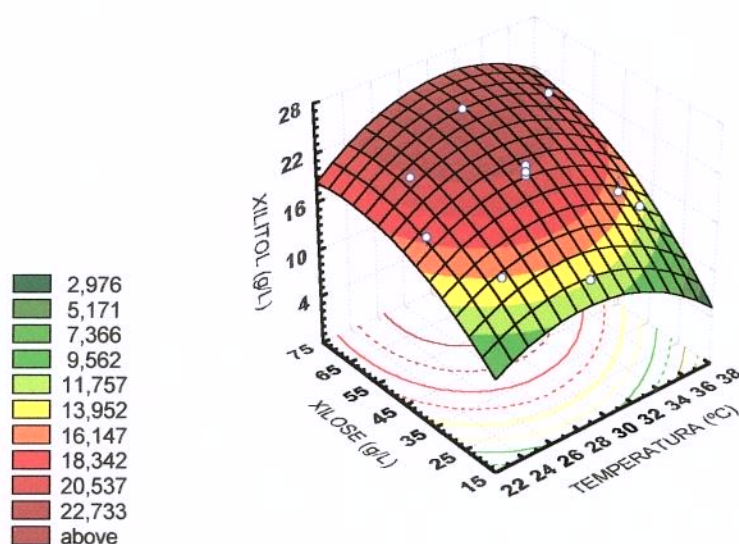


Figura 4.10: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 52 horas de fermentação. Modelo completo.

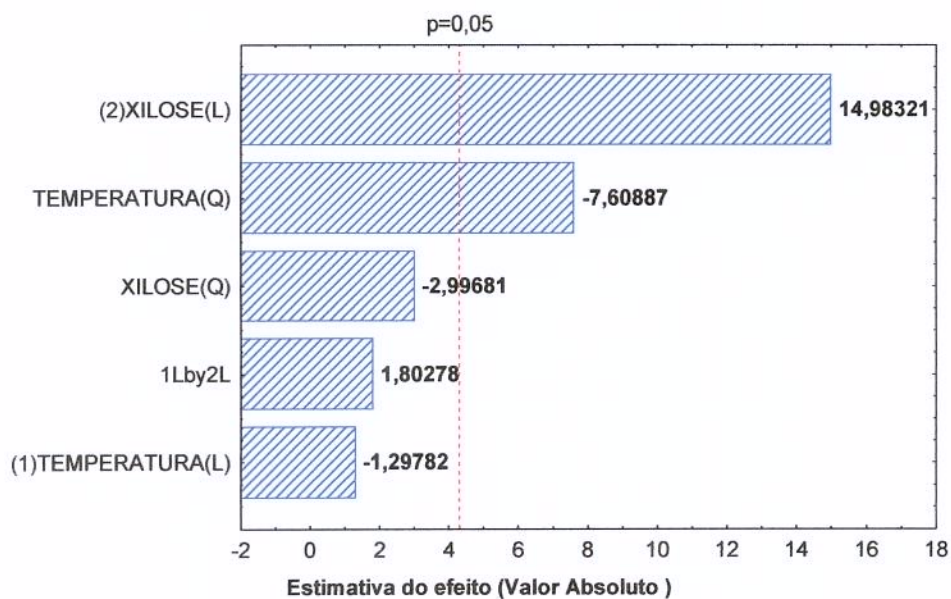


Figura 4.11: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 52 horas de fermentação. Modelo completo.

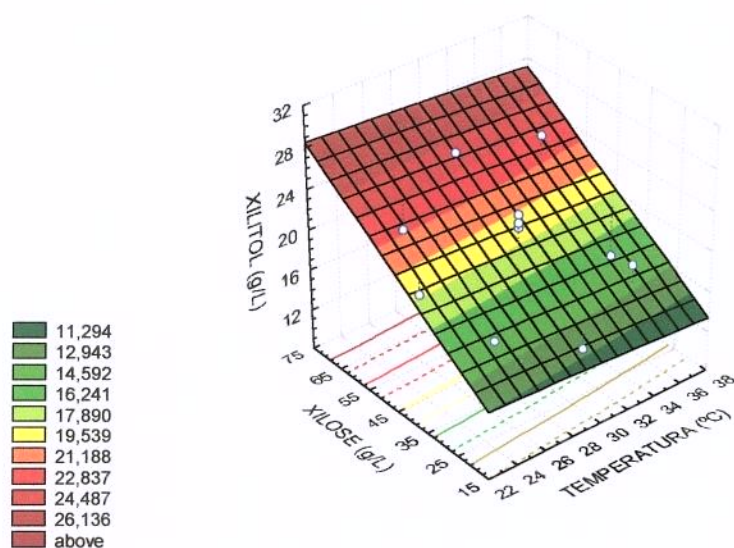


Figura 4.12: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 52 horas de fermentação. Modelo ajustado.

