

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

Ana Flávia Batista

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR *Meyerozyma caribbica* UFMG08 A
PARTIR DA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Belo Horizonte

2016

Ana Flávia Batista

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR *Meyerozyma caribbica* UFMG08 A
PARTIR DA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo A. P. Nagem

Belo Horizonte

2016

043

Batista, Ana Flávia.

Estudo da produção de xilitol por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 a partir da otimização do processo fermentativo utilizando resíduos agroindustriais [manuscrito] / Ana Flávia Batista. – 2016.

112 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos. Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo A. P. Nagem.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Xilitol. 3. Resíduos. 4. Agroindústria. 5. Fermentação. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Nagem, Ronaldo A. P. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANA FLAVIA BATISTA

Nº REGISTRO: 2014657860

Relatora e Suplente: Dra. Raquel Miranda Cadete

Suplente externo: Dra. Beatriz Martins Borelli

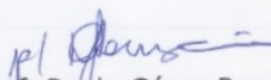
Às 14:00 horas do dia 29 de fevereiro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Co-Orientador (Departamento Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG), pelo Dr. Daniel Bonoto Gonçalves (UFSJ-MG), pela Dra. Carla Alves Lara (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e a Profa. Vera Lúcia dos Santos - Orientadora, para julgar o trabalho final "Produção de xilitol por linhagens de *Meyerozyma* sp. a partir de resíduos agroindustriais", da aluna Ana Flávia Batista, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo César Peregrino Ferreira - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2016.

Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Dr. Daniel Bonoto Gonçalves

Dra. Carla Alves Lara

Profa. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora)


Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador

RESUMO

O xilitol é um adoçante natural, anticariostático, utilizado principalmente na indústria de alimentos e farmacêutica. O seu valor econômico aliado às diversas aplicações impulsionam pesquisas biotecnológicas para aumentar sua produção. Uma alternativa promissora é a produção por meio da fermentação da xilose presente em diversos resíduos agroindustriais utilizando leveduras. O objetivo do presente trabalho foi selecionar uma levedura com alto potencial para produção de xilitol e otimizar a produção em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba e extrato de levedura de cervejaria. A partir do banco de leveduras do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG foram testadas duas linhagens de *M. caribbica* e cinco de *M. guilliermondii*, sendo selecionada a que apresentou melhores parâmetros fermentativos para a produção de xilitol, *M. caribbica* UFMG08. Foram realizados três etapas do processo de otimização: o Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) para avaliar quais fatores (aeração, concentração de xilose, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) e seus níveis resultam em maiores valores dos parâmetros fermentativos para produção de xilitol e o Delinemaneto Composto Central Rotacionado (DCCR) para estabelecer o ponto ótimo de produção a partir de modelos matemáticos preditivos. O fator aeração e a interação de fatores como a aeração, a fonte de nitrogênio e a concentração da fonte de nitrogênio influenciaram os parâmetros fermentativos para produção de xilitol. Isoladamente, o tipo de fonte de nitrogênio (comercial ou oriunda de resíduo cervejeiro) não interferiu diretamente na produção de xilitol, podendo ser utilizada a que foi obtida a partir de resíduo industrial em detrimento da comercial sem alteração na produção. Com a otimização foi possível aumentar em 13% a produção de xilitol, alcançando 60,04g/l, eficiência de conversão de açúcares a xilitol de 0,79g/g e produtividade de 0,83g/l. Esse estudo abre perspectiva para a utilização biotecnológica de leveduras para o processo de produção de xilitol, bem como para a utilização de resíduos agroindustriais para formulação de meios de cultivo.

Palavras-chave: Xilitol. Xilose Redutase. *Meyerozyma caribbica* UFMG08. Resíduos agroindustriais. Otimização.

ABSTRACT

Xylitol is a natural sweetener, anti cariostatic, used mainly in the food and pharmaceutical industries. The economic value allied to various applications boost biotech research to increase production. A viable alternative is the production by xylose fermentation present in many industrial residues using yeasts. The aim of this work was to select a yeast with high potential for xylitol production and optimize this production in culture medium formulated with presscake hemicellulose hydrolyzate and brewer's yeast extract. From Applied Microbiology Laboratory of yeast bank UFMG seven strains were tested, and selected the one with best fermentation parameters for xylitol production, *Meyerozyma caribbica* UFMG08. Three optimization processes were conducted: Fractional Factorial (DFF) and the Response Surface Methodology (RSM). The DFF to assess which factors (aeration, xylose concentration, nitrogen source and concentration of the nitrogen source) and their levels result or larger fermentation parameters for the xylitol production and the DCCR to establish an optimum point to xylitol production from predictive mathematical models. The optimization process showed that factors such as aeration and interaction of factors such as aeration, the nitrogen source and concentration of the nitrogen source influence on productive parameters for obtaining xylitol. Separately, the type of nitrogen source (commercial or resulting from brewer residue) did not interfere in the xylitol production, may be used that obtained from industrial waste without changes in production. From the optimization was increased by 13% xylitol production, increasing 60,04g/l, sugars conversion efficiency xylitol 0,79g/g and productivity 0.83g/l. This study opens up prospects for the biotechnological use of yeasts for production of xylitol process and to the use of agro-industrial wastes for the formulation of the culture medium.

Keywords: Xylitol. Xylose reductase. *Meyerozyma caribbica* UFMG08. Agroindustrial residues. Optimization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Resíduos Agroindustriais	11
3.2. Xilitol: características e aplicações	16
3.3 Obtenção de xilitol	17
3.4. Bioconversão de xilose a xilitol	19
3.5 Xilose Redutase (XR)	21
3.6. Bioprocessos	23
3.7. Cinética e Otimização de processos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Micro-organismos	25
4.2 Avaliação da capacidade fermentativa das linhagens de leveduras em estudo, utilizando xilose como fonte única de carbono.....	25
4.3 Avaliação da capacidade fermentativa de xilose das leveduras em estudo, utilizando hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado e estudo das condições reguladoras do processo	26
4.3.1.Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba	26
4.3.2 Avaliação de parâmetros fermentativos na capacidade de produção de xilitol pelas leveduras em estudo e efeito de fatores no processo	27
4.4 Otimização da produção de xilitol a partir hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba e extrato de levedura de cevejaria por <i>Meyerozyma caribbica</i> UFMG08.....	29

4.4.1 Produção de extrato de levedura a partir de biomassa celular de cervejaria	29
4.4.2 Otimização	30
4.5 Avaliação da produção da enzima xilose redutase (XR) pelas linhagens de levedura em estudo durante os processos fermentativos	34
4.5.1. Padronização do método de rompimento celular	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Padronização do método de rompimento celular	36
5.2 Avaliação da capacidade fermentativa das leveduras em estudo a partir de xilose em meio semi-sintético	38
5.3 Avaliação da capacidade fermentativa de xilose pelas leveduras em estudo, utilizando hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado, e condições reguladoras do processo fermentativo	41
5.3.1 Efeito da concentração inicial do inóculo no processo fermentativo	41
5.3.2 Efeito da aeração no processo fermentativo	50
5.3.3 Efeito das concentrações de xilose e glicose no processo fermentativo	58
5.4 Otimização da produção de xilitol a partir hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba por <i>Meyerozyma caribbica</i> UFMG08 e hidrolisado de biomassa de levedura de cervejaria	67
5.4.1.Obtenção de extrato de levedura de cervejaria	67
5.4.2 Delineamento fatorial fracionado	68
5.4.3 Delineamento Composto Central Rotacionado	80
5.4.4 Validação	91
6 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

O reaproveitamento de resíduos sólidos gerados em processos industriais tem sido um dos grandes desafios do século XXI, diante da necessidade de criação de práticas mais sustentáveis. O volume de rejeitos provenientes de indústrias e de atividade agrícola é bastante significativo, sendo gerados cerca de 13,9 bilhões de toneladas por ano no Brasil (EMBRAPA, 2012). Uma fração desses rejeitos é comumente utilizada para fabricação de insumos como ração e fertilizantes, no entanto uma grande fração ainda não possui valor agregado, sendo comumente descartada (CARVALHO, 2013). Esses resíduos, em sua maioria, são constituídos basicamente por lignina, celulose e hemicelulose, ou seja, uma biomassa rica em pentoses e hexoses que podem constituir substratos ideais para produção catalisada por micro-organismos de diversos produtos de valor comercial, incluindo o etanol e o xilitol.

O xilitol é um poliálcool que possui aplicações em diferentes segmentos industriais, sendo considerado como substituinte para a sacarose devido ao seu alto poder adoçante, além de ser bem tolerado por diabéticos (EMODI, 1978). Sua elevada estabilidade química faz com que mesmo em baixas concentrações ele seja um bom conservante alimentício e aumente a vida de prateleira de diversos alimentos (BAR, 1991). O consumo mundial de xilitol em 2005 foi de 43.000t, sendo a Europa e os Estados Unidos os maiores consumidores (KADAM et al., 2008).

Em escala comercial, o xilitol é produzido por processo químico, por meio de hidrogenação catalítica da xilose pura, proveniente de materiais lignocelulósicos contendo altos teores de xilana. Para a obtenção de uma xilose com elevado grau de pureza é necessário realizar operações de troca iônica, descoloração, fracionamento cromatográfico, purificação e cristalização, resultando em um custo de produção muito elevado (HYVONEM et al., 1982).

Nesse contexto, pesquisas vêm sendo direcionadas para viabilizar a produção de xilitol por meio de processo biotecnológico, alternativa que poderia reduzir os custos do processo em escala industrial (HEIKKILA et al., 1992). Os micro-organismos mais utilizados nesse processo são as leveduras, cujo cultivo é realizado em hidrolisados obtidos de diferentes matérias-primas, tais como a palha de arroz, o bagaço de cana-de-açúcar e a madeira de

eucalipto (MUSSATO; MARTON; CANILHA, 2002). O processo biotecnológico é uma boa alternativa ao método químico, pois dispensa o uso de catalisador metálico, a purificação inicial da xilose, a qual é convertida em xilitol no próprio hidrolisado e utiliza enzimas ou micro-organismos específicos que atuam somente na conversão de xilose em xilitol. Esse tipo de produção leva a um maior rendimento e facilita a separação do produto obtido (MUSSATO, ROBERTO, 2002).

Diversas espécies de leveduras são conhecidas pela capacidade de fermentar pentoses, principalmente as do gênero *Candida*, destacando-se na produção de xilitol (PAPINI, 2012). Espécies como *Candida athensensis*, *Meyerozyma (Candida) guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha* e *Debaryomyces hansenii* são descritas na literatura, com alta capacidade de consumo de xilose e produção de xilitol, sendo a primeira uma das melhores produtoras descritas, alcançando uma produção de 100,1g/l de xilitol (ZHANG et AL., 2012; BARBOSA et al., 1988; GONG et al., 1981; GUO et al., 2006; SURYADI et al., 2000; SAMPAIO et al., 2008).

Apesar das vantagens, a obtenção de xilitol por via biotecnológica está associada à capacidade dos micro-organismos de expressarem a enzima xilose redutase (XR) que catalisa a redução de xilose a xilitol com a participação dos cofatores NADPH ou NADH (VERDUYN et al., 1985). O xilitol, composto relativamente estável, é secretado pela célula, ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), cuja atividade requer os cofatores NAD ou NADP. A produção de xilitol depende, portanto, de uma elevada atividade da enzima XR ou de uma baixa atividade da enzima XDH (ROSEIRO et al., 1991).

Além da necessidade de se obter micro-organismos adequados, a via biotecnológica de produção de xilitol possui fatores que limitam a obtenção de uma quantidade significativa de produto final. Esses fatores incluem o controle preciso das condições de pH, temperatura, agitação e da presença de inibidores (SILVA et al., 2007). Diante disso, esforços têm sido direcionados para a otimização das condições de cultivo e estabelecimento de melhores parâmetros fermentativos (SILVA et al., 2007).

Diante do potencial de produção de xilitol apresentado por diversas leveduras, a proposta do presente trabalho é selecionar uma linhagem de levedura com alto potencial de produção de

xilitol e otimizar a produção utilizando meio de cultivo formulado a base de resíduos agroindustriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de produção de xilitol por *Meyerozyma* sp. por meio da otimização do processo fermentativo utilizando meio de cultivo formulado com o uso resíduos agroindustriais.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar por meio de ensaios fermentativos uma linhagem de levedura com alta produção de xilitol a partir da coleção de isolados de levedura do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG;
- Obter hidrolisado hemicelulósico da torta de macaúba e caracterizá-lo quanto ao teor de açúcares;
- Estudar a influência dos fatores aeração, concentração do inóculo inicial e concentração de xilose do meio de cultivo sobre os parâmetros fermentativos apresentados pelas linhagens durante cultivo em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba;
- Obter extrato de levedura de cervejaria e caracterizá-lo quanto aos teores de nitrogênio e proteínas totais;
- Estudar, por meio de um delineamento fatorial fracionado misto, os fatores que influenciam nos parâmetros de produção xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba por *M. caribbica* UFMG08;
- Estudar, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta, o efeito dos fatores sobre os parâmetros fermentativos de produção de xilitol por *M. caribbica* UFMG08;
- Otimizar a produção de etanol e xilitol por *M. caribbica* UFMG08 em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba;

- Validar as condições ótimas da produção de xilitol por *M. caribbica* UFMG08 em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba e extrato de levedura de cervejaria.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resíduos Agroindustriais

O Brasil se destaca no mercado mundial na produção de diversos produtos agrícolas e industriais, com a geração de cerca de 13,9 bilhões de toneladas de resíduos por ano, os quais não são totalmente reaproveitados e necessitam de destinação adequada devido às questões ambientais (EMBRAPA, 2012). O grande volume descartado em local inapropriado e a composição química desses resíduos constitui problema ao meio ambiente, pois durante o processo de decomposição levam à produção de gases, causando intensificação do efeito estufa, além de causar mau cheiro, potencializar a proliferação de insetos e contaminar água e solo (OKANO et al., 2006).

Nos últimos anos os resíduos passaram a ser considerados como substratos para a produção de novos produtos, por representarem uma matéria prima rica em substâncias de alto valor nutricional, energético e econômico (PELIZER, 2007; LAUFENBERG, 2003). A reutilização desses resíduos pode levar à produção de diversos itens com alto valor agregado, como biocombustíveis, insumos químicos, enzimas, fertilizantes, além de outros para consumo humano e animal, como o xilitol e a ração para gado, respectivamente (LOURENÇO, 2009). Diante desses aspectos, o reaproveitamento dessa biomassa residual ajuda a minimizar problemas ambientais, além de gerar produtos com diversas aplicações industriais (SANTOS, 2002).

A biomassa residual inclui materiais como as palhas de arroz e de milho, o bagaço de cana-de-açúcar, a torta de macaúba e resíduos de cervejaria (CARVALHO, 2003). No Brasil são produzidos anualmente 13,7 bilhões de litros de cerveja dos quais se recupera de 15 a 30kg de levedura por metro cúbico de álcool (SINDCERV, 2012). Esse tipo de biomassa é economicamente importante, pois representa um subproduto do processo industrial obtido a baixo custo e que pode ser utilizado como fonte proteica se processado adequadamente (OLIVEIRA, 2001). De forma geral, apresentam, em base seca, cerca de 40% de sua composição em proteínas, 5 a 8% de nitrogênio, 45 a 55% de carboidratos e até 10% de minerais como fósforo, potássio, cálcio, magnésio e selênio (YAMADA et al., 2003;

SARWAR et al., 1985; BUTOLO, 1996; SGARBIEIR et al., 1999; HALASZ & LASZTITY, 1991). Devido ao seu alto valor nutritivo, os resíduos de cervejaria estão sendo comumente utilizados como aditivos em diversos produtos, principalmente os alimentícios, como a biomassa de levedura, comumente utilizada como aditivo em ração animal, sendo a espécie mais estudada para esse fim a *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir da biomassa de levedura é possível obter o extrato de levedura por meio de autólise, plasmólise ou processos combinados. A autólise ocorre pela ação de enzimas endógenas em pH e temperatura específicas, processo no qual podem ser adicionados plasmolizantes como o cloreto de sódio e solventes orgânicos (BEHALOVA et al., 1991; DE ROOIJ & HAKART, 1985). A composição química do extrato depende da qualidade da biomassa utilizada e do processo de ruptura celular (DZIEZAK, 1987). O extrato vem sendo utilizado no Brasil pelos setores de embutidos e produtos cárneos, biscoitos e massa de tomate (REVILLION et al., 2000). Também tem sido utilizado como suplemento em meios de cultivo de microorganismos. Em 2008, Martins (2008) utilizou extrato de levedura residual de cervejaria na produção de bioinseticida por *Bacillus sphaericus*.

O bagaço de cana, resíduo fibroso obtido pelo processamento da cana-de-açúcar, é um dos principais subprodutos lignocelulósicos da agroindústria brasileira. É frequentemente citado na literatura como um material muito promissor para a obtenção de açúcares, que podem ser transformados a etanol ou outros compostos químicos, uma vez que é uma boa fonte de xilose. A macaúba (*Acrocomia aculeata*), palmeira nativa de florestas tropicais, é um vegetal perene e com grande potencial para a produção de biodiesel a partir do óleo extraído de seus frutos. No processo de prensa do fruto para obtenção do óleo e produção de biodiesel também são obtidos resíduos lignocelulósicos, como a torta de macaúba, a qual pode ser reaproveitada para a produção de diversos compostos como o etanol e o xilitol (LORENZI, 2006).

A biomassa lignocelulósica é formada por fibras que são constituídas principalmente por lignina (15 a 30%), celulose (20 a 60%) e hemicelulose (20 a 30%). Esses constituintes apresentam-se em proporção variada em cada material, o que é diretamente influenciado por fatores genéticos e ambientais, e que estão relacionados ao potencial uso desses materiais como matéria prima sustentável (Figura 1) (CARVALHO, 2003).

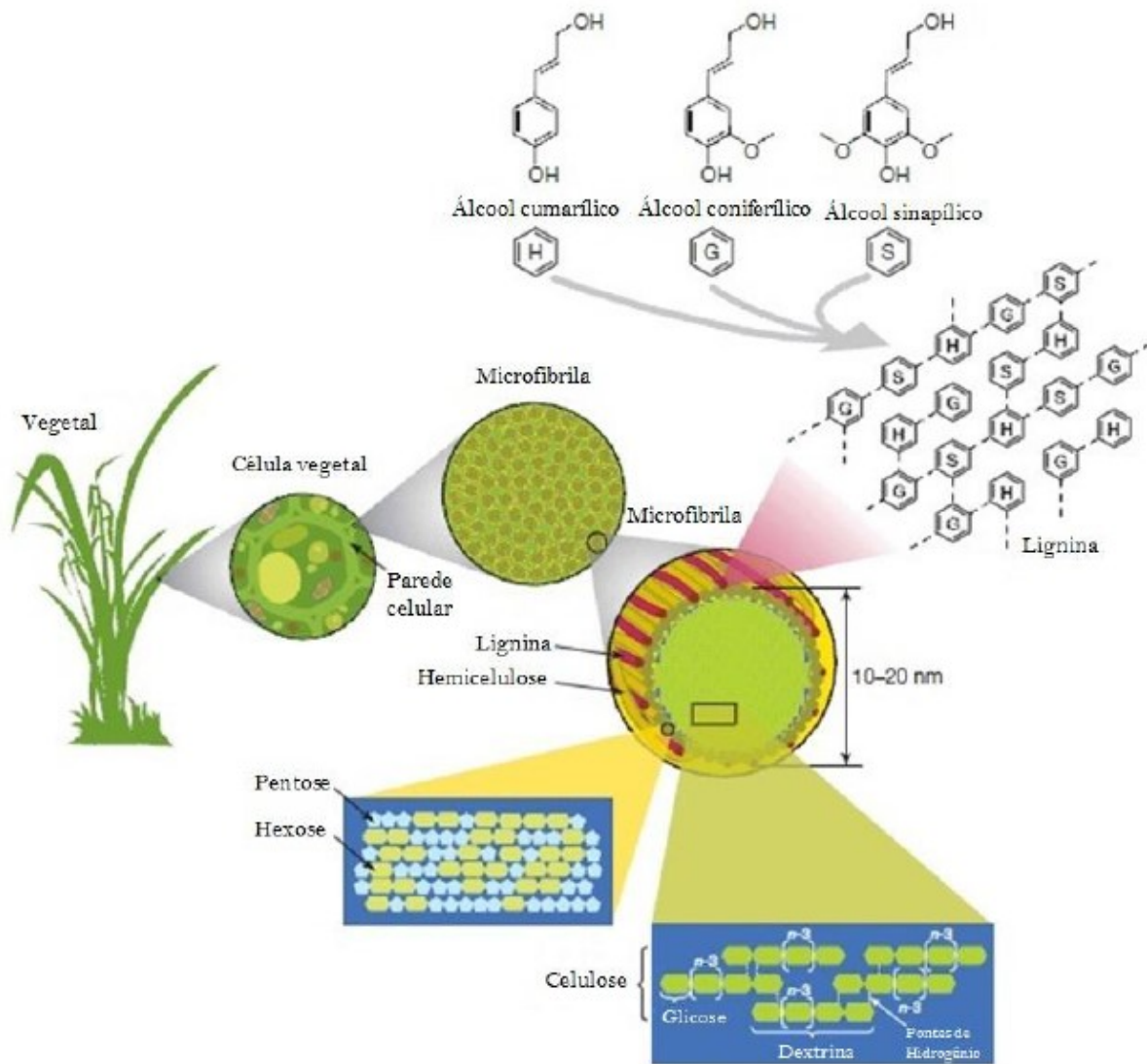


Figura 1: Esquema estrutural da biomassa residual lignocelulósica (Adaptado de RUBIN, 2008).

A celulose é o principal componente da fibra, sendo um polímero constituído por unidades de glicose, possuindo duas frações: a amorfa, a qual é facilmente hidrolisável e a cristalina a qual é muito resistente (OLIVERIO, 2004). As interações intermoleculares promovem a formação de fibrila elementar e estes agregados conferem resistência à tensão e à degradação microbiana e tornam a celulose insolúvel (GOLDSTEIN, 1981). É o principal componente da parede estrutural dos vegetais, desempenhando um papel estrutural.

As hemiceluloses ou polioses também são polissacarídeos, porém, são ramificados e formados por diferentes açúcares, principalmente pelas pentoses D-xilose e L-arabinose, pelas hexoses D-glicose, D-manose e D-galactose, além de ácidos glicurônicos (FENGEL, 1989).

São bastante hidrofílicas, apresentam baixa massa molecular e ramificações em suas cadeias, possuindo dessa forma, natureza amorfa (ROWELL, 2005). Elas estão depositadas de forma intercalada entre as microfibrilas de celulose, conferindo elasticidade e flexibilidade à fibra vegetal (AGUIAR, 2010).

A lignina é uma macromolécula aromática e de composição química complexa, formada por unidades de fenilpropano (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (FENGE, WEGNER, 1983). Sua estrutura é amorfa e altamente ramificada, sendo um material de baixa densidade. É responsável pela coesão, rigidez e resistência das fibras de celulose por envolvê-las, podendo também formar ligações covalentes com as hemiceluloses, o que também confere rigidez e baixa reatividade às fibras vegetais (GOLDESTAIN, 1981; ARANTES, 2010).

A biomassa residual apresenta constituição ideal para o uso em processos fermentativos, porém, uma das limitações para o seu aproveitamento integral é a sua própria estrutura, na qual a celulose apresenta-se recoberta por uma matriz de lignina e hemicelulose, dificultando a degradação em fontes de carbono utilizáveis em processos fermentativos (WEGENER, 1989).

Diante desses aspectos, para a utilização desses materiais em processos fermentativos são necessários pré-tratamentos, que podem ser físicos, químicos, biológicos, ou a combinação desses. Os pré-tratamentos tem a finalidade de reduzir a estabilidade das fibras e as interações entre a celulose, a hemicelulose e a lignina, tornando a biomassa mais acessível à ação das enzimas hidrolíticas destes homo e heteropolissacarídeos (JORGENSEN, 2007). Diversos métodos têm sido empregados para a hidrólise da biomassa, dentre esses, os mais comumente utilizados são a hidrólise ácida (ALVES et al., 1998), a explosão a vapor (MOISER et al., 2005) e a hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010).

A hidrólise ácida é o processo no qual, ácidos sulfúricos, clorídricos, fosfóricos ou nítricos, em baixa concentração, são empregados à biomassa lignocelulósica para solubilizá-la. Durante a hidrólise, ocorre também a precipitação da lignina, o que torna a biomassa resultante mais acessível a enzimas que hidrolisam a celulose (ALVES et al., 1998). O processo é geralmente realizado em autoclave, gerando compostos tóxicos como o furfural e o hidroximetilfurfural, além de outros compostos fenólicos. Esses compostos tóxicos interferem

diretamente nos processos fermentativos por diminuir ou inibir o crescimento celular. A remoção ou diminuição da concentração deles é realizada por meio de processos de detoxificação, como o que utiliza carvão ativado (GROHMANN et al., 1984).

Na explosão a vapor, temperaturas entre 160 e 200°C e pressões entre 5 a 10kgf/cm² são aplicadas a biomassa, durante alguns poucos minutos, para posterior descompressão (MOSIER et al., 2005). Durante esse pré-tratamento, ocorrem modificações físicas e químicas na biomassa, resultando na solubilização da hemicelulose. Também ocorre o aumento da área superficial da celulose e conseqüentemente o aumento da suscetibilidade à hidrólise enzimática. Pré-tratamentos que utilizam fortes descompressões são considerados os mais eficientes. Catalisadores ácidos e básicos podem ser adicionados para aumentar a suscetibilidade dos polissacarídeos à hidrólise (PITARELO, 2007).

Outra estratégia para liberação dos açúcares fermentáveis presentes nessa biomassa requer, após pré-tratamento, o uso de complexos enzimáticos (ALVIRA et al., 2010). Para hidrólise enzimática da celulose, são utilizadas endo-1,4-β-D-glucanases, que são responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias de glicose; exo-1,4-β-D-glucanases que agem na despolimerização gradativa das regiões terminais da cadeia de celulose, removendo celobioses; e 1,4-β-D-glicosidases que hidrolisam a celobiose, gerando glicose (RAMOS, 2003).

A hidrólise enzimática da hemicelulose requer um maior número de enzimas devido a sua composição heterogênea: endo-1,4-β-D-xilanases que hidrolisam ligações glicosídicas na cadeia da xilana; 1,4-β-D-xilosidases que liberam xilose a partir de xilooligossacarídeos da cadeia da xilana; endo-1,4-β-D-manases que clivam ligações internas da cadeia de mananas; 1,4-β-D-manosidades que clivam manooligossacarídeos em manose e várias outras enzimas como a α-D-galactosidases e a α-glucoronidases que são responsáveis pela remoção de ramificações laterais (BEG et al., 2001).

Os processos de hidrólise de biomassa lignocelulósica devem ser eficientes energética e quimicamente, devendo ser considerados vários fatores como: a possibilidade de geração de produtos que inibem a atividade enzimática e o crescimento celular, o pH, o tempo, a pressão, a agitação e a adsorção das enzimas à biomassa. A otimização do processo pode gerar melhores resultados (VALLANDER; ERIKSSON, 1985).

3.2. Xilitol: características e aplicações

O xilitol é um penta-hidroxi-pentano ($C_5H_{12}O_5$), altamente solúvel em água, e que é considerado um açúcar natural, com poder adoçante similar ao da sacarose e superior ao de outros polióis como o sorbitol e o manitol (BAR, 1991; ARRUDA, 2011; GLIEMMO et al., 2008). Sua estabilidade física e biológica o torna substância adequada e de grande interesse para indústrias farmacêuticas, alimentícias e odontológicas (BAR, 1991).

Esse açúcar natural é bem tolerado pelo corpo humano, podendo ser consumidos até 60g por dia, mas apresenta efeito laxativo se ingerido acima dessa quantidade (EMODI, 1978). Sua ocorrência é natural em frutas, verduras, legumes, liquens, algas e cogumelos, mas sua extração diretamente dessas fontes não é viável economicamente devido à baixa concentração em que se encontra (OLINGER, 1988). O xilitol também pode ser encontrado como produto do metabolismo de diversos seres vivos, inclusive do homem, sendo um produto intermediário do metabolismo dos carboidratos, com produção endógena média de 20g por dia em um adulto normal (PEPPER, 1988; VOIROL, 1973; MUSSATO, ROBERTO, 2002).

O xilitol possui inúmeras aplicações, uma delas é na prevenção de cáries dentárias, uma vez que é capaz de reduzir a quantidade de *Streptococcus mutans*, principal agente responsável pela formação da cárie, por meio do uso contínuo de gomas de mascar contendo esse poliól (AUTIO, 2002). Na cavidade bucal, o xilitol assimilado por *S. mutans* é fosforilado a xilitol-5P, o qual não é metabolizado pela bactéria. O metabólito é liberado para o meio extracelular, e o seu acúmulo na região dentária inibe o consumo de outros açúcares por *S. mutans*, reduzindo o seu crescimento e adesão na cavidade bucal (GRILLAUD et al., 2005; KANDELMAN et al., 2003). Estudos também têm demonstrado que o xilitol parece auxiliar o processo de remineralização de lesões iniciais no esmalte dentário, uma vez que atua no fluxo e composição da saliva. (LOVEREN, 2004).

O xilitol também possui importante aplicação na prevenção da osteoporose. Estudos mostraram que sua administração oral impediu a progressão da osteoporose e proporcionou aumento de massa óssea (SVANBERG, 1998). Seu uso também auxilia no tratamento de otites médias e agudas e infecções respiratórias, pois inibe o crescimento e a adesão de *Pneumococcus spp.* e *Haemophilus influenzae* em células da nasofaringe (UHARI et al., 1998; MUSSATO, ROBERTO, 2002).

Outra característica importante do xilitol é que seu metabolismo é independente da insulina e aliado ao seu baixo índice glicêmico, torna seu consumo ideal por pessoas diabéticas (GRILLAUD et al., 2005), além de ser um terço menos calórico em relação à sacarose (BAR, 1991). Clinicamente, também é indicado na dieta de obesos, uma vez que atua de forma menos acentuada no depósito de gorduras se comparado com outros açúcares (ELLWOOD et al., 1999). Também pode ser empregado no tratamento de desordens metabólicas, como a anemia hemolítica, e para estimular a absorção de vitaminas e cátions metálicos, como o cálcio e o ferro, pelo intestino (MAKINEM, 2000).

Desde 1980, 28 países têm utilizado o xilitol em produtos comerciais, sendo a União Europeia responsável pela metade da produção mundial (JIN-SEO, 2007). No Brasil o interesse pelo uso industrial do xilitol é crescente, sendo destaque na produção de cremes dentais e gomas de mascar (BRANCO, 2010).

3.3 Obtenção de xilitol

O xilitol é naturalmente encontrado em frutas, legumes, verduras, líquens, algas e fungos. Porém, a extração realizada diretamente dessas fontes é economicamente inviável, devido à baixa concentração na qual o xilitol se encontra, o que torna baixo o rendimento do processo (0,9g de xilitol por 100g de material utilizado) (PARAJÓ et al., 1998).

Em larga escala, a obtenção de xilitol é realizada por processo químico, por meio da hidrólise ácida do material lignocelulósico, seguida da purificação e hidrogenação da xilose em xilitol (MELAJA, 1977). Um catalisador metálico ($\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$) é utilizado para a hidrogenação da xilose purificada, sob temperatura de até 140°C e pressão média de 50atm (CORTEZ, 2010). Os extensivos procedimentos para purificação da xilose e posterior separação e purificação do xilitol tornam o processo bastante dispendioso, limitando seu uso em escala industrial (LU et al., 1995). Diante dessa limitação e da crescente do mercado de xilitol, estudos vêm sendo direcionados para o desenvolvimento de tecnologias alternativas que diminuam os custos de produção e os impactos ambientais causados pelos processos químicos (CORTEZ, 2010). Nesse contexto, a via biotecnológica de obtenção de xilitol tem sido considerada uma alternativa viável ao processo químico, uma vez que não requer essas etapas que elevam o custo de produção (BRANCO et al., 2007).

A via biotecnológica é baseada na utilização de micro-organismos que convertam a xilose presente em materiais lignocelulósicos em xilitol. Entre os micro-organismos, as leveduras são consideradas os melhores produtores de xilitol, sendo que espécies do gênero *Candida* tem se destacado na produção e por isso são extensivamente estudadas (KUSMANOVA, 1998). Dentre as espécies já estudadas, *Candida tropicalis* (LI et al., 2011), *Candida athensensis* (ZHANG et al., 2012), *Meyerozyma (Candida) guilliermondii* (MUSSATO et al., 2003) e *Debaryomyces hansenii* (GÁRCIA-DIÉGUEZ et al., 2001) estão entre as mais promissoras, sendo o processo de produção de xilitol pela primeira já patenteado no Japão por Kim *et al* (1999 e 2000).

Em estudo feito por Barbosa *et al* (1988), uma linhagem de *M. guilliermondii*, cultivada em condições aeróbicas e alta concentração de xilose (acima de 100g/l), produziu 77g/l de xilitol). Em 2005, foi verificada a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por células imobilizadas de *M. guilliermondii*; a produção máxima alcançada foi de 47,5g/l (CARVALHO et al., 2005). Em outro estudo, *C. tropicalis*, cultivada em hidrolisado não detoxificado, atingiu uma produção de xilitol de 31,1g/l (HUANG et al., 2010). Em estudo mais recente, uma linhagem de *C. athensensis* produziu 100,1g/l de xilitol, a partir de cultivo em hidrolisado de resíduos de horticultura (ZHANG et al., 2012).

Outra forma de se obter xilitol por via biotecnológica é por meio de procedimento enzimático empregando a enzima xilose redutase. Esse processo leva a um rendimento mais alto em relação ao processo que utiliza o micro-organismo, uma vez que a enzima que oxida o xilitol, xilitol desidrogenase (XD), não está presente na reação (BARBOSA et al., 1988). Estudos empregando enzimas para a produção de xilitol apresentam uma eficiência de 100% de conversão da xilose a xilitol, tornando esse método uma alternativa interessante para a obtenção de xilitol. (NIDETZKY et al, 1996).

Apesar dessas vantagens, o processo enzimático requer a adição de cofatores ao meio reacional, elevando o custo do processo. Uma alternativa para contornar o problema em relação ao custo é a obtenção biotecnológica de xilitol empregando micro-organismos geneticamente modificados, com alta atividade da enzima responsável pela conversão da xilose em xilitol (KIM et al., 2002).

Há uma crescente desses trabalhos voltados para a alteração genética de micro-organismos visando à produção de xilitol, como em *Saccharomyces cerevisiae* (KIM et al., 2002) e *Escherichia coli* (SUZUKI et al., 1999). Em estudo realizado com *S. cerevisiae* contendo o gene que codifica a xilose redutase de *S. stipitis*, foi possível observar que a produção de xilose a xilitol ocorre com 100% de rendimento e produtividade volumétrica de até 1,0g/l.h. Em outro estudo, Wang et al (2005) por meio de inibição do gene da xilitol desidrogenase (*xdh1*) de *Trichoderma reesei*, alcançaram um aumento de produtividade volumétrica de 0,008 g/l.h para 0,02 g/l.h em meio contendo 2% de xilose.

Outra estratégia que tem sido utilizada na tentativa de aumentar a produção de xilitol é a imobilização de células. Esse processo, realizado em batelada, é uma alternativa para melhorar o processo fermentativo, pois possibilita o alcance de maiores concentrações celulares, facilita a separação do sistema imobilizado do meio de cultura, além de poder ser reutilizado, diminuindo o custo do processo (SANTOS, 2005; CUNHA, 2006). Em 2011, Prakash et al, avaliaram a produção de xilitol por *D. hansenii*, utilizando sistema de imobilização celular e alcançaram uma produção de 71,2g/l de xilitol.

3.4. Bioconversão de xilose a xilitol

A via metabólica de bioconversão da xilose inicia-se com o seu transporte através da membrana plasmática. Em vários modelos já estudados, como *S. cerevisiae*, *C. shehatae*, *S. stipitis* e *D. hansenii*, são descritos dois tipos de transporte para a xilose: a difusão facilitada e o simporte de prótons H⁺ (LAGUNAS, 1993; KILLIAN e VAN UDEN, 1988; KILLIAN et al., 1993; NOBRE et al., 1999).

Os transportadores Hxt e Gal transportam tanto glicose quanto xilose. Porém, a afinidade dos transportadores para xilose é menor do que para glicose, sendo a captação de xilose reprimida por glicose devido à competição de ambos pelo mesmo transportador (KOTTER E CIRIACY, 1993; LE et al., 2002). Essa repressão também ocorre quando há outros substratos, como a frutose e a manose, juntamente com xilose, saturando o sistema (HAHN-HAGERDAL, 1997). Em *S. stipitis* esse processo foi descrito por KILLIAN et al (1998), no qual verificou-se dois tipos de transporte para a xilose: um com alta afinidade, mas baixa capacidade pois é inibido por glicose e outro com baixa afinidade, mas alta capacidade de transporte. Outras

condições como a baixa oxigenação, também podem limitar a taxa de transporte, limitando a utilização de xilose por algumas leveduras (LIGTHELM, 1988).

Ao atingir o interior celular, a xilose é reduzida a xilitol, por meio de uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (E.C. 1.1.121), possuindo como cofator a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo, fosfatada ou não (NADPH, NADH). O xilitol formado pode ser exportado ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.9) ligada à forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo, fosfatada ou não (NADP⁺, NAD⁺). A xilulose, por sua vez, pode ser fosforilada a xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase (E.C. 2.7.1.17) e esse último produto gerado pode ser convertido através das reações não oxidativas da via das pentoses fosfato à gliceraldeído-3P e frutose-6P. Estes compostos intermediários podem entrar na via glicolítica, caindo no ciclo dos ácidos tricarbóxicos ou sendo convertidos a etanol (HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

A especificidade das enzimas pelos cofatores varia conforme o micro-organismo, sendo que em *Sheffersomyces stipitis* a XR é NADPH ou NADH dependente, enquanto XDH é preferencialmente NAD⁺ dependente (BRUINENBERG et al., 1984). A especificidade da enzima pelo cofator e o acúmulo de xilitol no citoplasma estão diretamente relacionados, sendo que em micro-organismos que não possuem especificidade por um determinado cofator, a razão NADH/NADPH disponível no citosol é determinante sobre qual das formas será utilizada para a conversão de xilose a xilitol (MAYR et al., 2000).