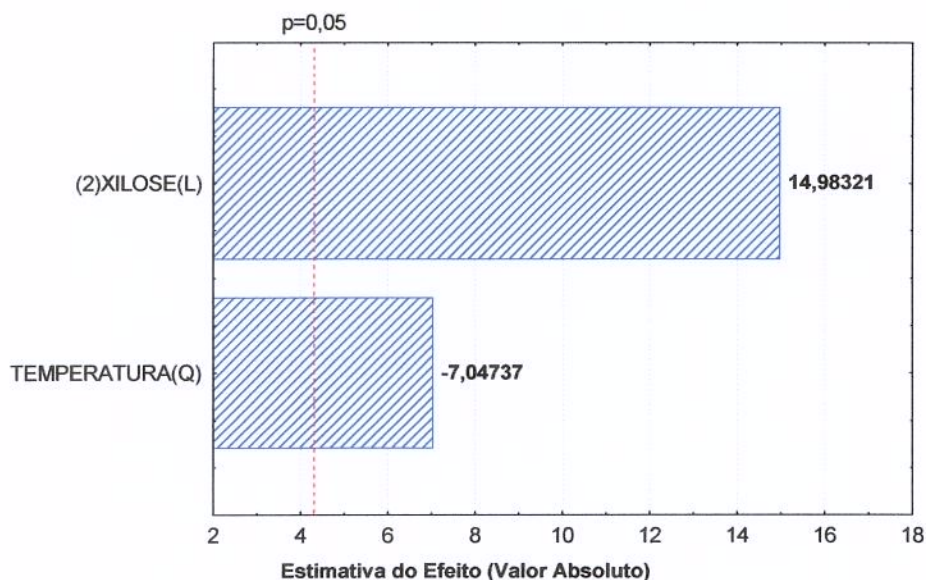


Figura 4.13: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 52 horas de fermentação. Modelo ajustado.

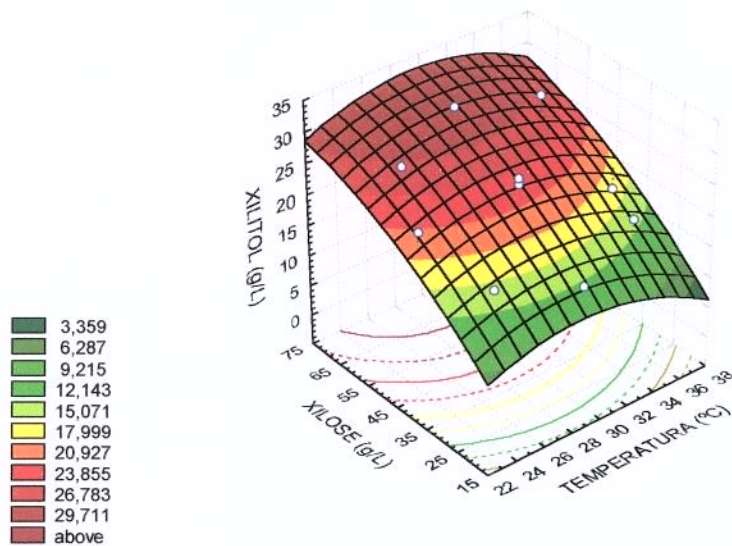


Figura 4.14: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 64 horas de fermentação. Modelo completo.

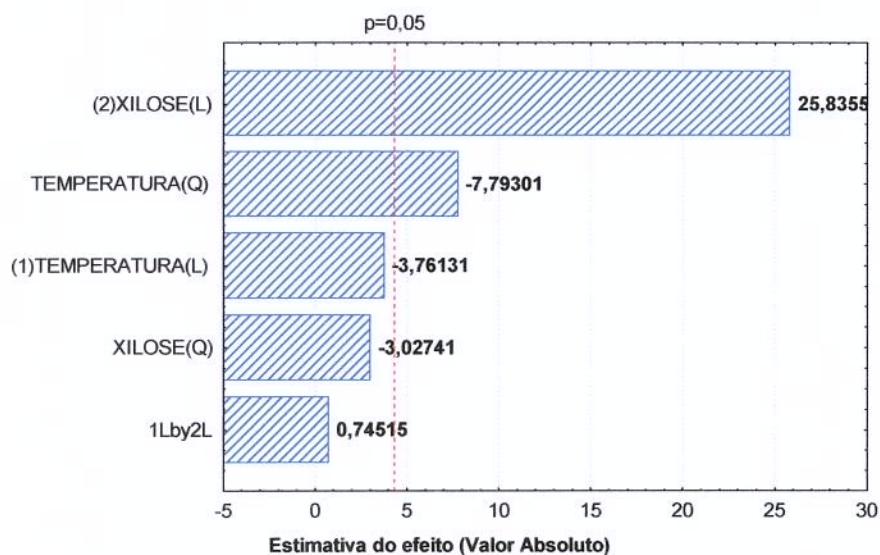


Figura 4.15: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 64 horas de fermentação. Modelo completo.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

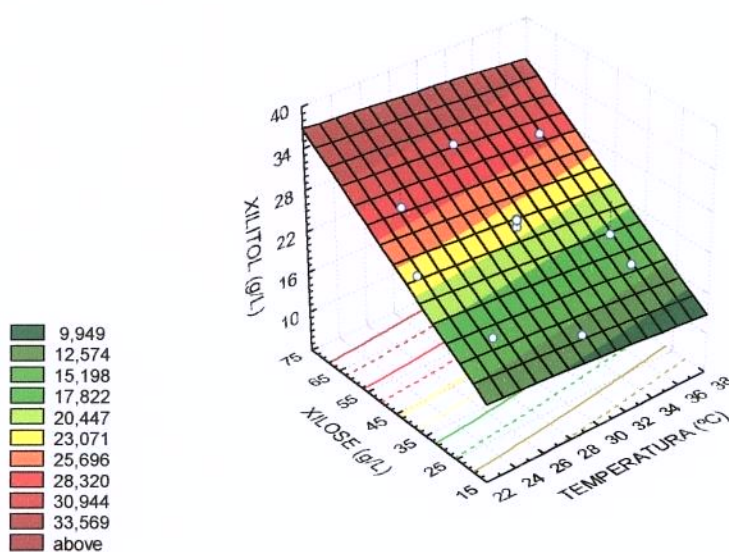


Figura 4.16: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 64 horas de fermentação. Modelo ajustado.