A regeneração de cofatores é etapa fundamental para a produção de xilitol por leveduras e ocorre durante o metabolismo da xilose. Quando a XR é dependente de NADH ou NADPH, o NAD utilizado na redução de xilose a xilitol pode ser recuperado em condições de anaerobiose ou de limitação de oxigênio. Nesse processo, a oxidação da glicose-3-fosfato gera mols de NADPH a partir de NADP⁺. O NADPH gerado é utilizado na redução de xilose a xilitol, que ao ser metabolizado para produção de glicose-3-fosfato regenera NADP⁺ para manter o ciclo (BARBOSA et al., 1988). Nesse contexto, micro-organismos que apresentam XR dependente de NADH são melhores produtores de etanol, enquanto aqueles em que a xilose redutase é dependente de NADPH acumulam xilitol (YOKOYAMA et al., 1995).

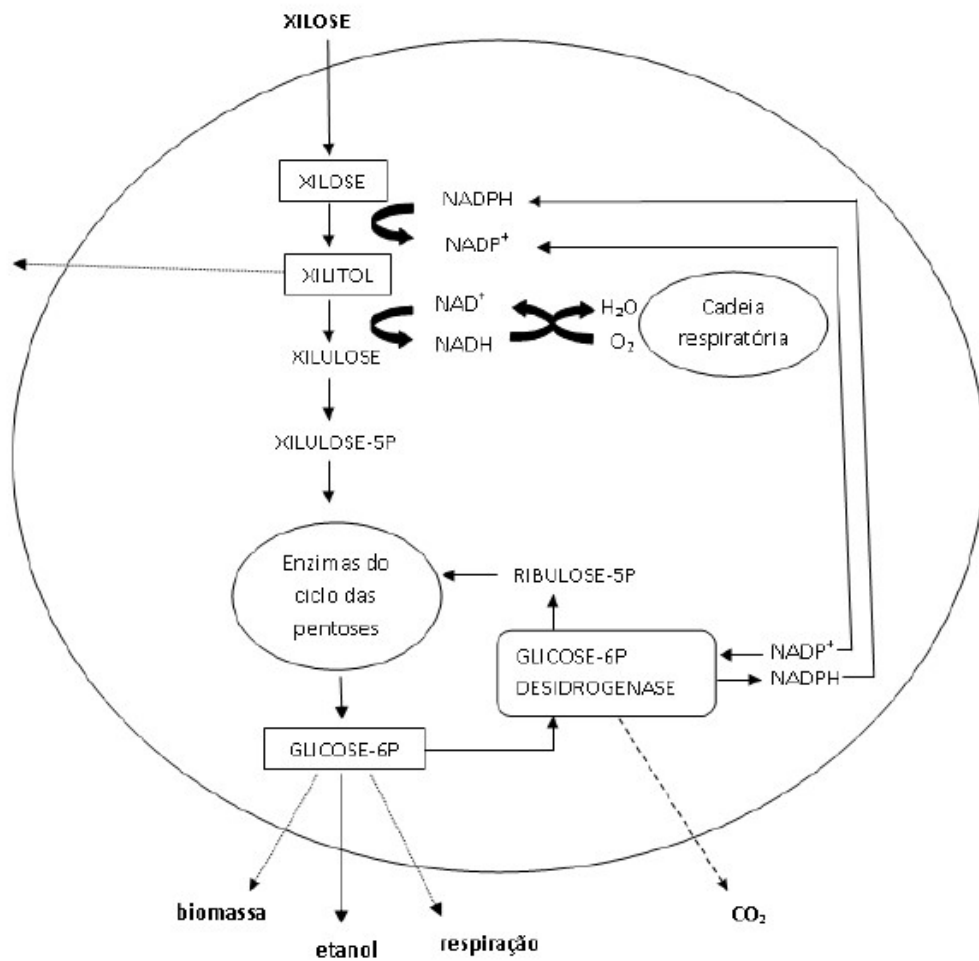


Figura 2: Esquema do metabolismo de xilose por leveduras (Adaptado de BARBOSA et al., 1988).

A produção de xilitol por fermentação é regulada por fatores como a disponibilidade de oxigênio, que pode influenciar no requerimento dos cofatores pela XR, sendo que em condições limitantes ou em anaerobiose ocorre um desbalanço redox, o qual influencia na produção de xilitol e etanol (FELIPE, 2004). Outros fatores que podem influenciar a atividade da enzima xilose redutase, afetando a bioconversão de xilose em xilitol são: pH, concentração de arabinose, D-glicose e inóculo, temperatura e a presença de compostos tóxicos como o furfural e hidroximetilfurfural que inibem o metabolismo microbiano (ARRUDA, 2011).

3.5 Xilose Redutase (XR)

A enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21) pertence à família das Aldo-ceto redutases e catalisa reações de oxi-redução de aldeídos e cetonas a alcoóis. Essas reações são reversíveis e dependentes de coenzimas como o NADPH ou NADH (CORTEZ, 2010). A XR é a primeira

enzima requerida no metabolismo da xilose em leveduras e tem sido caracterizada em diferentes micro-organismos (CHIANG, 1960).

A massa molar da XR varia conforme o micro-organismo de origem, podendo alcançar valores entre 30 e 70KDa. As condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima também variam conforme micro-organismos de origem, porém há uma faixa geral na qual ocorre uma ação dessa enzima que é com pH entre 5 e 7,5 e temperatura entre 25 e 50°C (YOKOYAMA et al., 1995). Em *Cryptococcus lactativorus*, a enzima se mostrou estável em pH entre 6 e 8, sendo desnaturada em pH abaixo de 4 e acima de 9 unidades (MAEDA, 1988).

Estudos de estabilidade térmica para essa enzima determinaram que ela possui uma atividade residual de 100% após 10 minutos a 30°C, mas se a temperatura for elevada para 80°C a atividade residual decresce para 3%. A meia vida da enzima também decresce com o a elevação da temperatura, sendo de 800h a 30°C e de apenas 14h para 50°C (CORTEZ, 2010).

A XR pode ser monomérica ou dimérica, possuindo dois sítios de ligação distintos, sendo um para o substrato e outro para a coenzima requisitada para a reação ocorrer (WILSON et al., 2003). Em *Neurospora crassa* e *Candida tenuis*, a enzima precisa se ligar primeiramente com a coenzima para então se ligar ao substrato e completar a reação (RAWAT, 1996).

As estruturas da XR (apo e holoenzima) de *Candida tenuis* foram determinadas primeiramente por Kavanagah et al (2002), com resolução de 2,2Å e R-fator cristalográfico de 17,9% para a apoenzima e de 20,8% para a holoenzima. A enzima enovela-se na forma de um barril (β/α), motivo comumente encontrado em enzimas e possui os resíduos Asp-178, Arg-181, Lys-202, Phe-206, Trp-313 e Pro-319 como os responsáveis por mediar a interface dimérica.

O gene que codifica a XR (*xyl1*) de *P. stipitis* já foi clonado e expresso em *S. cerevisiae*, mas essa levedura não foi capaz de utilizar xilose como fonte de carbono devido a ausência de transportadores de xilose para essa espécie. A proteína expressa apresentou 318 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 35,8kDa e é codificada por uma ORF de 954pb (AMORE et al., 1991). O gene *xyl1* de *M. guilliermondii* também foi clonado e expresso em *K. pastoris*, produzindo uma proteína com 318 aminoácidos e massa molecular de 36 kDa,

semelhante a proteína nativa de *S. stipitis*, mas com apenas 70,4% de identidade (HANDUMRONKGKUL et al., 1998).

Devido à importância da XR na produção de etanol e xilitol, diversos estudos estão sendo conduzidos, visando à modificação genética de micro-organismos para que esses produzam mais eficientemente a XR e essa possa ser aplicada para a produção destes metabólitos (WOODYER et al., 2005).

3.6. Bioprocessos

Bioprocessos são definidos como processos conduzidos mediante ação de agentes biológicos, cujas etapas incluem o tratamento da matéria-prima, o preparo de meios de cultivo, a esterilização, a transformação do substrato em produto e o processo de separação, purificação e caracterização do produto obtido. São considerados bioprocessos: fermentações; processos com células animais ou vegetais, processos enzimáticos e tratamento biológico de efluentes (PEREIRA et al., 2008).

Os seres humanos fazem uso de processos fermentativos há milhares de anos e sua utilização, inicialmente, se deu a fim de se obter produtos como cerveja, vinho, queijos e outros derivados do leite. Há milhares de anos, os egípcios já fermentavam a cevada para obtenção de cerveja, bem como utilizavam a levedura da cerveja para fabricar pães (WARD, 1991). Atualmente, indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias têm obtido produtos a partir de fermentações, incluindo aqueles obtidos a partir do metabolismo primário, como o etanol, ou do metabolismo secundário, como os antibióticos (WARD, 1991). A produção de metabólitos primários, geralmente vem acompanhada de bons rendimentos, embora apresentem produção global baixa. Já a produção de metabólitos secundários normalmente é acompanhada de baixa produtividade e rendimento (PEREIRA et al., 2008).

Atualmente, o foco para o desenvolvimento de um bioprocessos não está relacionado apenas à relação entre custo e eficácia, mas na confiabilidade e reprodutibilidade do processo. Para ampliar a escala de um processo fermentativo de forma a torná-lo viável, é necessário manter as condições do processo uniformes para qualquer volume utilizado (TACIRO, 1992). Os bioprocessos necessitam de avanços, que podem ser alcançados por meio de melhor

compreensão sobre a fisiologia dos micro-organismos envolvidos e da interação desses com as condições químicas e físicas presentes no biorreator (PEREIRA et al., 2008).

3.7. Cinética e Otimização de processos

O estudo cinético de um processo consiste na análise da evolução dos valores de concentração da biomassa, dos produtos de interesse econômico e dos nutrientes que compõem o meio de cultivo ao longo do tempo de fermentação. Perfis cinéticos bem definidos são o ponto de partida para a descrição quantitativa de um processo, permitindo a identificação, por exemplo, da sua duração. A comparação quantitativa entre condições de cultivo com diferentes parâmetros como pH, temperatura, agitação e aeração se faz possível com a utilização de parâmetros cinéticos de velocidade de transformação e de conversão de substratos em produtos. Esse estudo é de grande importância para a otimização da produção e aumento da escala de produção em biorreatores, representando as informações necessárias para o dimensionamento de uma instalação industrial durante o escalonamento (HISS, 2001).

Para otimizar os parâmetros que afetam o crescimento microbiano e a produção do produto de interesse podem ser utilizados os métodos clássico e o estatístico. O método clássico baseia-se no estudo de uma variável independente, enquanto todos os outros fatores são mantidos constantes. Esse método, no entanto, pode levar a resultados errôneos, pois não garante a determinação das condições ótimas e não detecta as interações que ocorrem entre dois ou mais fatores.

O método estatístico, por sua vez, é realizado a partir de um planejamento experimental mais adequado, sendo utilizado para avaliar o efeito dos fatores e as condições ótimas dos fatores para as respostas desejadas (BOX e WILSON, 1951). A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é um dos métodos estatísticos mais utilizados e vem obtendo sucesso na otimização de vários produtos biotecnológicos como, a composição de meios de cultivo utilizado nas fermentações (MANRESA et al., 2012), condições de hidrólise enzimática (COTTA et al., 2012), processos de produção de enzimas (SONI et al., 2012) e processos fermentativos de produção de etanol (SINGH e BISHNOI, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia e no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1 Micro-organismos

Para os ensaios de seleção de leveduras com alto potencial de produção de xilitol foram utilizadas espécies pertencentes à coleção de isolados do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG, sendo cinco linhagens de *Meyerozyma guilliermondii* (UFMG 01, 02, 04, 10 e 12) e duas linhagens de *Meyerozyma caribbica* (UFMG 07 e 08).

4.2 Avaliação da capacidade fermentativa das linhagens de leveduras em estudo, utilizando xilose como fonte única de carbono

Para a avaliação da capacidade de conversão de xilose a xilitol, os isolados foram pré-cultivados em caldo YPX (xilose 20g/l, peptona 10g/l, extrato de levedura 10g/l) a 180rpm, 28°C por 24 horas e em seguida as culturas foram centrifugadas a 10.000xg e lavadas com água destilada estéril. Parte das células obtidas foi transferida para frascos Erlenmeyer (125ml) contendo 50ml de meio a base de xilose (45g/l), extrato de levedura (5g/l) e ureia (2,5g/l), de modo a se obter uma DO_{600nm} inicial igual a 2. Os frascos foram incubados a 30°C e 200rpm e uma alíquota de 1ml foi retirada a cada 24 horas de incubação até o total de 96h de cultivo. Parte dessa alíquota (20 μ l) foi utilizada para avaliação do crescimento celular por meio da leitura de densidade ótica em leitor de microplacas, modelo Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Scientific). O restante da alíquota foi centrifugada, e 100 μ l do sobrenadante filtrado (0,2 μ m) foi utilizado para avaliação da concentração de etanol, xilitol e açúcares.

A concentração de açúcares, etanol e xilitol foi determinada utilizando-se um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC) modelo LC -20A, Prominence, Shimadzu (Japão) e coluna SUPELCOGEL C-610H 30cm x 7,8mm (Sigma). A separação ocorreu a 65°C, sendo a fase móvel H_2SO_4 5mmol/l com um fluxo de 0,6 ml/min. Foi utilizado detector de índice refrativo RID-10A, com a temperatura da célula do detector de 45°C.

Os parâmetros fermentativos analisados foram: fator de conversão de açúcares em xilitol $Y_{P/S}$ (g/g); produtividade volumétrica, Q_P (g/l.h) e consumo de açúcares Y (%), os quais foram calculados de acordo com as equações 1, 2, e 3, respectivamente:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (1)$$

Onde: $\Delta P = (P - P_i)$, P é a produção de xilitol (g/l) ao final do tempo de cultivo, t_f ; P_i é a produção de xilitol (g/l) no início da fermentação, t_i ; $\Delta S = (S_i - S_f)$, S_f é a concentração total de açúcares (g/l) no tempo final, t_f ; S_i é a concentração inicial de açúcares (g/l).

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (2)$$

Onde: $\Delta t = (t_f - t_i)$, t_f é o tempo (h) total no qual foi observada a produção de xilitol e t_i é o tempo (h) inicial da fermentação.

$$Y (\%) = \frac{\Delta S}{S_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde: $\Delta S = (S_i - S_f)$, S_f é a concentração total de açúcares (g/l) no tempo final, t_f ; S_i é a concentração inicial de açúcares (g/l).

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo analisada a influência dos fatores sobre as respostas por ANOVA ($p < 0,05$), a comparação de médias dos parâmetros fermentativos por Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) e a correlação entre as respostas por Correlação de Pearson ($p < 0,05$), em software Minitab.17.

4.3 Avaliação da capacidade fermentativa de xilose das leveduras em estudo, utilizando hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado e estudo das condições reguladoras do processo

4.3.1. Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba

A torta de macaúba utilizada no presente estudo é um coproduto obtido após o processo de extração de óleos do fruto da palmeira macaúba, mediante sua prensa, para produção

experimental de biodiesel. A torta foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Antônio Saraiva Grossi do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

O hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba foi obtido a partir de hidrólise ácida, na qual a torta foi triturada e transferida para frascos *Erlenmeyer* de 1000ml contendo H_2SO_4 0,8% (v/v), sob a relação sólido: líquido de 1:10. A hidrólise foi conduzida a $121^\circ C$ por 60 minutos, em autoclave vertical Phoenix modelo AV. O hidrolisado obtido foi resfriado a temperatura ambiente, filtrado em sacos de algodão e teve seu pH ajustado para 5,5 com NaOH. Para a remoção de sedimentos foi realizada centrifugação a $10.000xg$ por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi congelado a $-80^\circ C$ e posteriormente concentrado de 5 a 10 vezes por meio de liofilização, processo o qual também é eficiente para detoxificação do hidrolisado. Para remoção de lignina, o hidrolisado teve seu pH ajustado para 7,0 com CaO, seguido de ajuste de pH para 5,5 com H_3PO_4 .

Para detoxificação, foi adicionado carvão ativado a 2,5% (p/v) ao hidrolisado que foi incubado a 200rpm por 3 horas à $30^\circ C$. Após esse processo foi realizada a centrifugação a $10.000xg$ por 15 minutos para retirada do carvão ativado e de sólidos sedimentáveis. Para utilização como substrato de crescimento, o hidrolisado teve seu pH ajustado para 7,0 com NaOH e foi esterilizado em autoclave a $121^\circ C$ por 30 minutos. Uma alíquota do hidrolisado obtido foi retirada para análise das concentrações de açúcares utilizando-se um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), como descrito no item 2.

4.3.2 Avaliação de parâmetros fermentativos na capacidade de produção de xilitol pelas leveduras em estudo e efeito de fatores no processo

Considerando que as leveduras diferem quanto à capacidade fermentativa de xilose e quanto às condições ambientais e operacionais do cultivo, neste ensaio foram avaliados os efeitos da linhagem de levedura em estudo, da concentração de células no inóculo, da aeração (V_{frasco}/V_{meio}) e das concentrações de xilose e glicose presentes no hidrolisado de torta de macaúba na produção de xilitol e etanol.

As linhagens foram pré-cultivadas nas mesmas condições descritas no item 2 e utilizadas como inóculo nos experimentos descritos a seguir.

Para a avaliação do efeito da concentração de células presentes no inóculo, frascos Erlenmeyer de 125ml, contendo 50ml de meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba (glicose 20g/l e xilose 45g/l), suplementado com extrato de levedura (5g/l) e ureia (2,5g/l), foram adicionadas de suspensões celulares de modo a se obter uma DO_{600nm} inicial correspondente a 0,2 e 2,0 OD.

Para avaliação do efeito da aeração na produção de xilitol e etanol, 50ml de meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba (glicose 20g/l e xilose 45g/l), suplementado com extrato de levedura (5g/l) e ureia (2,5g/l) foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 125 e 250ml de modo a se obter uma relação entre volume do frasco e volume do meio (V_{frasco}/V_{meio}) de 2,50 e 5,0, respectivamente. Os frascos foram inoculados com as linhagens de leveduras em estudo a uma DO_{600nm} inicial correspondente a 0,2.

Para avaliar o efeito da concentração de glicose e xilose presentes no hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba, frascos Erlenmeyer de 250ml foram adicionados de 50ml de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba, concentrado por liofilização, de modo a obter as concentrações de glicose 20g/l e xilose 45g/l ou glicose 27g/l e xilose 75g/l. Os hidrolisados foram suplementados com extrato de levedura (5g/l) e ureia (2,5g/l), e adicionado de suspensão celular das leveduras em estudo de modo a se obter uma DO_{600nm} inicial igual a 0,2.

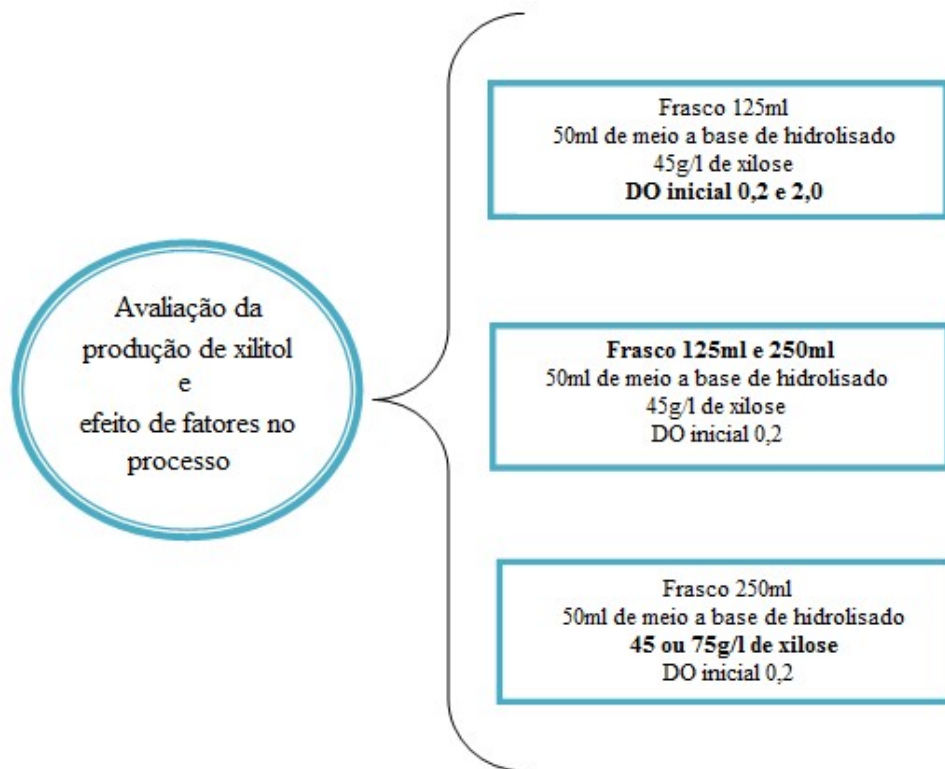


Figura 3: Esquema de parâmetros utilizados para a avaliação da capacidade de produção de xilitol pelas linhagens de levedura utilizadas neste trabalho.

Em todos os experimentos, os frascos foram incubados a 30 °C e 200rpm e uma alíquota de 1ml foi retirada a cada 24h de cultivo, até o total de 96h. Cada alíquota foi centrifugada e o sobrenadante coletado para posterior avaliação da concentração de etanol, xilitol e açúcares utilizando-se um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), bem como para monitorar o crescimento celular e determinar a atividade da enzima XR, como descrito no item 2. Os experimentos foram realizados em triplicata e a comparação de médias dos parâmetros fermentativos foram realizadas por Teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$) em software Minitab.17.

4.4 Otimização da produção de xilitol a partir hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba e extrato de levedura de cervejaria por *Meyerozyma caribbica* UFMG08

4.4.1 Produção de extrato de levedura a partir de biomassa celular de cervejaria

O material de estudo foi fornecido pela Inconfidentes - Cervejarias Conjuradas (Nova Lima – MG) e consistiu de suspensão aquosa de células frescas (30% p/v) da levedura

Saccharomyces cerevisiae proveniente de dornas de fermentação. A suspensão aquosa, também chamada de “leite de levedura” foi centrifugada a 4000xg por 60 minutos para precipitação das células. Para remoção do álcool e outros componentes provenientes da fermentação, foi realizada lavagem com água destilada por 3 vezes. A etapa de desamargamento consistiu na lavagem da biomassa com solução de NaOH (0,2%) por 3 vezes.

A autólise da biomassa foi realizada adicionando-se 20% de pré-autolisado a etanol (7%), NaCl (2%) em um pH igual a 5,5. Essa mistura foi incubada a 55°C por 24 horas sob agitação de 180rpm. No final do processo foi realizada a pasteurização a 85°C por 30 minutos. A separação do extrato e das células autolisadas foi realizada por centrifugação a 4000xg por 60 minutos (VILELA et al., 2000). O extrato obtido foi congelado a -80°C e submetido à liofilização por 1 a 7 dias horas em liofilizador modelo K105, Kiotop.

O extrato de levedura de cervejaria obtido foi caracterizado quanto a concentração de nitrogênio orgânico pelo método de Kjeldahl (1883). O extrato obtido foi utilizado como fonte de nitrogênio para o meio de cultivo a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.

4.4.2 Otimização

A partir dos resultados obtidos com as fermentações anteriores, utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) (Box e Wilson, 1951) para otimizar a produção de xilitol por *M. caribbica* UFMG08. Por meio dessa metodologia, é possível estudar os fatores controláveis mais importantes na produção de xilitol, para posteriormente modelar matematicamente esse processo a fim de encontrar as condições que o otimizem e finalmente, validá-lo. Para a primeira etapa do processo de otimização, foi utilizado um delineamento Fatorial Fracionado (DFF) $3^{(4-1)}$ com 27 unidades experimentais (Statistica 7.0) para estudar os fatores e níveis que atuam sobre as respostas durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba por *M. caribbica* UFMG08. Foram analisados quatro fatores, com três níveis cada (Tabela 1).

O processo fermentativo com as 27 unidades experimentais foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250ml, densidade celular inicial de 0,28g/l, incubados por 96h a 30°C e 200rpm. Uma alíquota de 1ml foi retirada para posterior avaliação da concentração de etanol,

xilitol e açúcares em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, conforme item 2. Foi utilizado um modelo de primeira ordem para descrever a influência dos fatores sobre as respostas (equação).

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (1)$$

Em que: β_0 representa a constante; β_1 refere-se ao coeficiente do termo linear, X_1 corresponde à variável independente, β_{12} refere-se a interação entre os termos.

Tabela 1: Fatores, níveis e respostas do delineamento fatorial fracionado (DFF) de resolução $3^{(4-1)}$ utilizado na otimização da fermentação em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Aeração (vfrasco/vmeio)	1,0	2,5	5,0
Concentração do hidrolisado (teor de xilose) (g/l)	20,0	40,0	60,0
Fontes de Nitrogênio	Extrato de levedura comercial	Ureia	Extrato de levedura de cervejaria
Concentração da fonte de nitrogênio (g/l)	0,0	5,0	10,0
Respostas	Biomassa(g/l); $X_{R\text{máx}}$ (U/mg de proteína total); Xilitol (g/l); $Y_{P/S}$ (g/g); Q_x (g/l.h); Y(%).		

*Aeração: níveis calculados a partir da razão entre volume do frasco e volume do meio de cultivo em ml.

Para se determinar as condições que maximizam as respostas, os principais fatores que influenciam nas respostas, analisados anteriormente segundo o delineamento fatorial fracionado (DFF), foram selecionados e utilizados em um delineamento composto central rotacionado (DCCR). O DCCR foi composto por 20 unidades experimentais, com 8 pontos cúbicos (-1,+1), 6 pontos centrais (0) e 6 pontos axiais (-1,68; +1,68). Três variáveis independentes (fatores controlados da fermentação) e seis variáveis dependentes (respostas) foram selecionados conforme apresentado na Tabela 2.

Foi utilizado um modelo de segunda ordem para descrever a influência dos fatores sobre as respostas (equação).

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Em que: em que: β_0 representa a constante; β_i e β_{ii} referem-se aos termos dos coeficientes linear e quadrático, respectivamente; β_{ij} corresponde ao termo da interação e X_i representa a variável independente.

Tabela 2: Fatores, níveis e respostas do delineamento composto central rotacionado utilizado na otimização da fermentação em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

Fatores (Concentração)	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Aeração	2,5	3,0	3,75	4,5	5,0
Concentração do hidrolisado (teor de xilose) (g/l)	30,0	34,0	40,0	46,0	50,0
Concentração da fonte de nitrogênio (g/l)	10,0	12,0	15,0	18,0	20,0
Respostas	Biomassa(g/l); XR_{\max} (U/mg de proteína total); Xilitol (g/l); $Y_{P/S}$ (g/g); Q_x (g/l.h); Y(%).				

*Aeração: níveis calculados a partir da razão entre volume do frasco e volume do meio de cultivo em ml.

Foi utilizada uma ferramenta matemático-estatística denominada função desejabilidade para otimizar o processo, uma vez que esse possui muitas variáveis resposta (DERRINGER, 1980). Essa função permite encontrar os valores dos fatores que otimizem as respostas, ou pelo menos que as mantenha em faixas desejáveis. A desejabilidade pode variar de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for o valor obtido, mais próximos estarão os valores ótimos relacionados a cada resposta individual.

Tabela 3: Valores escalonados dos diferentes graus de desejabilidade e sua descrição de resposta qualitativa.

Valores d ou D (Desejabilidade)	Descrição da resposta qualitativa
0,80 a 1,0	Aceitável e excelente
0,63 a 0,80	Aceitável e bom
0,37 a 0,63	Aceitável porém pobre
0,20 a 0,27	Valor limite
0,00 a 0,20	Inaceitável

Akhanarazova & Kafarof (1982)

Para proceder à aplicação dos modelos ajustados, é preciso realizar a validação na qual a capacidade de predição dos modelos é analisada. Índices frequentemente empregados para validação dos modelos são os fatores bias (F_B) e exatidão (F_A), descritos por Baranyi et al. (1999) e calculados de acordo com as equações 3 e 4, respectivamente.

$$F_B = 10^{\left(\frac{\sum \log(P/O)}{n}\right)} \quad (3)$$

$$F_A = 10^{\left(\frac{\sum |\log(P/O)|}{n}\right)} \quad (4)$$

Em que: P corresponde aos valores preditos; O corresponde aos valores observados e n representa o número de dados experimentais.

O fator bias indica o desvio médio relativo existente entre os valores preditos e observados, fornecendo a confiança do modelo, sendo que um valor de F_B igual a 1 indica que os valores preditos e observados estão em total acordo. O fator exatidão indica como os valores experimentais se dispõem em torno dos valores preditos, fornecendo a exatidão do modelo. Valores aceitáveis de F_A devem estar em torno de 1. Este fator é apropriado para comparar dois ou mais modelos.

Para a realização do experimento de validação foram utilizados os valores estimados de cada fator para a produção otimizada de xilitol, nos quais a função desejabilidade (d) foi igual a 1.

Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata e os valores obtidos para cada parâmetro fermentativo foram utilizados para cálculo dos fatores Bias e Exatidão.

4.5 Avaliação da produção da enzima xilose redutase (XR) pelas linhagens de levedura em estudo durante os processos fermentativos

4.5.1. Padronização do método de rompimento celular

Como a enzima xilose redutase não é exportada para o exterior da célula, foi necessário realizar o rompimento das células cultivadas para se obter o extrato contendo a enzima. Três métodos de rompimento celular descritos na literatura foram testados para determinação daquele mais adequado às leveduras (*M. guilliermondii* e *M. caribbica*) e enzima em estudo.

O primeiro método testado foi o de rompimento manual com beads de vidro. Nesse método, a biomassa celular presente em 1ml de amostra da fermentação (variando de 8 a 22 OD) foi adicionada de 500µl de tampão de desintegração (0,1M trietanolamina pH 7,0; 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil; 0,5mM de ditio-treitól; 0,5mM de EDTA) e 0,2g de beads de vidro. Essa mistura foi agitada por 1 minuto em vortex, com intervalo de mesmo tempo em banho de gelo. O procedimento foi repetido por 3 vezes.

O segundo método testado foi o de rompimento celular utilizando ultrassom. Nesse método, a biomassa presente em 1ml de amostra da fermentação (variando de 8 a 22 OD) foi adicionada de 500µl de tampão de desintegração. Nessa mistura foi introduzida uma sonda ultrassônica e realizados pulsos de 20kHz a cada 1 minuto com descanso de 30 segundos, totalizando 10 pulsos.

O terceiro método testado foi o de rompimento celular utilizando nitrogênio líquido. Nesse método, a biomassa presente em pellet correspondente a 1ml de amostra da fermentação (variando de 8 a 22 OD) foi adicionada de 500ul de tampão de desintegração e gotejado sobre uma camada de nitrogênio líquido para a formação de microesferas que foram maceradas em gral com o auxílio de um pistilo. Ao término dos 3 processos, as suspensões foram centrifugadas para eliminação dos debris celulares. Para verificação da eficiência dos métodos, foi realizada a análise de proteínas totais presente nos extratos pelo método de Bradford (1976) e atividade da enzima XR.

A atividade da enzima XR foi determinada em leitor de microplacas, modelo Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Scientific) a 340nm e 30°C, com leituras a cada 1 minuto durante 10 minutos. A reação com volume final de 200µl consistiu da adição de 40µl de tampão fosfato de potássio (1M, pH 7,0), 30µl de cofator NADPH (3,4mM), 30µl de xilose (0,5M), e 100µl de cada extrato obtido. Os reagentes foram pré-incubados a 30°C e a reação iniciada com a adição do extrato enzimático. Os controles foram realizados a partir de reações utilizando a enzima inativada por aquecimento e água substituindo a enzima. Uma unidade (U) de XR foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a oxidação de 1µmol de NADPH por minuto nas condições do ensaio. A atividade específica da enzima XR foi mensurada pela divisão das Unidades pelo valor de proteína total no extrato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização do método de rompimento celular

Para todos os ensaios fermentativos realizados no presente trabalho foi realizada a mensuração da atividade da enzima XR, essencial para a produção de xilitol. Como essa enzima não é exportada para o exterior da célula pelos micro-organismos, foi necessário realizar o rompimento das células cultivadas para se obter o extrato contendo a enzima. Três métodos de rompimento celular, já descritos pela literatura, foram testados para determinação daquele mais adequado às leveduras e enzima em estudo.

Os extratos obtidos a partir dos três métodos de rompimento celular escolhidos foram caracterizados quanto aos níveis de proteína total e atividade específica da enzima xilose redutase (Figura 4). Foram testadas três densidade óticas diferentes, correspondentes as mais comumente obtidas para os tempos de fermentação de 24 a 96h. Foi verificado que as maiores concentrações de proteína foram encontradas para as maiores densidade óticas (18 e 22), o que se relaciona diretamente a uma maior densidade de células rompidas para recuperação do extrato. Em relação ao método, as maiores concentrações de proteína foram obtidas utilizando-se o método ultrassônico, alcançando 54mg/ml de proteína total, seguido do método no qual é utilizado nitrogênio líquido que permitiu a obtenção de 43mg/ml. Utilizando-se o método de rompimento celular com beads de vidro obteve-se menos que 30mg/ml de proteína total.

Apesar dos métodos com ultrassom e nitrogênio líquido possibilitarem a obtenção de maiores concentrações proteicas, as atividades enzimáticas realizadas com os extratos celulares obtidos por esses métodos não foi equivalente, principalmente para o método no qual se utiliza nitrogênio líquido para o qual se verificou a menor atividade específica de XR. Durante o processo de rompimento celular com ultrassom e nitrogênio líquido pode ter ocorrido a degradação de parte das proteínas existentes no extrato, incluindo a enzima xilose redutase, o que culminou em menor atividade observada. A degradação das proteínas pode ocorrer pela frequência utilizada no ultrassom a qual agita a solução tampão na qual as células estão suspensas, gerando espuma, que pode ser responsável pela degradação de proteínas devido a oxidação das mesmas. Outros fatores que podem levar a degradação proteica são pulsos muito longos e baixas temperaturas (TRÓIA, 2008).

A maior atividade enzimática foi observada para o método com beads de vidro, chegando a 2,61U/mg de proteína total, sugerindo uma menor degradação e/ou inativação das enzimas extraídas, te uma vez que a partir de uma menor concentração proteica obteve-se maior atividade enzimática. Diante disso, esse foi o método escolhido para a realização do rompimento celular no presente trabalho.

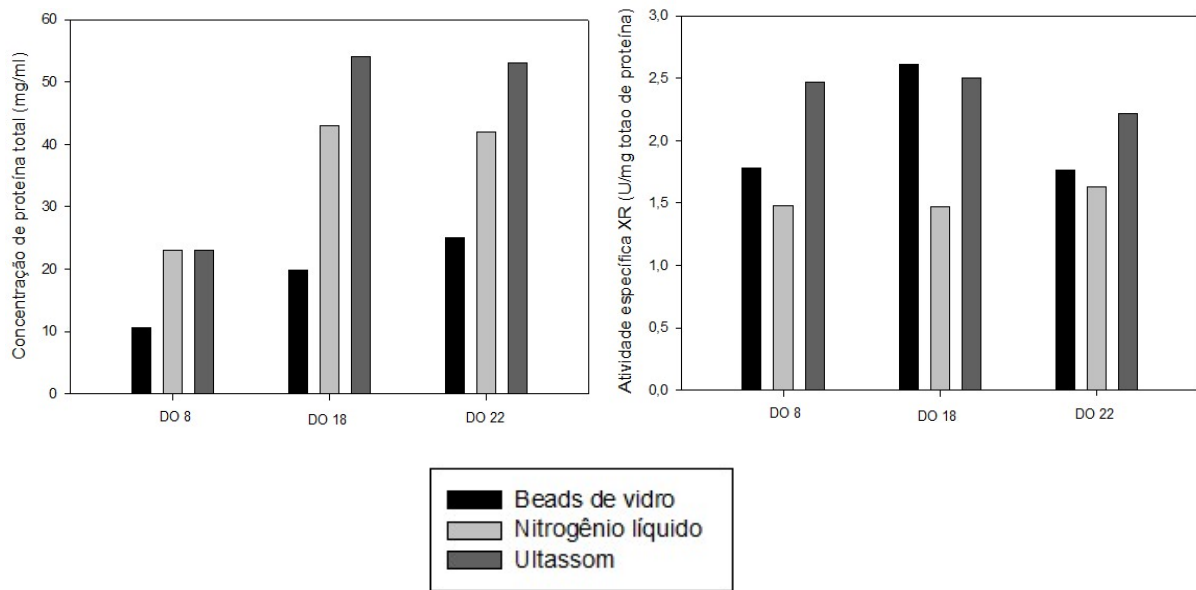


Figura 4: Concentração de proteína total e atividade específica de xilose redutase (XR) avaliada para os três métodos de rompimento celular para amostras obtidas com o cultivo de *M. caribbica* UFMG08 em meio semi-sintético até 96h.

5.2 Avaliação da capacidade fermentativa das leveduras em estudo a partir de xilose em meio semi-sintético.

A capacidade de produção de xilitol e etanol pelas leveduras em estudo, a partir de cultivo em meio semi-sintético suplementado contendo D-xilose, foi avaliada até 96h (Figura 5). Os parâmetros fermentativos calculados estão representados na Tabela 4. Nenhuma das leveduras cultivadas apresentou produção de etanol, indicando que essa não ocorre a partir de xilose como fonte única de carbono.

O tempo de produção máxima de xilitol não variou com as linhagens e correspondeu à 72h de fermentação (Figura 5). No entanto, os valores de produção máxima de xilitol diferiram entre as espécies em estudo ($p < 0,05$). As linhagens de *M. guilliermondii* foram melhores produtoras de xilitol nessa condição do que as linhagens de *M. caribbica*. A produção de xilitol entre as

linhagens de *M. guilliermondii* não diferiu de forma significativa ($p < 0,05$) e os valores foram próximos a 25g/l. Mesmo padrão foi observado para a espécie *M. caribbica*, cujos valores de produção de xilitol ficaram próximos a 20g/l.