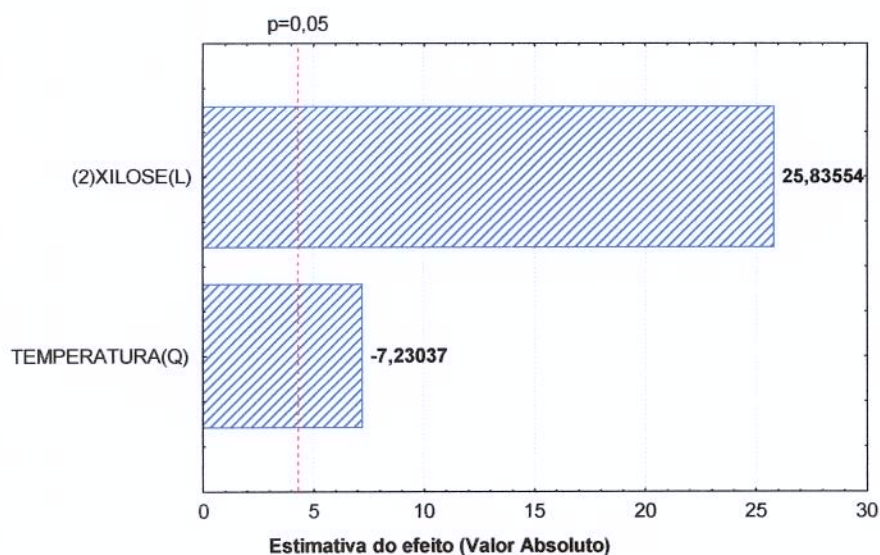


Figura 4.17: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 64 horas de fermentação. Modelo ajustado.

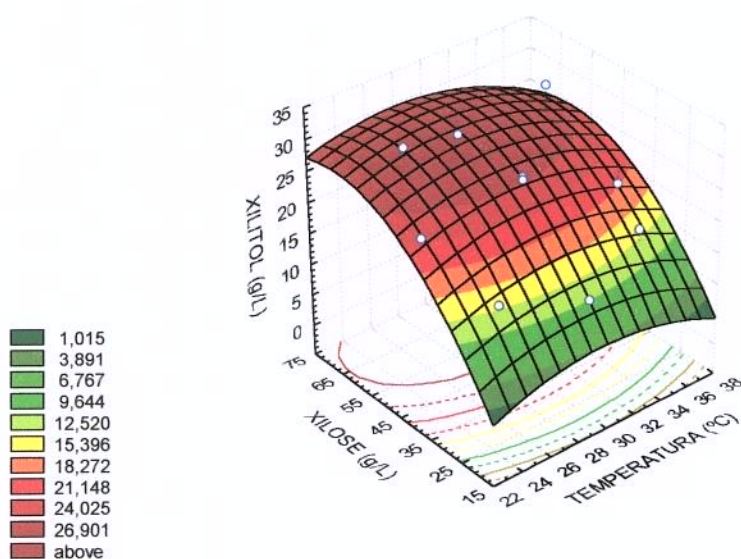


Figura 4.18: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 76 horas de fermentação. Modelo completo.

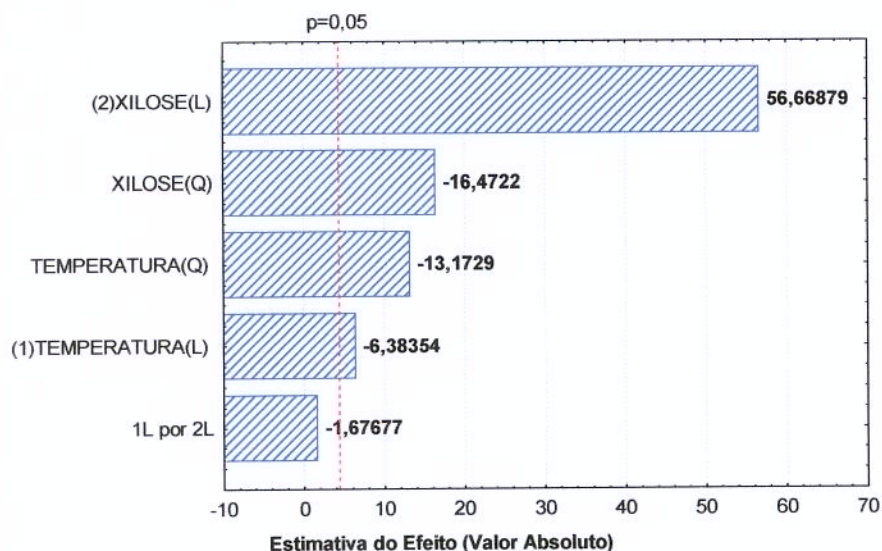


Figura 4.19: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 76 horas de fermentação. Modelo completo.