Os valores de consumo de açúcares totais ficaram entre 69,97 e 77,52% para todas as linhagens testadas, sendo os maiores valores observados para as linhagens UFMG 01 e UFMG 10 de *M. guilliermondii*. Não foi observada correlação (Pearson, $r=0,45$; $p=0,39$) entre a produção de xilitol e o consumo de xilose para esse experimento.

Não houve diferença ($p < 0,05$) quanto à eficiência de conversão de açúcares em xilitol $Y_{P/S}$ (g/g), bem como para a produtividade volumétrica em xilitol Q_p (g/l.h), sendo os maiores valores obtidos iguais a 0,86g/g e 0,35g/l.h, respectivamente.

O crescimento celular também não variou com a linhagem de levedura em estudo ($p < 0,05$). A linhagem que apresentou maior crescimento celular foi *M. caribbica* UFMG08 (31,36g/l), não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) de todas as demais linhagens estudadas. Foi observada correlação moderada positiva (Pearson, $r=0,74$; $p=0,08$) entre o crescimento celular e a produção de xilitol.

Alguns estudos tem descrito valores de produção de xilitol por *M. guilliermondii* superiores às obtidas pelos isolados desta espécie no presente estudo, mas usando concentrações superiores de xilose. No estudo de Meyrial e colaboradores (1991) usando 50g/l de xilose, foram obtidos 30,9g/l de xilitol e produtividade volumétrica de 0,10g/l.h. Lu e Colaboradores (1995) obtiveram 68,7g/l de xilitol a partir de cultivo de uma linhagem de *C. guilliermondii* em meio com 110g/l de xilose. Apesar do alto valor obtido, a produtividade em xilitol foi de 0,17g/l.h, uma vez que a produção máxima de xilitol foi obtida com 238h de cultivo. Apesar de no presente estudo a concentração máxima de xilitol em g/l obtida ter sido menor (24,95 a 25,75g/l), esse valor foi alcançado em menor tempo (72h), indicando uma maior produtividade volumétrica (0,35g/l.h) em relação aos trabalhos citados para a mesma espécie avaliada e a partir de menor concentração de xilose.

Tabela 4: Parâmetros fermentativos das linhagens de leveduras cultivadas em meio contendo apenas D-xilose como fonte de carbono, acrescido de suplementos.

Isolado	$E_{Máx}$ (g/l)	$X_{Máx}$ (g/l)	$Y_{p/s\text{xilitol}}$ (g/g)	$Q_{x\text{xilitol}}$ (g/l.h)	$Y_{Máx}$ (%)	Biomassa (g/l)	Tempo (h)
<i>M. guilliermondii</i> UFMG01	-	25,75 ± 1,25 A	0,74 ± 0,13 A	0,35 ± 0,13 A	74,76 ± 0,34 A	27,44 ± 6,3 A	72h
<i>M. guilliermondii</i> UFMG02	-	25,18 ± 0,46 A	0,66 ± 0,17 A	0,34 ± 0,19 A	69,97 ± 0,81 B	24,64 ± 4,75 A	72h
<i>M. guilliermondii</i> UFMG04	-	25,49 ± 0,91 A	0,57 ± 0,11 A	0,35 ± 0,05 A	72,85 ± 1,93 B	23,8 ± 1,97 A	72h
<i>M. guilliermondii</i> UFMG10	-	25,46 ± 0,99 A	0,6 ± 0,09 A	0,35 ± 0,03 A	77,52 ± 4,81 A	24,64 ± 3,16 A	72h
<i>M. guilliermondii</i> UFMG12	-	24,95 ± 0,07 A	0,55 ± 0,09 A	0,34 ± 0,02 A	72,81 ± 2,26 B	25,48 ± 2,77 A	72h
<i>M. caribbica</i> UFMG07		20,27 ± 0,63 B	0,86 ± 0,03 A	0,28 ± 0,03A	70,50 ± 2,25B	28,00 ± 3,16A	72h
<i>M. caribbica</i> UFMG08		16,64 ± 5,78 B	0,54 ± 0,2 A	0,23 ± 0,2 A	71,04 ± 2,57B	31,36 ± 7,12A	72h

$E_{Máx}$: concentração máxima de etanol; $X_{Máx}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{p/s}$: fator de conversão de xilose em xilitol; Q_x : produtividade em xilitol; $Y_{Máx}$: consumo máximo de xilose; **Biomassa**: concentração de células produzidas; (-) não detectado; Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

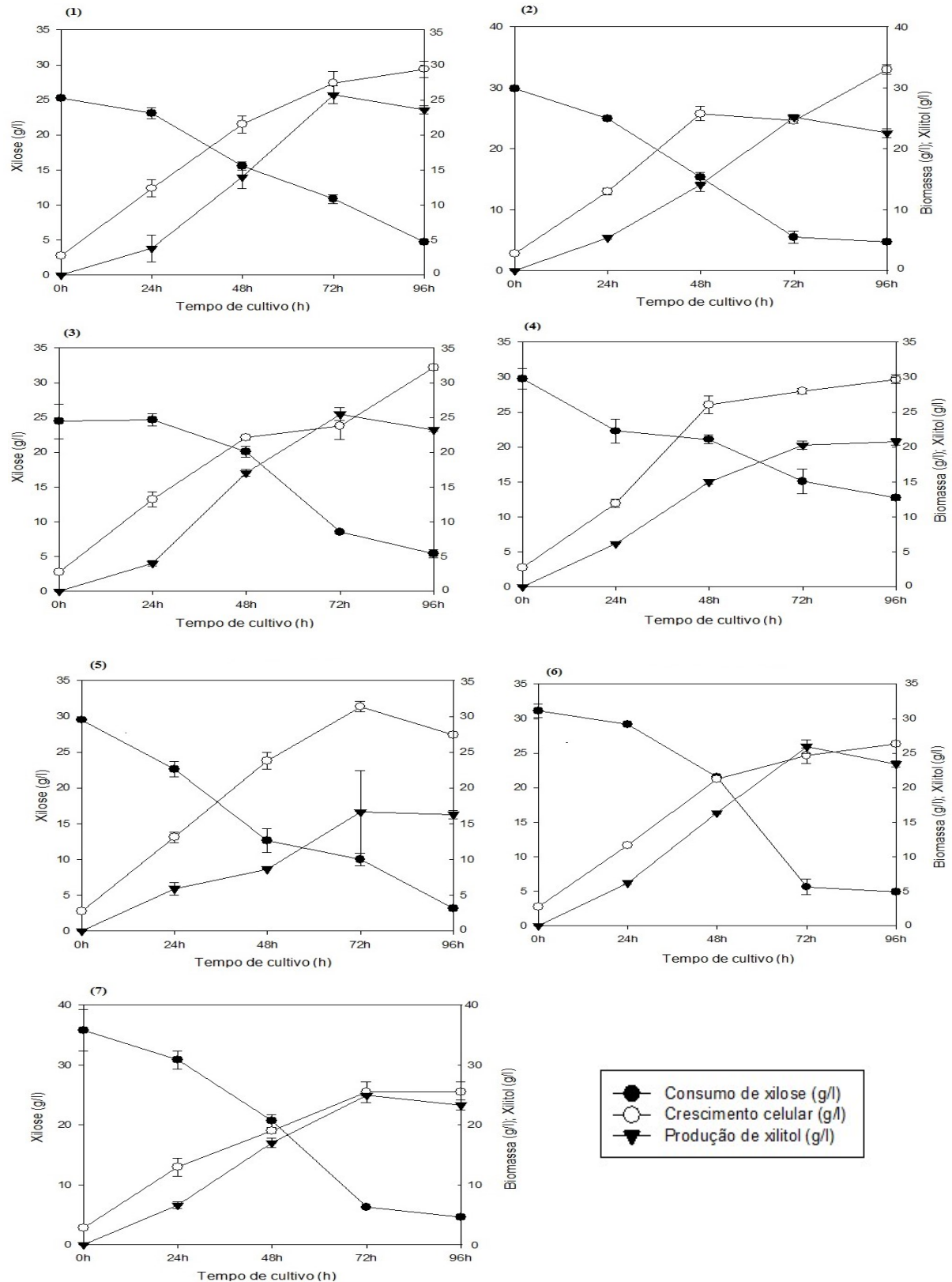


Figura 5: Perfil fermentativo das linhagens de levedura cultivadas em meio semi-sintético formulado com 45g/l de D-xilose, 5,0g/l de extrato de levedura e 2,5g/l de ureia, a 200 rpm e 30°C durante 96 horas de cultivo. (1) *M. guilliermondii* UFMG01; (2) *M. guilliermondii* UFMG02; (3) *M. guilliermondii* UFMG04; (4) *M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6) *M. guilliermondii* UFMG10; (7) *M. guilliermondii* UFMG12.

A atividade da enzima xilose redutase expressa pelas leveduras a partir do cultivo em meio semi-sintético suplementado, contendo D-xilose como fonte única de carbono, foi avaliada até 96h (Figura 6).

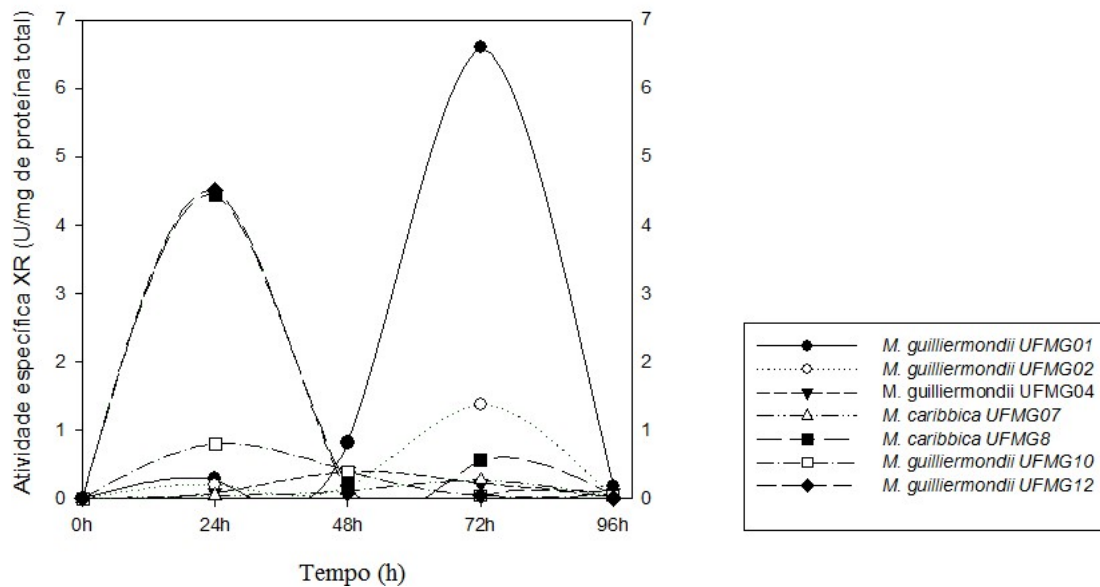


Figura 6: Perfil da atividade enzimática da XR expressa pelas linhagens de levedura em meio contendo apenas D-xilose como fonte de carbono após 96 horas de cultivo.

Todas as leveduras apresentaram atividade da enzima durante todos os pontos da fermentação (24 a 96h), sendo os valores observados para a atividade da enzima foram, em sua maioria, menores que $1\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, valores que são próximos ou até maiores do que os obtidos por outros pesquisadores. Branco e Colaboradores (2008) obtiveram $1,45\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de atividade de XR a partir de cultivo de *C. guilliermondii* FTI20037 em meio semi-sintético contendo 30g/l de xilose. Mouro 2012, cultivando outras espécies de *Candida*, *C. succiphila* Y-11998, *C. materiae* UFMG-07-C15.1B e *C. xylofermentans* HDM25.1, em meio contendo 2% de xilose, obteve valores de atividade de XR de $0,2\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ a $0,63\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$.

5.3 Avaliação da capacidade fermentativa de xilose pelas leveduras em estudo, utilizando hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado, e condições reguladoras do processo fermentativo

5.3.1 Efeito da concentração inicial do inóculo no processo fermentativo

Além de utilizar uma levedura com alta capacidade fermentativa de xilose, o conhecimento das condições ambientais que interferem na produção de xilitol pelas leveduras catalisadoras do processo é primordial para se obter o maior rendimento e produtividade na produção deste

álcool. Neste estudo, foram avaliados os parâmetros: concentração das células do inóculo inicial, aeração (controlada pela relação volume do frasco/volume do meio de cultivo) e concentração da fonte de carbono presente no hidrolisado (xilose e glicose).

Todas as leveduras em estudo foram capazes de crescer e produzir etanol e xilitol em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba, contendo glicose e xilose. O hidrolisado apresenta uma relação glicose:xilose de 1:1,7, relação próxima a sugerida por outros autores como capaz de favorecer a produção de xilitol. Estudo realizado por Silva e colaboradores (1998) demonstrou que a relação de 1:2,25 foi a relação que mais favoreceu o acúmulo de xilitol (27,8g/L), representando um aumento de 18,29% em comparação ao controle (glicose:xilose = 1:2,25). Diversos estudos têm relatado que presença de glicose pode afetar a assimilação e metabolismo da xilose e influenciar o rendimento e a produtividade do xilitol (TAVARES et al., 2000; FELIPE et al., 1993; ROSA et al., 1998, ; WALTHER et al., 2001). Esse efeito ocorre devido a molécula de D-xilose só poder ser transportada para dentro da célula por meio de transportadores de hexoses, os quais têm duas vezes mais afinidade por hexoses do que por pentoses (Leandro et al., 2009; Du et al., 2010), devido a ausência de transportadores específicos para esse açúcar. Além disso, estudos mostram que pequenas quantidades de glicose adicionadas no meio de cultivo favorecem o transporte de xilose em comparação com condições de cultivo idênticas nas quais não foi adicionada glicose, apesar desse mecanismo ainda não ser totalmente explicado (KRAHULEC et al., 2010). No presente trabalho foi observado que o consumo de glicose ocorre comumente nas primeiras 24h e somente após esse período de tempo que o consumo de xilose começa a ser significativo.

No ensaio de avaliação do efeito da concentração de células do inóculo inicial, foram avaliadas as concentrações de 0,28 e 2,8g/l (0,2 e 2,0 OD, respectivamente). Os parâmetros fermentativos calculados estão representados na Tabela 5. De modo geral, a alteração no inóculo afetou de forma significativa todos os parâmetros para a produção de etanol, exceto a eficiência de conversão de açúcares em etanol (Y_p/s).

De modo geral, o tempo requerido para a produção máxima de etanol variou com a linhagem de levedura em estudo e a concentração celular no inóculo. Nos ensaios com a menor concentração de inóculo, o período correspondeu à 96h para as linhagens *M. guilliermondii* UFMG02 e *M caribbica* UFMG07 e 72h para as demais. Nos ensaios com maior concentração de inóculo, o tempo de produção máxima de etanol diminuiu, sendo de 72h para as linhagens

UFMG01, UFMG10 e UFMG12 de *M. guilliermondii* e 48h para as demais. Nos cultivos com inóculo de menor densidade celular, os valores de produção de etanol não diferiram de forma significativa entre as linhagens ($p < 0,05$) e os valores variaram de 7,05 a 8,99 g/l. Já, nos cultivos com inóculos com maior densidade celular, foi observado aumento na produção de etanol para todas as linhagens em estudo. Os maiores valores foram observados para as linhagens UFMG12 (20,69g/l), UFMG04 (21.49 g/l), UFMG02 (21.82 g/l) e UFMG10 (22.45 g/l) de *M. guilliermondii*, os quais foram similares estatisticamente ($p < 0,05$).

Para a variável eficiência de conversão de açúcares em etanol, também foi observada interação significativa entre a linhagem de levedura em estudo e concentração de células no inóculo inicial ($p < 0,05$). A eficiência de conversão de açúcares em etanol a partir de cultivo com menor densidade celular não apresentou diferença significativa entre as linhagens estudadas ($p < 0,05$), sendo o maior valor obtido igual a 0,19g/g. Já, no cultivo com maior densidade celular, foi observada diferença significativa entre as linhagens de *M. guilliermondii* e entre as espécies, sendo os maiores valores observados para *M. guilliermondii* UFMG02 (0,61g/g), UFMG04 (0,68g/g) e UFMG10 (0,52g/g). Também foi possível observar que o aumento do inóculo inicial culminou em aumento desse parâmetro para todas as linhagens em estudo, exceto para *M. caribbica* UFMG07 que manteve o valor em ambos os tratamentos ($p < 0,05$).

A produtividade volumétrica, por sua vez, não variou com a linhagem de levedura em estudo ($p < 0,05$) nos ensaios com inóculo de menor densidade de células; e os valores foram próximos a 0,10g/l.h). Observa-se no entanto que a produtividade em etanol varia significativamente ($p < 0,05$) com o aumento de células no inóculo inicial, seguindo o mesmo padrão dos parâmetros analisados anteriormente. Os maiores valores foram observados para as linhagens UFMG04 (0,44 g/l.h) e UFMG10 (0,46 g/l.h) de *M. guilliermondii*, os quais são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

O tempo para a produção máxima de xilitol também variou com a linhagem em estudo e com a concentração celular no inóculo ($p < 0,05$), correspondendo a 72 h para as linhagens *M. caribbica* UFMG08 e *M. guilliermondii* UFMG12, e 96h para as demais linhagens em estudo, nos cultivos com inóculo de menor densidade celular. O aumento na concentração celular do inóculo reduziu o tempo para obtenção da máxima concentração de xilitol para 48h para as linhagens UFMG01, UFMG04 de *M. guilliermondii* e UFMG07 e UFMG08 de *M. caribbica*.

De modo geral, a alteração no inóculo afetou de forma significativa todos os parâmetros para a produção de xilitol, sendo que o aumento da concentração celular do inoculo inicial culminou em uma menor produção de xilitol. No cultivo com inóculo de menor densidade celular, os maiores valores foram observados para as linhagens UFMG02 (55,05 g/l), UFMG04 (56,14 g/l) e UFMG10 (55,84 g/l) de *M. guilliermondii*, os quais não diferiram de forma significativa ($p < 0,05$). Para as demais linhagens foi possível observar diferença estatística entre a maioria, sendo a menor produção foi observada para a linhagem *M. caribbica* UFMG07. Para cultivo em maior densidade celular a maior produção foi 18,74g/l para *M. guilliermondii* UFMG02 e as menores para a linhagem UFMG01 de *M. guilliermondii* (12,15 g/l) e UFMG07 de *M. caribbica* (12,24g/l), estatisticamente similares ($p < 0,05$).

A eficiência de conversão de açúcares em xilitol a partir de cultivo com menor densidade celular foi maior para *M. guilliermondii* UFMG12 (0,83g/g), valor estatisticamente igual ao obtido por *M. guilliermondii* UFMG01 e UFMG04, sendo estatisticamente diferente dos demais ($p < 0,05$). No cultivo com maior densidade celular, o maior valor obtido foi 0,78g/g por *M. guilliermondii* UFMG02, estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) ao apresentado por *M. guilliermondii* UFMG01. A eficiência de conversão de açúcares em xilitol varia com a alteração do inóculo para todos os isolados, exceto *M. guilliermondii* UFMG 01 e UFMG10 e *M. caribbica* UFMG08.