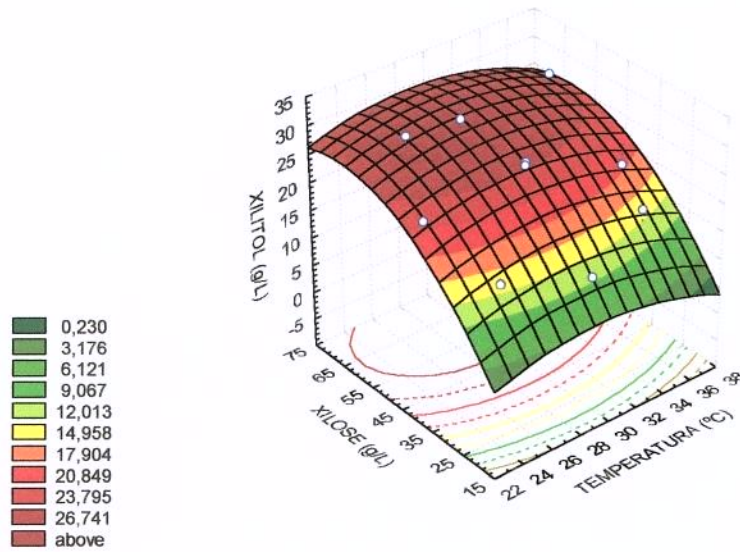


Figura 4.20: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 76 horas de fermentação. Modelo ajustado.

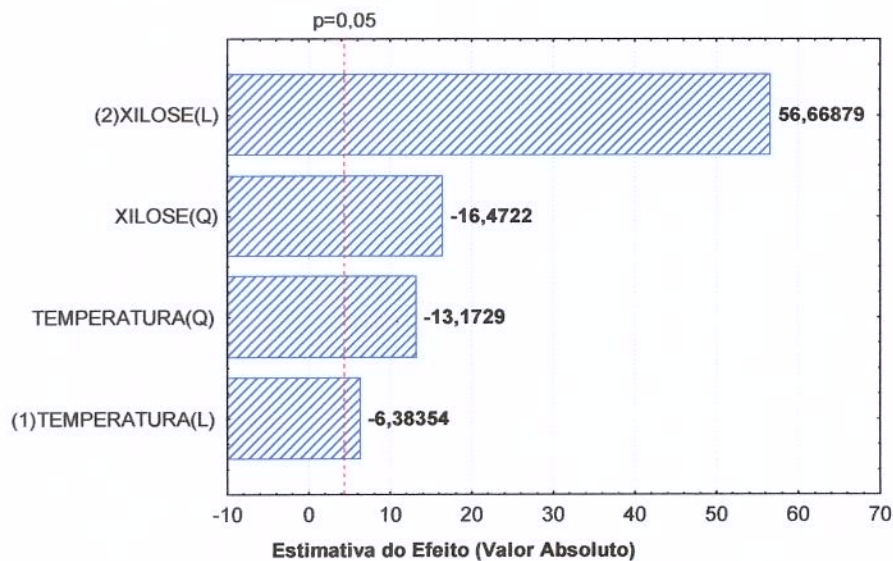


Figura 4.21: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 76 horas de fermentação. Modelo ajustado.

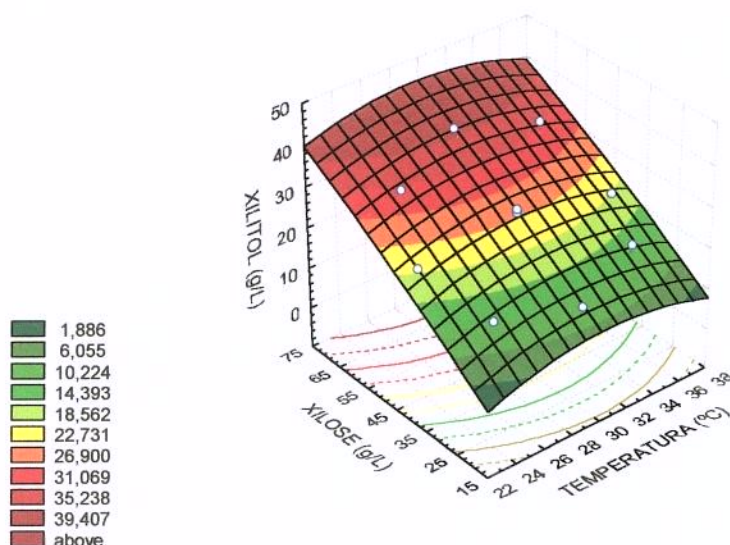


Figura 4.22: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 88 horas de fermentação. Modelo completo.

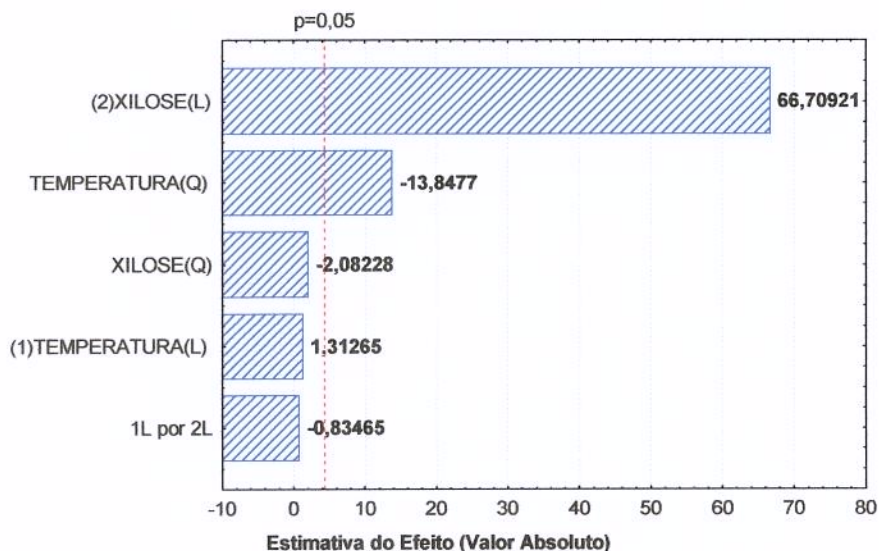


Figura 4.23: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 88 horas de fermentação. Modelo completo.

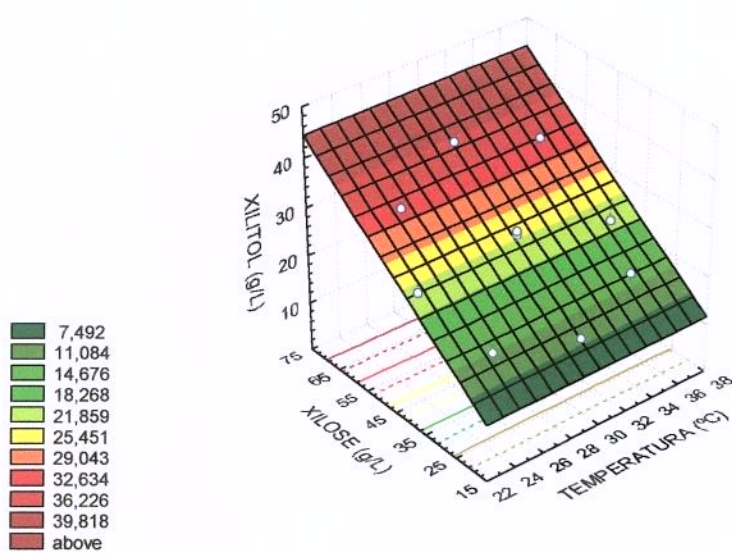


Figura 4.24: Superfície de resposta referente aos efeitos de temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 88 horas de fermentação. Modelo ajustado.

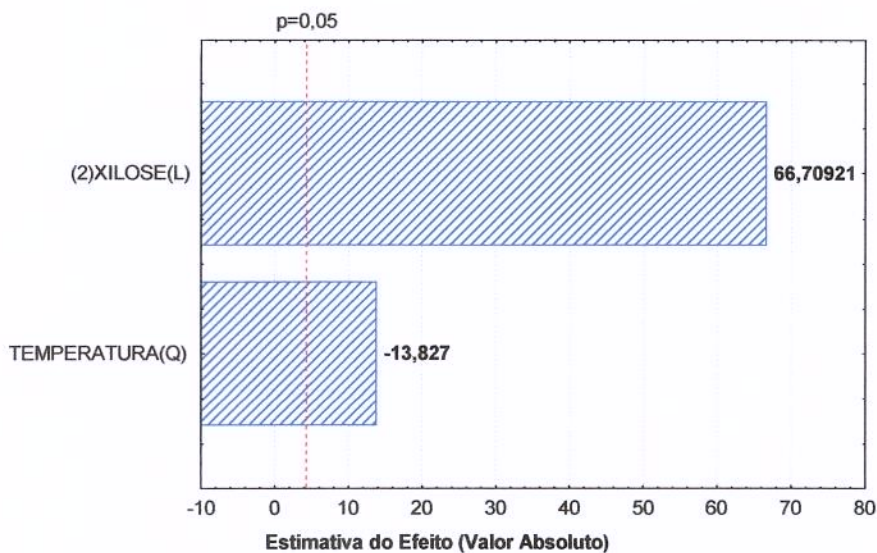


Figura 4.25: Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura e concentração inicial de xilose na produção de xitol, com 88 horas de fermentação. Modelo ajustado.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

4.4. Conclusões

A análise dos dados experimentais obtidos referentes as melhores condições de crescimento de *Candida parapsilosis* IZ 1710 e produção de xilitol permite concluir que:

- As condições empregadas na hidrólise seletivas do bagaço de cana-de-açúcar foram adequadas para recuperação de 93,12% da fração hemicelulósica;
- A hidrólise possibilitou a obtenção de três monossacarídeos (xilose, glicose e arabinose), na proporção de 79, 13 e 8%, respectivamente;
- O valor de pH inicial do meio de cultura que proporcionou maior produção de xilitol situou-se na faixa de 4,82 a 6,32 ($p \leq 0,05$);
- As condições de aeração que proporcionaram melhor produção, rendimento e produtividade de xilitol foram a 200 rpm (Erlenmeyer não aletado) e 100 rpm (Erlenmeyer aletado);
- O meio de cultura que apresentou as melhores condições de produção de xilitol foi o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com extrato de levedura (0,3%); peptona bacteriológica (0,3%); $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ (0,2%) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1%);
- A presença de Mg^{2+} influenciou positivamente a conversão de xilose em xilitol;
- Em função da variação do pH durante o período de fermentação, pode-se afirmar que *Candida parapsilosis* IZ 1710 foi capaz de assimilar o ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico;
- A formação de xilitol por *Candida parapsilosis* IZ 1710 indica que não está diretamente relacionada ao crescimento celular;
- Toda glicose presente no meio foi consumida pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 nas primeiras 16 horas de fermentação em todos os tratamentos analisados;

- Pelo emprego da análise estatística, verifica-se que as variáveis estudadas (temperatura e concentração inicial de xilose) têm efeito significativo na produção de xilitol em todos os tempos de fermentação (52, 64, 76 e 88 horas);
- A estimativa do efeito linear da concentração de xilose foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tempos analisados;
- A estimativa do efeito quadrático da temperatura foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tempos estudados;
- Os parâmetros mais adequados para a otimização do processo de fermentação e que proporcionaram maior produção de xilitol (36,05 g/L) corresponderam aos empregados no tratamento 8 (30°C e 63 g/L de xilose), com 88 horas de fermentação. Nessas mesmas condições, o melhor rendimento (0,73 g/g), maior eficiência de conversão (79,6 %) e produtividade (0,46 g/Lh) foi obtido com 52 horas de fermentação.