De modo geral, o aumento da densidade celular resultou em diminuição na produtividade em xilitol ($p < 0,05$). A maior produtividade volumétrica para xilitol foi obtida cultivando-se *M. guilliermondii* UFMG12 em menor densidade celular (0,69g/g), valor estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) ao obtido por todas as outras linhagens, exceto *M. caribbica* UFMG07. A partir do cultivo em maior densidade celular obteve-se o valor máximo de 0,32g/l.h obtido pelas linhagens UFMG4 e UFMG10 de *M. guilliermondii* e *M. caribbica* UFMG08, sendo estatisticamente diferente dos demais ($p < 0,05$) que foram resultados mais baixos.

De modo geral, o aumento da concentração de células no inoculo inicial levou ao aumento do crescimento celular durante o processo fermentativo. Em cultivo com menor inoculo inicial, o crescimento celular não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) com as linhagens, sendo o valor máximo obtido igual a 19,88g/l. Já, no ensaio com inoculo inicial igual a 2,8g/l o crescimento celular atingiu a faixa de 38,88 a 57,3g/l, sendo o menor valor obtido por *M. guilliermondii* UFMG12 e o maior para UFMG02. Foi observada correlação forte negativa entre o

crescimento celular e a produção de xilitol (Pearson, $r = -0,89$; $p = 0,00$), enquanto para a produção de etanol a correlação foi forte positiva (Pearson, $r = 0,92$; $p = 0,00$), indicando que o aumento do crescimento celular favoreceu o aumento da produção de etanol, enquanto levou a diminuição da produção de xilitol. Também foi observada correlação forte negativa (Pearson, $r = -0,88$; $p = 0,00$), entre produção de etanol e xilitol, indicando que o aumento da produção de xilitol culmina em diminuição da produção de etanol.

O consumo total de açúcares aumentou para as linhagens UFMG04 e UFMG10 de *M. guilliermondii* e UFMG08 de *M. caribbica*, permanecendo estatisticamente igual ($p < 0,05$) para as outras linhagens diante do aumento do inoculo inicial. Os maiores valores em menor inoculo inicial foram obtidos por *M. guilliermondii* UFMG01, UFMG02, UFMG10 e UFMG12, sendo sempre acima de 90% e não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre esses isolados. Não foi observada correlação entre consumo de açúcares totais e produção de xilitol (Pearson, $r = 0,03$; $p = 0,99$) e etanol (Pearson, $r = 0,15$; $p = 0,65$).

De modo geral, o aumento na concentração inicial de células de 0,28g/l para 2,8g/l, resultou em aumento dos parâmetros fermentativos para etanol, porém diminuiu os parâmetros para xilitol. Também foi possível observar que o consumo quase total de glicose e xilose ocorreu nas primeiras 24 horas, mesmo período no qual a curva de produção de xilitol tem uma inclinação maior, indicando maior velocidade de produção de xilitol. A produção de xilitol ocorre ao longo do tempo de crescimento, acompanhando a curva de crescimento. A maior velocidade de produção de etanol também ocorre nas primeiras 24 horas, podendo estar associada ao consumo de glicose, o que indica que as leveduras não produzem etanol a partir de xilose, como observado no experimento anterior.

Para a máxima produção de xilitol deve haver uma concentração celular inicial ideal, sendo que o aumento da concentração do inoculo inicial pode culminar em uma maior ou menor produção. Dominguez e Colaboradores (1997), cultivando *D. hansenii* em meio contendo 12% de xilose observaram que o aumento do inoculo inicial de 0,3 para 3,0 resultou em aumento da produção de xilitol de 60,1g/l para 105,8g/l em 72h de cultivo. Já, em outro estudo, Roberto e Colaboradores (1996), cultivando *C. guilliermondii* FT20037, observaram que o aumento na concentração celular inicial de 0,67g/l para 2,41g/l ocasionou um decréscimo da produção de xilitol de 39,46g/l para 20,46g/l. Diante desses resultados é perceptível a necessidade de se adequar a concentração de xilose no meio de cultivo para cada espécie estudada.

Tabela 5: Efeito da concentração de células, do inóculo inicial, nos parâmetros fermentativos das leveduras em estudo, cultivadas em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba adicionado de suplementos.

Concentração celular do inóculo										
	0,28g/l	2,8g/l	0,28g/l	2,8g/l	0,28g/l	2,8g/l	0,28g/l	2,8g/l	0,28g/l	2,8g/l
Isolado	$E_{M\acute{a}x}(g/l)$		$Y_{p/s\text{etanol}}(g/g)$		$Q_{p\text{etanol}}(g/l.h)$		Tempo (h)		Biomassa (g/l)	
<i>M. guilliermondii</i> UFMG01	7,24 ± 0,80 Ab	17,39 ± 1,35 Ba	0,09 ± 0,00 Ab	0,35 ± 0,13 Ba	0,10 ± 0,01 Ab	0,24 ± 0,01 Da	72	72	16,8 ± 1,12 Ab	43,20 ± 2,38 Ba
<i>M. guilliermondii</i> UFMG02	8,99 ± 0,30 Ab	21,82 ± 2,78 Aa	0,02 ± 0,00 Ab	0,61 ± 0,12 Aa	0,09 ± 0,00 Ab	0,30 ± 0,01 Ca	96	72	14,56 ± 1,85 Ab	57,30 ± 3,75 Aa
<i>M. guilliermondii</i> UFMG04	7,88 ± 0,15 Ab	21,49 ± 2,45 Aa	0,12 ± 0,01 Ab	0,68 ± 0,21 Aa	0,10 ± 0,00 Ab	0,44 ± 0,02 Aa	72	48	19,88 ± 2,15 Ab	43,20 ± 1,65 Ba
<i>M. caribbica</i> UFMG07	8,86 ± 0,20 Ab	17,83 ± 0,84 Ba	0,19 ± 0,05 Aa	0,32 ± 0,18 Ba	0,09 ± 0,00 Ab	0,37 ± 0,01 Ba	96	48	19,88 ± 2,07 Ab	44,64 ± 1,32 Ba
<i>M. caribbica</i> UFMG08	7,05 ± 0,00 Ab	16,46 ± 1,73 Ba	0,03 ± 0,00 Bb	0,32 ± 0,01 Ba	0,09 ± 0,01 Ab	0,34 ± 0,07 Ca	72	48	18,76 ± 1, 12 Ab	44,64 ± 3,8 Ba
<i>M. guilliermondii</i> UFMG10	7,66 ± 0,89 Ab	22,45 ± 1,85 Aa	0,07 ± 0,00Ab	0,52 ± 0,17 Aa	0,10 ± 0,01 Ab	0,46 ± 0,05 Aa	72	48	18,48 ± 1,09 Ab	44,24 ± 2,68 Ba
<i>M. guilliermondii</i> UFMG12	7,88 ± 0,17Ab	20,69 ± 3,2 Aa	0,09 ± 0,00 Ab	0,44 ± 0,02 Ba	0,10 ± 0,01 Ab	0,28 ± 0,01 Da	72	72	19,32 ± 1,87 Ab	38,88 ± 2,50 Ca
Isolado	$X_{M\acute{a}x}(g/l)$		$Y_{p/s\text{xilitol}}(g/g)$		$Q_{x\text{ilitol}}(g/l.h)$		Tempo (h)		Y (%)	
<i>M. guilliermondii</i> UFMG01	48,40 ± 2,35 Ba	12,15 ± 1,51 Cb	0,73 ± 0,15 Aa	0,70 ± 0,09 Aa	0,63 ± 0,15 Aa	0,25 ± 0,01 Bb	96	48	93,62 ± 2,15 Aa	90,89 ± 2,58 Aa
<i>M. guilliermondii</i> UFMG02	55,05 ± 3,15 Aa	18,74 ± 1,53Ab	0,40 ± 0,03Bb	0,78 ± 0,03 Aa	0,57 ± 0,04 Aa	0,19 ± 0,01 Bb	96	96	95,13 ± 1,15 Aa	92,20 ± 3,98 Aa
<i>M. guilliermondii</i> UFMG04	56,14 ± 2,13 Aa	15,56 ± 0,9 Bb	0,72 ± 0,18 Aa	0,36 ± 0,01 Bb	0,58 ± 0,05 Aa	0,32 ± 0,01 Ab	96	48	84,46 ± 2,13 Bb	90,91 ± 5,45 Aa
<i>M. caribbica</i> UFMG07	35,76 ± 0,75 Da	12,24 ± 1,89 Cb	0,46 ± 0,05Ba	0,19 ± 0,02 Cb	0,37 ± 0,01 Ba	0,25 ± 0,05 Bb	96	48	82,96 ± 3,18 Ba	87,52 ± 3,25 Aa
<i>M. caribbica</i> UFMG08	45,78 ± 1,13 Ca	15,56 ± 0,78 Bb	0,26 ± 0,01Ca	0,38 ± 0,03 Ba	0,63 ± 0,00 Aa	0,32 ± 0,03 Ab	72	48	81,53 ± 3,78 Bb	90,00 ± 0,50 Aa
<i>M. guilliermondii</i> UFMG10	55,84 ± 0,95 Aa	15,48 ± 1,5 Bb	0,51 ± 0,19Ba	0,39 ± 0,3 Ba	0,58 ± 0,02 Aa	0,32 ± 0,01 Ab	96	96	94,19 ± 4,15 Ab	88,17 ± 5,32 Aa
<i>M. guilliermondii</i> UFMG12	50,39 ± 1,15 Ba	14,17 ± 2,3 Bb	0,83 ± 0,07 Aa	0,31 ± 0,07 Bb	0,69 ± 0,13 Aa	0,19 ± 0,01 Bb	72	72	94,43 ± 3,19 Ab	88,37 ± 4,78 Ab

$E_{M\acute{a}x}$: concentração máxima de etanol (); $X_{M\acute{a}x}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{M\acute{a}x}(\%)$: consumo máximo de açúcares totais; $Biomassa (g/l)$: concentração de células produzidas; $Y_{p/s} (g/g)$: fator de conversão de xilose em xilitol; $Q_x (g/l.h)$: produtividade em xilitol; (-) não detectado. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna (comparação entre isolados) e minúsculas na mesma linha (comparação entre experimentos) não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

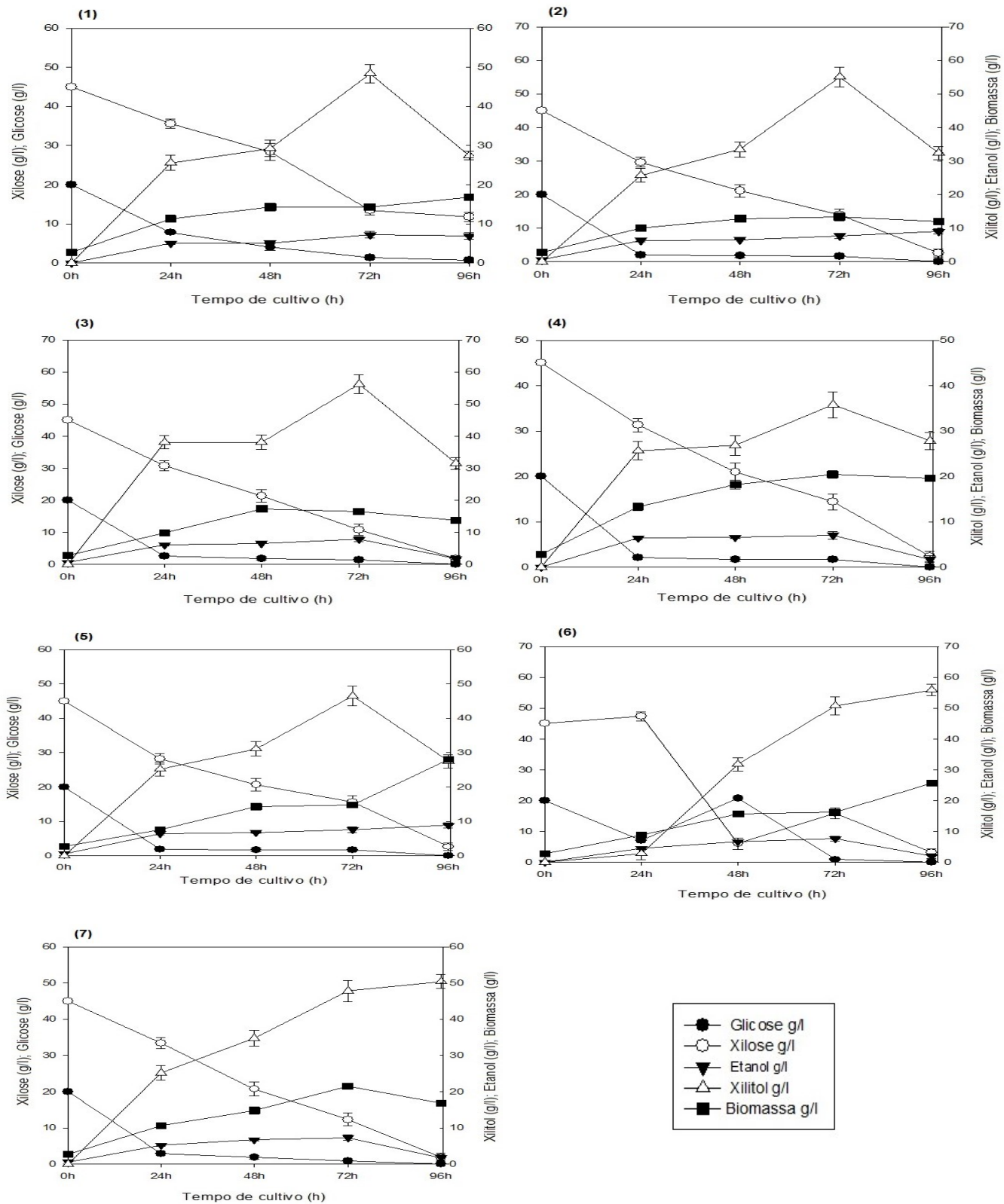


Figura 7: Perfil fermentativo das leveduras em estudo em meio a base de hidrolisado e suplementos, durante 96 horas de cultivo com inoculo inicial 0,28g/l. (1)*M. guilliermondii* UFMG01; (2)*M. guilliermondii* UFMG02; (3)*M. guilliermondii* UFMG04; (4)*M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6)*M. guilliermondii* UFMG10; (7)*M. guilliermondii* UFMG12.

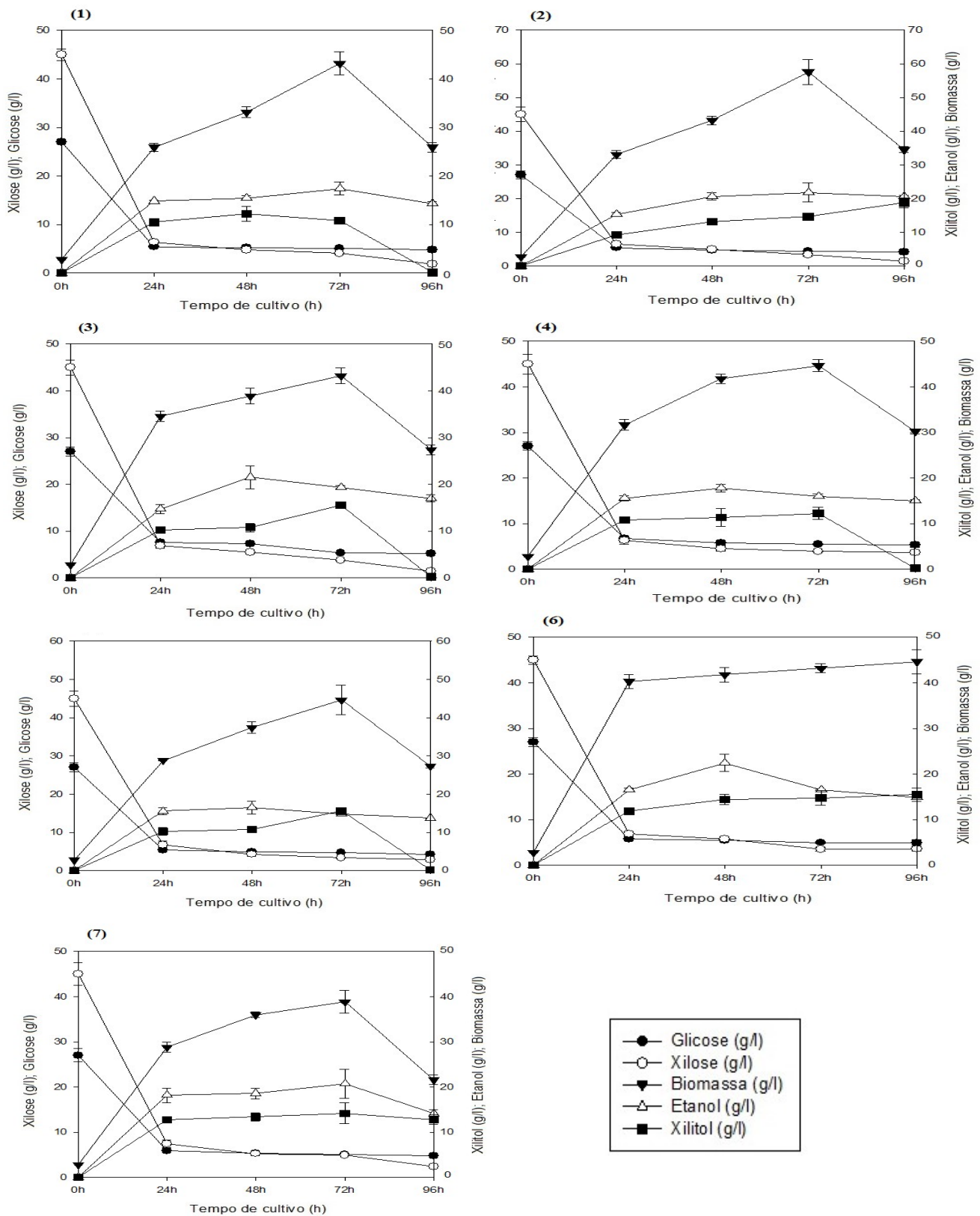


Figura 8: Perfil fermentativo das linhagens de levedura em meio a base de hidrolisado e suplementos, após 96 horas de cultivo concentração de inoculo inicial de 2,8g/l . (1)*M. guilliermondii* UFMG01; (2)*M. guilliermondii* UFMG02; (3)*M. guilliermondii* UFMG04; (4)*M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6)*M. guilliermondii* UFMG10; (7)*M. guilliermondii* UFMG12.

A atividade da enzima xilose redutase expressa pelas leveduras a partir do cultivo em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado, foi avaliada até 96h para os ensaios fermentativos com inoculo inicial 0,28g/l e 2,8g/l. Os parâmetros estão representados nos gráficos 1 e 2, respectivamente (Figura 9).

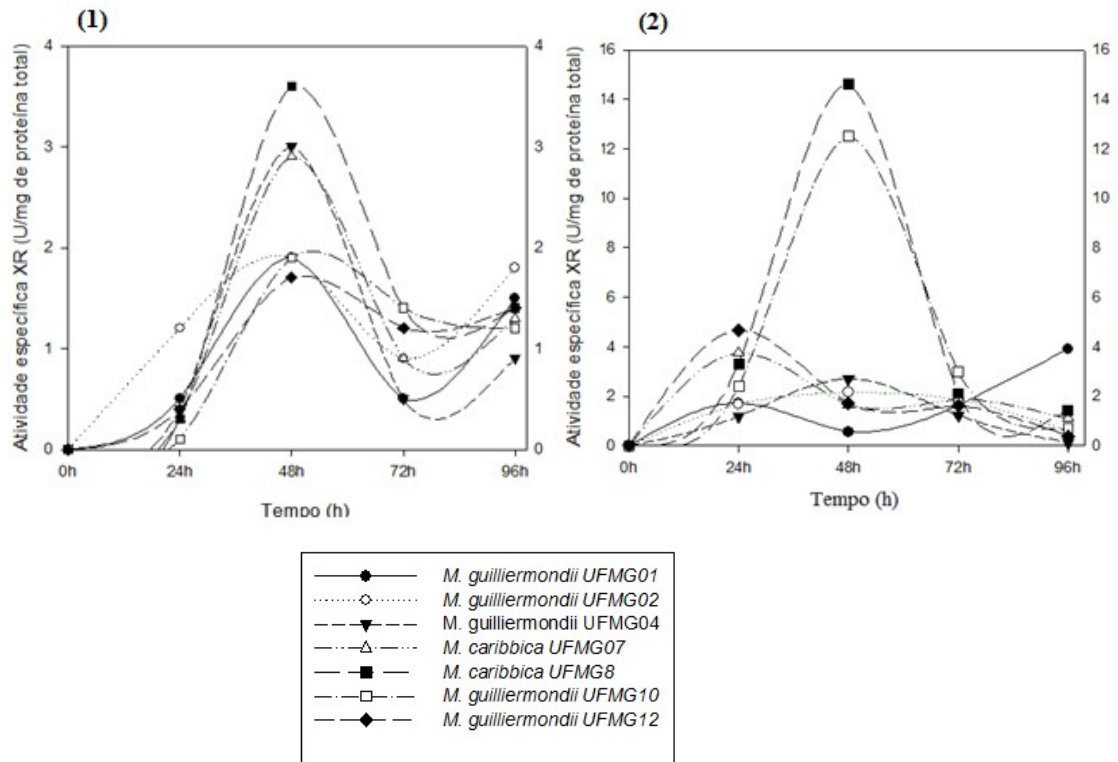


Figura 9: Perfil da atividade enzimática da XR expressa pelas linhagens de levedura em meio a base de hidrolisado e suplementos, com inóculo celular inicial igual a 0,28g/l (1) e 2,8g/l (2), respectivamente, após 96 horas de cultivo.

Em ambas as condições, percebe-se valores maiores de atividade da enzima XR em relação ao experimento no qual foi utilizado meio semi-sintético com D-xilose como fonte única de carbono. A presença de glicose no meio de cultivo a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba pode ter ativado os transportadores que podem transportar a xilose com maior afinidade, principalmente após o consumo da glicose que ocorreu nas primeiras 24h de cultivo (Figura 8). Porém, enquanto há altas concentrações dos dois açúcares no meio a captação de xilose pode ser reprimida por glicose devido à competição de ambos pelo mesmo transportador (KOTTER E CIRIACY, 1993; LE et al., 2002). Essa repressão também ocorre quando há outros substratos, como a frutose e a manose, juntamente com xilose, saturando o sistema (HAHN-HAGERDAL, 1997).

No experimento com inoculo inicial igual a 0,28g/l (Gráfico 1), são observados valores de atividade para XR entre 0,5 e 3,5U.mg⁻¹. No experimento com inóculo inicial igual a 2,8g/l (Gráfico 2) foram observados maiores valores de atividade da enzima (1,0 a 4,0U.mg⁻¹ em sua maioria e dois valores acima de 10,0U.mg⁻¹), apesar de nesse experimento ter sido observada menor produção global de xilitol em relação ao primeiro experimento. Essa observação pode ser justificada pelo crescimento celular que foi em média de duas a três vezes maior do que no primeiro experimento. Em estudo com *C. guilliermondii* FT120037, Branco (2010) observou que em ensaio com inoculo inicial igual a 1,60g/l a máxima atividade específica da enzima XR foi 0,220U.mg⁻¹, enquanto que aumentando a concentração do inoculo inicial para 3,83g/l aumentou a atividade em 7 vezes, alcançando o valor de 1,415U.mg⁻¹.

Também pode ser observado que para as diferentes linhagens estudadas há variação da atividade ao longo do tempo, o que está relacionado ao potencial de produção de xilitol de cada uma delas.

5.3.2 Efeito da aeração no processo fermentativo

Os resultados dos ensaios de avaliação do efeito da aeração, obtida pela variação da relação volume do frasco pelo volume do meio de cultivo (2,5 e 5,0), nos parâmetros fermentativos das leveduras em estudo estão apresentados na Tabela 6. Nos ensaios foi utilizada a concentração celular inicial de 0,28g/l, a qual resultou em maiores produções de xilitol quando comparado ao inóculo de 2,8g/l.

De modo geral, o aumento na aeração resultou em aumento de todos os parâmetros fermentativos de produção de etanol e diminuição nos tempos para sua produção máxima.

O período para a produção máxima de etanol correspondeu à 96h para as linhagens *M. guilliermondii* UFMG02 e *M. caribbica* UFMG07 nos ensaios com aeração igual a 2,5 e para *M. guilliermondii* UFMG01 e UFMG10 para ensaios com aeração igual a 5,0, sendo o tempo de 72h para as demais linhagens, em ambos os tratamentos. A produção máxima de etanol diferiu de forma significativa com a linhagem em estudo e com a aeração ($p < 0,05$). Em cultivo com aeração (vmeio/vfrasco) igual a 5,0, os valores variaram de 13,81g/l (*M. guilliermondii* UFMG12) a 18,47 g/l (*M. guilliermondii* UFMG04), aumentando em cerca de 100% em relação ao cultivo realizado com aeração igual a 2,5.

A conversão de açúcares em etanol também aumentou (de duas a cinco vezes) com o cultivo com aeração (vmeio/vfrasco) igual a 5,0, sendo observados valores de 0,39g/g (*M guilliermondii* UFMG12) a 0,60g/g (*M guilliermondii* UFMG04). Os valores obtidos em ambos os cultivos variaram de forma significativa entre espécies e entre as linhagens de uma mesma espécie. A produtividade volumétrica em etanol, por sua vez, variou de 0,14g/lh (*M guilliermondii* UFMG10) a 0,25g/l.h (*M guilliermondii* UFMG04) em cultivo com aeração igual a 5,0, também apresentando aumento em relação ao valor obtido com aeração 2,5. Os valores obtidos em ambos os cultivos variaram de forma significativa entre espécies e entre as linhagens apenas quando a aeração foi igual a 5,0.

De modo geral, o aumento na aeração resultou em manutenção ou aumento de todos os parâmetros fermentativos de produção de xilitol, dependendo da linhagem avaliada e houve a manutenção nos tempos para sua produção máxima, sendo que esse também variou com a linhagem em estudo, correspondendo a 72 h para *M. caribbica* UFMG08 e *M. guilliermondii* UFMG12 e 96 h para as demais linhagens em estudo.

A produção máxima de xilitol também variou com a linhagem em estudo ($p < 0,05$), sendo os maiores valores observados para as linhagens UFMG01 (57,43 g/l) e UFMG04 (58,35 g/l) de *M. guilliermondii*, os quais não diferiram de forma significativa ($p < 0,05$). A menor produção foi observada para *M. guilliermondii* UFMG10. Para as linhagens *M guilliermondii* UFMG02 e UFMG04 não houve diferença estatística entre os valores de produção de xilitol nos diferentes cultivos. Para as demais, a condição de cultivo com aeração 5,0 levou a uma maior produção.

Para a eficiência de conversão de açúcares a xilitol e produtividade em xilitol, observa-se que não há diferença estatística entre os valores obtidos com aeração 2,5 e 5,0, exceto para *M caribbica* UFMG08 para a qual foi verificado aumento significativo com o aumento da aeração. Os maiores valores de eficiência de conversão de açúcares em xilitol em cultivo com aeração igual a 5,0 foram verificados para *M. guilliermondii* UFMG12 (0,68g/g) e *M. caribbica* UFMG08 (0,89g/g).

Para produtividade em xilitol, os maiores valores observados foram 0,75g/lh e 0,76g/lh para *M. caribbica* UFMG08 e *M. guilliermondii* UFMG12, havendo aumento significativo ($p < 0,05$) desse parâmetro quando se aumentou a concentração de açúcares apenas para *M. caribbica*

UFMG07 e UFMG08. Os valores obtidos em ambos os cultivos variaram de forma significativa entre espécies e entre as linhagens apenas com aeração igual a 5,0.

Em relação ao crescimento celular, houve aumento significativo com o aumento da aeração apenas para *M. caribbica* UFMG07 e *M. guilliermondii* UFMG10, sendo o maior valor obtido igual a 28,8g/l (*M. caribbica* UFMG07). Os valores obtidos para esse parâmetro em ambos os cultivos variaram de forma significativa entre espécies e entre as linhagens. Não foi observada correlação entre produção de xilitol (Pearson, $r=0,29$; $p=0,56$) e etanol (Pearson, $r= - 0,14$; $p=0,79$) e o crescimento celular para essas condições de cultivo.

Já, em relação ao consumo de açúcares, esse aumentou significativamente com o aumento da aeração apenas para as linhagens UFMG04 de *M. guilliermondii* e *M. caribbica* UFMG07 e UFMG08. De forma geral, não foi observada correlação entre o consumo de açúcares totais e a produção de xilitol (Pearson, $r= -0,27$; $p=0,59$) e etanol (Pearson, $r=0,17$; $p=0,74$).

A aeração tem sido considerada um dos fatores mais importantes na biconversão de xilose a xilitol, não estando em uma condição ótima ela leva a uma diminuição da produtividade e do rendimento em xilitol (SILVA et al., 1996). O requerimento de oxigênio está relacionado ao transporte de açúcares, regeneração de coenzimas e produção de ATP durante a fosforilação oxidativa (SILVA et al., 1998). A falta de oxigênio pode ocasionar desbalanço redox, paralisação do crescimento celular e da assimilação de xilose, e conseqüentemente da produção de xilitol (VANDESKA et al., 1995). Dessa forma, a quantidade de oxigênio disponível é fator determinante para o uso da xilose para fermentação ou respiração, regulando o consumo do carbono para bioconversão ou crescimento (KUZMANOVA, 1998).

A fisiologia do requerimento de oxigênio no metabolismo das leveduras ainda não foi totalmente esclarecida (SAMPAIO, 2001). Estudos mostram que para ocorrer efetiva produção de xilitol é necessário regular a quantidade de oxigênio disponível, podendo ser em níveis mais baixos, porém com um mínimo necessário (SILVA et al, 1998). O xilitol pode ser produzido em condições aeróbicas ou em limitação de oxigênio, mas não em condições anaeróbicas. Sirisansanneeyakul e colaboradores (1995) observaram que *Candida moggii* ATCC 18364 cultivada em anaerobiose por 48h não apresentou crescimento celular e consumo de xilose expressivos com conseqüente baixa formação de etanol e xilitol.

Em outro estudo, WALTHER et al (2001) cultivando *C. tropicalis* ATCC 96745 em diferentes condições de aeração, controlada pela relação entre volume dos frascos e volume do meio, observaram que a maior produtividade em xilitol foi obtida durante o cultivo em aerobiose (0,9g/l.h). Nesse experimento notou-se que em consequência da alta aeração e concentração de xilose ocorria alta produção de xilitol, explicada pelo crescimento vigoroso das células durante o cultivo, com consequente consumo de oxigênio e alta produção de xilitol. Cultivando-se a mesma linhagem em condição semi-aeróbica obteve-se o melhor valor para eficiência de conversão de xilose a xilitol (0,7g/g).

Tabela 6: Efeito da variação da aeração nos parâmetros fermentativos das leveduras em estudo cultivadas em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba adicionado de suplementos.

Aeração (Vfrasco/Vmeio)											
		2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0
Isolado	$E_{Máx}(g/l)$	$Y_{p/S_{etanol}}(g/g)$		$Q_{etanol}(g/l.h)$		Tempo (h)		Biomassa (g/l)			
<i>M guilliermondii</i> UFMG01	7,24 ± 0,80 Bb	14,70 ± 1,25Ba	0,09 ± 0,00 Cb	0,45 ± 0,00 Ca	0,10 ± 0,01 Ab	0,15 ± 0,00CDa	72	96	16,8 ± 1,12 Ba	16,8 ± 0,8Ca	
<i>M. guilliermondii</i> UFMG02	8,99 ± 0,30 Ab	14,29 ± 0,75 Ba	0,02 ± 0,00 Db	0,49 ± 0,01 Ca	0,09 ± 0,00 Ab	0,19 ± 0,01 BCa	96	72	14,56 ± 1,85 Ba	13,44 ± 0,90Da	
<i>M guilliermondii</i> UFMG04	7,88 ± 0,15 Bb	18,47 ± 2,29 Aa	0,12 ± 0,01 Bb	0,60 ± 0,05 Aa	0,10 ± 0,00 Ab	0,25 ± 0,01 Aa	72	72	19,88 ± 2,15 Aa	17,36 ± 1,25Ca	
<i>M. caribbica</i> UFMG07	8,86 ± 0,20 Ab	15,65 ± 1,78 Ba	0,19 ± 0,05 Ab	0,53 ± 0,03 Bba	0,09 ± 0,00 Ab	0,21 ± 0,02 ABa	96	72	19,88 ± 2,07 Ab	28,00 ± 1,78Aa	
<i>M caribbica</i> UFMG08	7,05 ± 0,00 Bb	14,66 ± 0,85 Ba	0,03 ± 0,00 Db	0,48 ± 0,01 Ca	0,09 ± 0,01 Ab	0,20 ± 0,01 Ba	72	72	18,76 ± 1, 12 Aa	20,44 ± 1,35Ba	
<i>M guilliermondii</i> UFMG10	7,66 ± 0,89 Bb	14,37 ± 1,01 Ba	0,07 ± 0,00 Cb	0,47 ± 0,08 Ca	0,10 ± 0,01 Ab	0,14 ± 0,02 Da	72	96	18,48 ± 1,09 Ab	25,76 ± 1,45Aa	
<i>M guilliermondii</i> UFMG12	7,88 ± 0,17 Bb	13,81 ± 0,65 Ba	0,09 ± 0,00 Cb	0,39 ± 0,07Da	0,10 ± 0,01 Ab	0,19 ± 0,02 BCa	72	72	19,32 ± 1,87 Aa	21,56 ± 2,01Ba	
Isolado	$X_{Máx}(g/l)$	$Y_{p/S_{xilitol}}(g/g)$		$Q_{xilitol}(g/l.h)$		Tempo (h)		Y(%)			
<i>M guilliermondii</i> UFMG01	48,40 ± 2,35 Bb	57,43 ± 2,75Aa	0,66 ± 0,15Aa	0,66 ± 0,15Ba	0,50 ± 0,15 Aa	0,59 ± 0,01 Ba	96	96	93,62 ± 2,15 Aa	80,67 ± 2,15 Bb	
<i>M guilliermondii</i> UFMG02	55,05 ± 3,15 Aa	53,98 ± 2,69 Ba	0,40 ± 0,03 Ba	0,40 ± 0,09Ca	0,57 ± 0,04 Aa	0,56 ± 0,17 Ba	96	96	95,13 ± 1,15 Aa	96,14 ± 3,17 Aa	
<i>M guilliermondii</i> UFMG04	56,14 ± 2,13 Aa	58,35 ± 1,99 Aa	0,72 ± 0,18 Aa	0,46 ± 0,07Cb	0,58 ± 0,05 Aa	0,60 ± 0,05 Ba	96	96	84,46 ± 2,13 Bb	97,49 ± 2,02 Aa	
<i>M caribbica</i> UFMG07	35,76 ± 0,75 Db	47,64 ± 1,17 Ca	0,46 ± 0,05 Ba	0,57 ± 0,11Ca	0,37 ± 0,01 Ba	0,49 ± 0,02Ba	96	96	82,96 ± 3,18 Bb	96,01 ± 1,08 Aa	
<i>M caribbica</i> UFMG08	45,78 ± 1,13 Cb	54,04 ± 1,45 Ba	0,26 ± 0,01 Bb	0,89 ± 0,13 Aa	0,63 ± 0,00 Aa	0,75 ± 0,00 Aa	72	72	81,53 ± 3,78 Bb	96,37 ± 0,98 Aa	
<i>M guilliermondii</i> UFMG10	55,84 ± 0,95 Aa	40,84 ± 2,02 Db	0,51 ± 0,19 Ba	0,35 ± 0,09Ca	0,58 ± 0,02 Aa	0,42 ± 0,13Ba	96	96	94,19 ± 4,15 Aa	94,96 ± 1,35 Aa	
<i>M guilliermondii</i> UFMG12	50,39 ± 1,15 Bb	54,99 ± 2,19Ba	0,83 ± 0,07 Aa	0,68 ± 0,15Ba	0,69 ± 0,13 Aa	0,76 ± 0,08 Aa	72	72	94,43 ± 3,19 Aa	97,22 ± 1,15 Aa	

$E_{Máx}$: concentração máxima de etanol (); $X_{Máx}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{Máx}(\%)$: consumo máximo de açúcares totais; $Biomassa (g/l)$: concentração de células produzidas; $Y_{p/s} (g/g)$: fator de conversão de xilose em xilitol; $Q_x (g/l.h)$: produtividade em xilitol; (-) não detectado. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna (comparação entre isolados) e minúsculas na mesma linha (comparação entre experimentos) não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

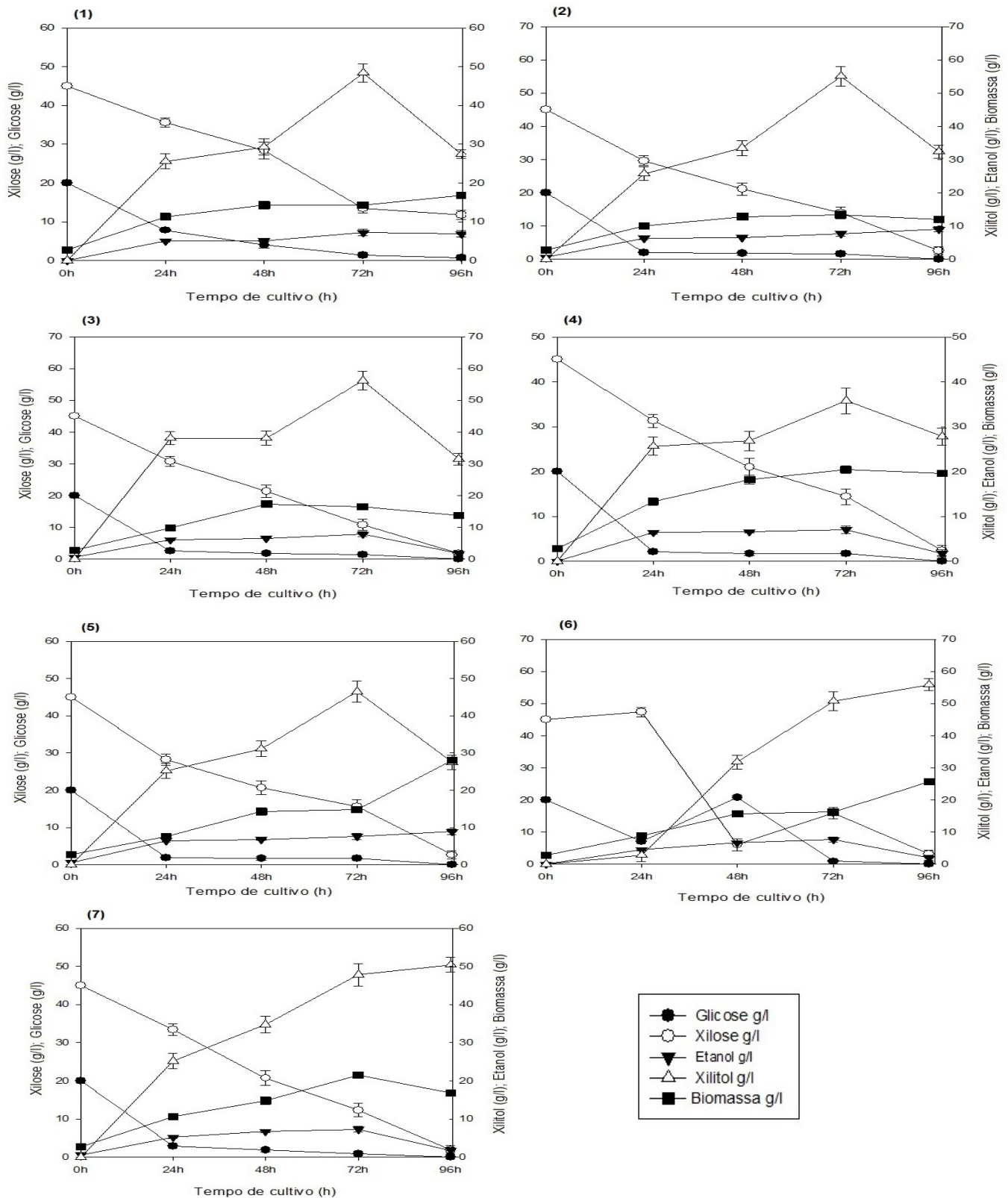


Figura 10: Perfil fermentativo das leveduras em estudo em meio a base de hidrolisado e suplementos, durante 96 horas de cultivo com aeração igual a 2,5. (1)*M. guilliermondii* UFMG01; (2)*M. guilliermondii* UFMG02; (3)*M. guilliermondii* UFMG04; (4)*M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6)*M. guilliermondii* UFMG10; (7)*M. guilliermondii* UFMG12.