4.5. Referências Bibliográficas

- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed. Unicamp. Campinas São Paulo, Brasil, 1996, 299 p.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**: an introduction to design, data analysis, and model building. New York: Wiley and Sons, 1978, 653 p.
- BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function, University of Wisconsin. **Tecnial Report**. v. 9, 1973.
- CÉSPEDES, M. A. L. Otimização do processo de extrusão da polpa de laranja: modificação das propriedades funcionais e sua aplicação como fonte de fibra alimentar. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas-SP, 1999, 163 p.
- COCHRAN, B. Y.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2 ed. New York: John Wiley, 1964.
- DAHIYA, J. S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 14-18, 1991.
- DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C. S.; 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.

- EMODI, A. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technology**, v. 32, n. 1, p. 28-32, 1978.
- FELIPE, M. G. A.; ALVES, L. A.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 6, n. 2,3, p. 281-283, 1996.
- FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. ; ROSA, S. A. M. Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolizate of hemicellulose obtained from sugar cane bagasse. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 103-114, 1993.
- FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D. C.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal Basic Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 82-86, 1991.
- FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.4, p.251-254, 1997.
- FURLAN, S. A.; BOUILLAUD, P.; CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 657-662, 1994.
- FURLAN, S.; BOUILLAUD, P.; STREHAIANO, P.; RIBA, J. P. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 203-206, 1991.
- HORITSU, H.; YAHASHI, Y.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, n. 3, p. 248-253, 1992.

- HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 373-403, 1982.
- LACÔRTE, M. C.; BURGI, R.; LACÔRTE, A. J. F. Bagaço de cana hidrolisado já utilizado em larga escala em confinamento. **STAB**, v. 5, n. 2, p. 43-52, 1986.
- LU, J.; TSAL, L. B.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida Sp.* L-102. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 167-170, 1995.
- MAHLER, G. F.; GUEBEL, D. V. Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipits* NRRL Y-7124. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 407-412, 1994.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. . **Biotechnology Letters**, v. 19 n. 5, p. 407-409, 1997.
- McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J. D. B.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 62, n. 1, p. 1-20, 1993.
- MERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the AACC**, 8 ed. Saint Paul, v. 1-2, 1995.
- MEYER, P. S.; du PREEZ, J. C.; KILIAN, S. Cultivation of *Candida blankii* in simulated bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 109-113, 1992.
- MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-Xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 281-286, 1991.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; DELGENES, J. P.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 191-197, 1993.

- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOU, L.; NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 4, p. 417-422, 1995.
- PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; PETRAUSKAS, T. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Optimization of D-xylose, L-arabinose and D-glucose production obtained from sugar cane bagasse hydrolysis process. **6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Guaratinguetá, SP, Brazil, 1999.
- PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; PETRAUSKAS, T. M.; SCAMPARINI, A. R. P. . Influência da composição do meio na produção de xilitol por *Candida tropicalis* IZ1824. **VI Mostra de Trabalhos Científicos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos-Unicamp, Campinas, 1998.
- PARAJÓ, J. C.; DOMINGUÉZ, H.; DOMINGUÉZ, J. M. Xylitol from wood: study of some operational strategies. **Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 531-535, 1996.
- PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 59, n. 4, p. 501-506, 1998.
- PESSOA JUNIOR, A. Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1991, 187 p.
- PFEIFER, M. J.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 423-430, 1996.

- PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8 n. 6, p. 360-364, 1986.
- PREZIOSI-BELLO, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21 n. 2, p. 124-129, 1997.
- PURCHASE, B. S. Products from sugarcane. **International Sugar Journal**, v. 97, n. 1154, p. 70-72, 77-81, 1995.
- ROBERTO, I. C. ; SATO, S. ; MANCILHA, I. M. ; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.17, n. 11, p. 1223-1228, 1995a.
- ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 3, p. 271-275, 1991.
- ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. 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, n. 2-3, p. 255-257, 1995b.
- RODRIGUES, D. C. G. A. Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo alimentado. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, SP, 104 p., 1997.
- RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 73-77, 1998.

- ROLZ, C.; ARRIOLA, M. C.; VALLADARES, J.; CABRERA, S. Effects of some physical and chemical pretreatments on the composition, enzymatic hydrolysis and digestibility of lignocellulosic sugar cane residue. **Process Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 17-23, 1987.
- SASKA, M.; OZER, E. Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 45, n. 6, p. 517-523, 1994.
- SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. Tese de Doutorado. Instituto de Química-UNICAMP, Campinas-SP, 1995, 106 p.
- TAVARES, J. M.; DUARTE, M.T.; COLLAÇO, A.; GÍRIO, F. M. The influence of addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 743-747, 2000.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VAN ZYL, C. V.; PRIOR, B. A.; Du PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, p. 357-369, 1988.
- VAN ZYL, C.; PRIOR, B. A.; du PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, n. 3, p. 248-253, 1992.

4.6. Anexos

Anexo 4.1: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 52 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = -75,7598 + 5,5894*A - 0,1009*A^2 + 0,3665*B - 0,044*B^2 + 0,0093*A*B$$

$$R^2 = 0,8135$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	173,99	5	34,80	4,36	5,05
Resíduo	39,88	5	7,98		
Falta de Ajuste	38,68	3	12,89	21,48	19,16
Erro Puro	1,20	2	0,60		
Total	213,87	10	-		

Anexo 4.2: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 52 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = 7,8985 - 0,0016*A^2 + 0,2758*B$$

$$R^2 = 0,7742$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	165,5765	2	82,7882	13,71	4,46
Resíduos	48,2963	8	6,0370		
Falta de Ajuste	47,0884	6	7,8481	12,99	19,33
Erro Puro	1,2079	2	0,6039		
Total	213,8728	10	-		

Anexo 4.3: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 64 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = -75,1217 + 5,2100 \cdot A - 0,0923 \cdot A^2 + 0,6540 \cdot B - 0,0040 \cdot B^2 + 0,003542 \cdot A \cdot B$$

$$R^2 = 0,8973$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	358,6645	5	71,7329	8,74	5,05
Resíduo	41,0454	5	8,2091		
Falta de Ajuste	40,0808	3	13,3603	27,70	19,16
Erro Puro	0,9646	2	0,4823		
Total	399,7099	10	-		

Anexo 4.4: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 64 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = 6,0122 - 0,0035 \cdot A^2 + 0,4250 \cdot B$$

$$R^2 = 0,8685$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	347,1525	2	173,5762	26,42	4,46
Resíduo	52,5574	8	6,5697		
Falta de Ajuste	51,5928	6	8,5988	17,83	19,33
Erro Puro	0,9646	2	0,4823		
Total	399,7099	10	-		

Anexo 4.5: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 76 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = - 86,6018 + 4,7748*A - 0,0795*A^2 + 1,5210*B - 0,0110*B^2 - 0,0040*A*B$$

$$R^2 = 0,8583$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	450,8348	5	90,1670	6,05	5,05
Resíduo	74,4474	5	14,8895		
Falta de Ajuste	74,1973	3	24,7324	197,86	19,16
Erro Puro	0,2501	2	0,1250		
Total	525,2822	10	-		

Anexo 4.6: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 76 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = - 81,6206 + 4,6087*A - 0,0795*A^2 + 1,4024*B - 0,0110*B^2$$

$$R^2 = 0,8576$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	450,4832	4	112,6208	9,03	4,53
Resíduo	74,7990	6	12,4665		
Falta de Ajuste	74,5489	4	18,6372	149,04	19,25
Erro Puro	0,2501	2	0,1250		
Total	525,2822	10	-		

Anexo 4.7: Análise de variância para modelo de regressão completo, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 88 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = -99,0833 + 6,0209*A - 0,0981*A^2 + 0,8630*B - 0,0016*B^2 - 0,0023*A*B$$

$$R^2 = 0,9741$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	801,0715	5	160,2143	37,57	5,05
Resíduo	21,3236	5	4,2647		
Falta de Ajuste	20,9789	3	6,9930	40,59	19,16
Erro Puro	0,3447	2	0,60		
Total	822,3951	10	-		

Anexo 4.8: Análise de variância para modelo de regressão ajustado, correspondente à produção de xilitol, no tempo de 88 horas de fermentação.

$$\text{Xilitol (g/L)} = -6,013 + 0,00015*A^2 + 0,6560*B$$

$$R^2 = 0,9727$$

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regressão	822,3951	2	411,1975	146,28	4,46
Resíduo	22,4879	8	2,8110		
Falta de Ajuste	22,1432	6	3,6905	21,42	19,33
Erro Puro	0,3447	2	0,1723		
Total	822,3951	10	-		

Anexo 4.9: Análise de significância das variáveis independentes (modelo completo), na produção de xilitol nos tempos de 52, 64, 76 e 88 horas de fermentação.

Efeito das variáveis independentes	Níveis de Significância ($p \leq 0,05$)			
	Xilitol 52 h	Xilitol 64 h	Xilitol 76 h	Xilitol 88 h
Intercepto	0,0005	0,0003	0,0001	0,0001
(1) Temperatura (L)	N.S.	N.S.	0,0237	N.S.
Temperatura (Q)	0,0168	0,0161	0,0057	0,0052
(2) Xilose (L)	0,0044	0,0015	0,0003	0,0002
Xilose (Q)	N.S.	N.S.	0,0037	N.S.
1L versus 2L	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Anexo 4.10: Análise de significância das variáveis independentes (modelo ajustado), na produção de xilitol nos tempos de 52, 64, 76 e 88 horas de fermentação.

Efeito das variáveis independentes	Níveis de Significância ($p \leq 0,05$)			
	Xilitol 52 h	Xilitol 64 h	Xilitol 76 h	Xilitol 88 h
Intercepto	0,0003	0,0002	0,0001	0,0001
(1) Temperatura (L)	-	-	0,0237	-
Temperatura (Q)	0,0195	N.S.	0,0057	0,0052
(2) Xilose(L)	0,0015	0,0015	0,0003	0,0002
Xilose (Q)	-	-	0,0037	-
1L versus 2L	-	-	-	-

4.7. Nomenclatura

Negrito = significância a 5% de probabilidade;

A = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

B = concentração inicial de xilose (g/L)

R² = coeficiente de determinação

GL = grau de liberdade

SQ = soma dos quadrados

QM = quadrado médio

F_c = F calculado

F_t = F tabelado

L = Linear

Q = Quadrático

N. S. = Não significativo

Y_{p/s} = fator de conversão de xilose em xilitol (g/g)

M_p = massa de xilitol produzida (g/L)

M_s = massa de xilose consumida (g/L)

Q_{PV} = produtividade volumétrica de xilitol (g/L.h)

Δt_f = tempo total de fermentação

η = eficiência de conversão de xilose em xilitol = $(Y_{p/s}/0,917) \cdot 100$

5.0. Conclusões Gerais

Conforme a análise dos dados experimentais referentes a hidrólise de bagaço da cana-de-açúcar, seleção de leveduras produtoras de xilitol e as melhores condições de crescimento de *Candida parapsilosis* IZ 1710 visando a produção de xilitol, permite-se concluir que:

- O total de açúcares nas melhores condições de hidrólise (18 minutos de reação; 126°C e 3,10 % (v/v) de ácido sulfúrico), foi de 333,41 mg/g de bagaço, b.s., composto por 266,73 mg de xilose, 40,09 mg e 26,59 mg de arabinose/g de bagaço, b.s. Para a anidroxilana, os resultados representaram 96,0% do máximo teórico, enquanto para glicose foi cerca de 100,0 % da composição da hemicelulose do bagaço;
- as regressões nos tempos de 11 e 18 minutos foram altamente significativas ($p \leq 0,05$) e os modelos não apresentaram evidência de falta de ajuste. O valor de F_c foi cerca de 8 vezes maior que o F_t para o tempo de 11 minutos e para 18 minutos essa razão foi de 6,83. Isso significa que o modelo quadrático, no nível de 95,0% de confiança, foi adequado para descrever a superfície de resposta nas regiões estudadas;
- as regressões nos tempos de 30 e 50 minutos não foram significativas ($p \geq 0,05$) e os resíduos apresentaram evidente falta de ajuste, notadamente à análise de regressão no tempo de 50 minutos ($F_c=2010,81$ e $F_t=19,16$). Tais condições levam a concluir que os tempos de 30 e 50 minutos de hidrólise não foram úteis com fins preditivos e, portanto, o modelo não pode ser utilizado para prever a resposta da concentração de xilose na região estudada;
- na primeira etapa de seleção de leveduras produtoras de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, observou-se que duas (T-12 e *Pichia stipilis* CCT 2617) mostraram boa capacidade de conversão de xilose em etanol, o que representa uma alternativa a mais do uso de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar;

- nas duas primeiras etapas, a levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 apresentou produção de xilitol considerada apenas mediana. Na terceira etapa, entretanto, esse microrganismo obteve produção (22,85 g/L) e produtividade (0,31 g/L.h) estatisticamente ($p \leq 0,05$) diferentes das demais linhagens testadas. Seu rendimento foi igualado apenas pela levedura *Candida guilliermondii* IZ 1422;
- *Candida parapsilosis* IZ 1710 foi o microrganismo que produziu a menor quantidade de etanol (4,83 g/L) e uma das menores produções de biomassa (4,71 g/L);
- a faixa pH de 4,82 a 6,32, foi a que proporcionou maior produção de xilitol, ($p \leq 0,05$);
- as condições de aeração que proporcionaram melhor produção, rendimento e produtividade de xilitol foram a 200 rpm (Erlenmeyer não aletado) e 100 rpm (Erlenmeyer aletado);
- o meio de cultura que apresentou as melhores condições de produção de xilitol foi o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com extrato de levedura (0,3%); peptona bacteriológica (0,3%); $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ (0,2%) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1%);
- toda glicose presente no meio foi consumida pela levedura *Candida parapsilosis* IZ 1710 nas primeiras 16 horas de fermentação, em todos os tratamentos analisados;
- pelo emprego da análise estatística, verifica-se que as variáveis estudadas (temperatura e concentração inicial de xilose) tiveram efeito significativo na produção de xilitol, em todos os tempos de fermentações analisados (52,64, 76 e 88 horas);
- a estimativa do efeito linear da concentração de xilose foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tempos analisados;
- a estimativa do efeito quadrático da temperatura foi significativa ($p \leq 0,05$) em todos os tempos estudados;

- as condições mais adequadas para otimização do processo de fermentação e que proporcionaram maior produção de xilitol (36,05 g/L), rendimento (0,73 g/g) e produtividade (0,46 g/L.h) por *Candida parapsilosis* IZ 1710, foram estabelecidas em: 30°C e 63 g/L de xilose;
- com 88 h de fermentação, o modelo de regressão ajustado apresentou $R^2 = 0,9727$; regressão altamente significativa ($F_c = 146,28$; $F_t = 4,46$) e erro de 0,3447. Tais parâmetros indicam que o modelo é preditivo na região estudada.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

IS	Xilose M _S (g/L)	Xilitol		Etanol	
		M _{P1} (g/L)	Y _{P1/S} (g/g)	M _{P2} (g/L)	Y _{P2/S} (g/g)
	3,68	0,53	0,14	1,48	0,40
	4,57	0,53	0,12	n.d.	-
	2,61	0,51	0,20	1,49	0,57
	3,13	0,49	0,16	n.d.	-
	1,48	0,49	0,33	n.d.	-
	2,20	0,49	0,22	1,51	0,69
	2,21	0,46	0,21	n.d.	-
	5,68	0,47	0,08	0,74	0,13
	2,51	0,45	0,18	n.d.	-
	3,19	0,43	0,13	n.d.	-
	2,28	0,42	0,18	n.d.	-
	1,98	0,41	0,21	0,77	0,39
	3,33	0,41	0,12	n.d.	-
	6,44	0,38	0,06	n.d.	-
	5,89	0,37	0,06	n.d.	-
	1,04	0,36	0,15	n.d.	-
	2,38	0,36	0,15	n.d.	-
	1,86	0,33	0,18	0,75	0,40
	1,50	0,35	0,23	n.d.	-
	2,04	0,30	0,15	0,75	0,37
	1,77	0,30	0,17	n.d.	-
CT0770	1,67	0,30	0,18	n.d.	-
	4,15	0,29	0,07	n.d.	-
	1,31	0,26	0,20	0,74	0,56
69	3,44	n.d.	-	1,23	0,36