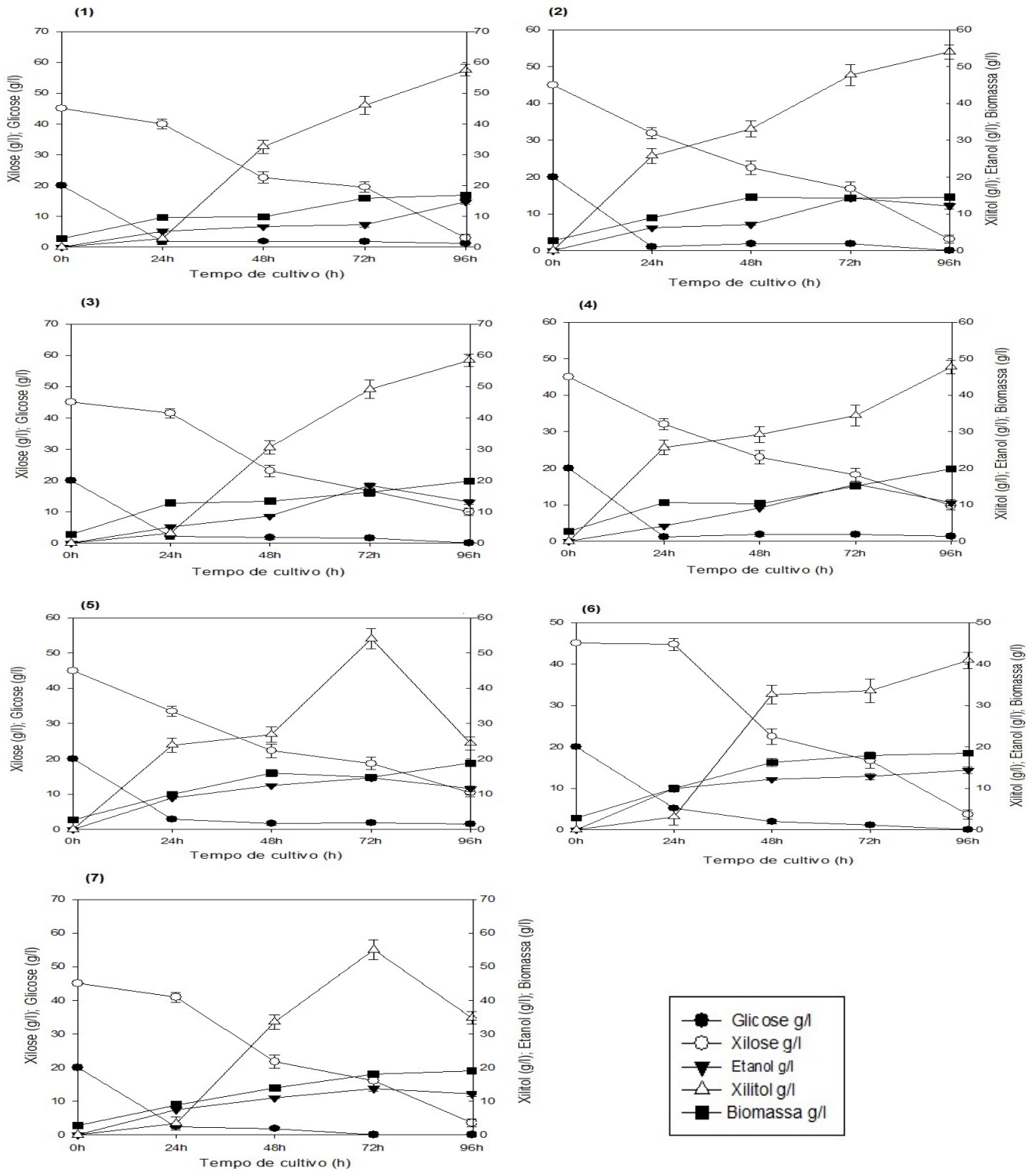


Figura 11: Perfil fermentativo das leveduras em estudo em meio a base de hidrolisado e suplementos, durante 96 horas de cultivo com aeração igual a 5,0. (1)*M. guilliermondii* UFMG01; (2)*M. guilliermondii* UFMG02; (3)*M. guilliermondii* UFMG04; (4)*M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6)*M. guilliermondii* UFMG10; (7)*M. guilliermondii* UFMG12.

A atividade da enzima xilose redutase expressa pelas leveduras a partir do cultivo em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado, com aeração 2,5 e 5,0 foi avaliada até 96h. Os parâmetros estão representados nos gráficos 1 e 2 (Figura 12).

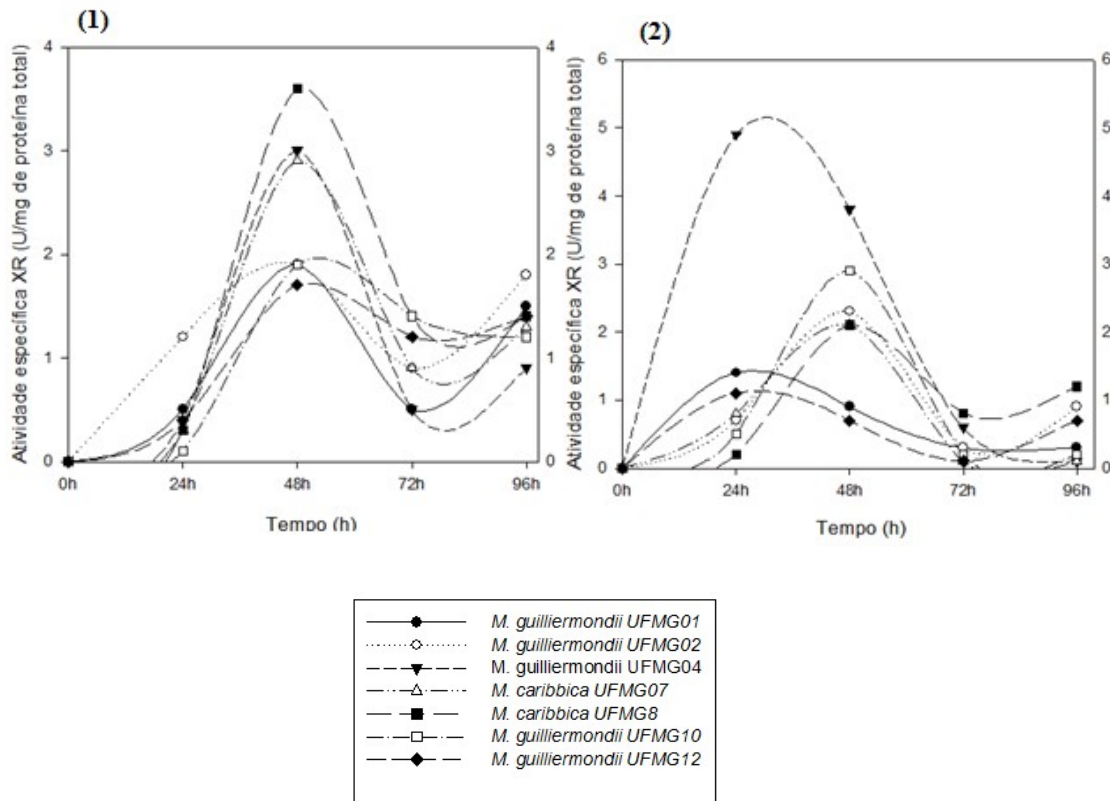


Figura 12: Perfil da atividade enzimática da XR expressa pelas linhagens de levedura em meio a base de hidrolisado e suplementos, com aeração 2,5 (1) e 5,0 (2), após 96 horas de cultivo.

No experimento com aeração igual a 2,5 são observados valores de atividade para XR entre 0,5 e 3,5U.mg⁻¹, maiores que no experimento contendo apenas D-xilose como fonte de carbono. O aumento da aeração não resultou em aumentos expressivos de atividade da XR observada nos ensaios, os quais variaram de 1,0 e 3,0U.mg⁻¹ em sua maioria. Esses valores podem explicar o padrão similar de produção de xilitol observado em ambos os experimentos, com valores entre 40,0 e 58,0g/l.

No entanto, o aumento da aeração resultou em aumento da atividade da enzima XR nas linhagens *M. guilliermondii* UFMG02 e UFMG04, as quais aumentaram a atividade de XR de 1,93 e 3,90U.mg⁻¹ para 2,85 e 5,0U.mg⁻¹, respectivamente. Este efeito pode ser atribuído a um desbalanço redox resultante do aumento da aeração, que favorece a concentração de NADPH em detrimento da de NAD⁺, cofator utilizado pela xilitol desidrogenase (XDH). Em

estudo com *C. guilliermondii* FT120037, Branco (2010) observou que em ensaio com aeração inicial igual a 0,2vvm, a máxima atividade específica da enzima XR foi 0,230U.mg⁻¹, enquanto que aumentando a aeração para 1,2vvm, a atividade alcançou o valor de 1,5U.mg⁻¹.

Como observado para os outros ensaios, há variação da atividade entre os tempos e para cada levedura, o que pode estar relacionada com o perfil fisiológico da linhagem, que pode variar quanto aos períodos de máxima produção da enzima, e variação da atividade relacionada a maior ou menor produção de xilitol pelos isolados.

5.3.3 Efeito das concentrações de xilose e glicose no processo fermentativo

Os resultados dos ensaios de avaliação do efeito da concentração dos açúcares xilose e glicose de 45 e 20g/l para 75 e 27g/l, respectivamente, nos parâmetros fermentativos das leveduras em estudo estão apresentados na Tabela 7.

De forma geral a concentração inicial de açúcares no meio de cultivo influenciou de forma significativa todos os parâmetros fermentativos de produção de etanol. Nos ensaios para avaliação do efeito da concentração de xilose e glicose nos parâmetros fermentativos de produção de etanol, observou-se que o tempo para a produção máxima de etanol ficou entre 72h e 96h para todas as linhagens sendo verificado aumento desse tempo de 72h a 96h para *M. caribbica* UFMG07 e redução de 96 para 72h para *M. guilliermondii* UFMG10. Para todas as outras linhagens o tempo de produção máxima, aumentando-se a concentração dos açúcares permaneceu o mesmo.

O aumento nas concentrações de xilose e glicose de 45 e 20g/l para 75 e 27g/l (respectivamente) resultaram em aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de produção de etanol para todas as leveduras em estudo, exceto para *M. guilliermondii* UFMG04. Os valores de produção máxima de etanol nos cultivos com maiores concentrações de açúcares foram maiores para as leveduras *M. guilliermondii*. UFMG02, UFMG04, UFMG10 e UFMG12, os quais não diferiram estatisticamente, e corresponderam a valores próximos a 20 g/l.

Para o parâmetro eficiência de conversão de açúcares em etanol, foi observado efeito significativo da concentração de açúcares e da levedura em estudo. Observou-se que o aumento na concentração de açúcares não resultou em aumento significativo desse parâmetro para as linhas, sendo verificado diminuição desse parâmetro para *M. caribbica* UFMG07. O

maior valor verificado foi 1,45g/g para *M. guilliermondii* UFMG04 no cultivo com maiores concentrações de açúcares.

Para produtividade volumétrica foi verificado aumento significativo com o aumento da concentração de açúcares para as linhagens *M. guilliermondii* UFMG02, UFMG10 e *M. caribbica* UFMG08 ($p < 0,05$). Nos cultivos com maior concentração inicial de açúcares, os maiores valores de Q_p (g/l.h) foram estatisticamente iguais para todas as linhagens, exceto *M. guilliermondii* UFMG01, com médias próximas a 0,27 g/l.h.

De forma geral a concentração inicial de açúcares no meio de cultivo influenciou de forma significativa todos os parâmetros de produção de xilitol. O aumento das concentrações de açúcares resultou em diminuições nos parâmetros produção de xilitol. Para a produção máxima de xilitol, foi observada interação significativa entre a levedura em estudo e a concentração inicial de açúcares no meio de cultivo. Foi verificado que o aumento na concentração de açúcares levou a diminuição da produção para as leveduras *M. guilliermondii* UFMG01 e *M. caribbica* UFMG08. Nos ensaios com maiores concentrações, os maiores valores foram observados para *M. guilliermondii* UFMG12 (52.9g/l) e UFMG04 (51,73g/l), também estatisticamente similares ($p < 0,05$).

A eficiência de conversão de açúcares em xilitol variou significativamente entre as espécies e linhagens estudadas apenas durante cultivo com aeração igual a 5,0. O aumento na concentração de açúcares levou ao aumento significativo ($p < 0,05$) desse parâmetro para todas as linhagens de estudo, exceto para *M. guilliermondii* UFMG12. O maior valor observado foi 2,41g/g para *M. caribbica* UFMG08.

Para produtividade volumétrica em xilitol foi observado interação significativa entre a levedura em estudo e a concentração inicial de açúcares presente nos ensaios. Assim, o aumento na concentração dos açúcares resultou em diminuição significativa ($p < 0,05$) desse parâmetro para as linhagens de *M. guilliermondii* UFMG12 e *M. caribbica* UFMG08, sendo os valores observados para as demais linhagens não afetados pela alteração na concentração inicial dos açúcares. As maiores produtividades observadas foram 0,75g/l.h e 0,84g/l.h para *M. guilliermondii* UFMG12 e *M. caribbica* UFMG08, respectivamente. Os valores de produção variou significativamente entre as espécies e linhagens estudadas apenas em cultivo com menor concentração de xilose e glicose.

Para o crescimento celular, foi observado que o aumento da concentração de açúcares fez com que ele diminuísse ou se mantivesse estatisticamente igual ao observado para cultivo com menor densidade celular em função da levedura em estudo. O maior valor obtido foi 28g/l para *M. caribbica UFMG07*, quando cultivada em meio com menor concentração inicial de açúcares. Os valores de produção variou significativamente entre as espécies e linhagens estudadas apenas no cultivo em menor concentração de xilose e glicose. Não foi observada correlação entre o crescimento celular e a produção de xilitol (Pearson, $r=0,59$; $p=0,16$) e etanol (Pearson, $r= -0,31$; $p=0,45$). Foi observada correlação forte negativa (Pearson, $r= -0,84$; $p=0,017$) entre a produção de etanol e xilitol, indicando que quando há aumento de produção de etanol ocorre diminuição da produção de xilitol.

O consumo de açúcares totais também diminuiu com o aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo. Com menores concentrações foi observado o consumo de 80,7 a 97,5% enquanto para maiores concentrações de açúcares foi observado consumo de 67,6 a 75%. Foi observada correlação forte positiva (Pearson, $r=0,89$; $p=0,007$) entre produção de xilitol e consumo de açúcares totais, não sendo observada correlação para produção de etanol (Pearson, $r= -0,55$; $p=0,15$).

A concentração inicial de xilose influencia diretamente na produção de xilitol. Altas concentrações de xilose promovem o crescimento do micro-organismo cultivado e conseqüentemente levam a maior produção de xilitol. Porém, este aumento é observado dentro de uma faixa de concentração, a qual pode variar em função da espécie de levedura em estudo. Felipe e colaboradores (1997) cultivando *C. guilliermondii* FT20037 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana observou que o aumento da concentração de xilose de 37,5g/l para 54,5g/l resultou em um aumento de 40% do crescimento celular e 44% na produtividade volumétrica de xilitol. Porém, utilizando concentrações superiores a 74g/l de xilose ocorreu redução tanto do crescimento celular quanto da produtividade. Já DOMINGUEZ e colaboradores (1996) observaram um aumento na produção de xilitol por *Candida sp* 11.2 com o aumento da concentração de xilose, dentro da faixa de 30 a 50g/l, utilizando hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar. Concentrações acima de 50 g/l de xilose resultaram em reduções na produção de xilitol. Para *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426, concentrações muito altas, entre 217 e 279,24 g/l, resultaram em lenta assimilação de xilose, o que foi atribuído a alta pressão osmótica do meio (DOMINGUEZ et al., 1997). Da

mesma forma, concentrações de xilose acima de 150g/l resultaram em decréscimo na taxa de produção volumétrica de xilitol por *C. tropicalis* KFCC-10960 (OH e KIM, 1998).

A presença de glicose no meio também pode ser um fator limitante para a biconversão de xilose em xilitol. É observado que a glicose é utilizada preferencialmente como fonte de energia para o crescimento celular, comportamento evidenciado pelo seu consumo rápido nas primeiras horas da fermentação (LEE et al., 2003), como observado nas primeiras 24 nos cultivos contendo 45g/l de xilose e 20g/l de glicose. Altas concentrações de glicose podem reduzir o consumo de xilose e consequentemente a produção de xilitol por repressão catabólica, devido a inibição da síntese das enzimas chave envolvidas na bioconversão de xilose a xilitol, xilose redutase e xilitol desidrogenase, causando a diminuição de suas atividades (BICHO et al., 1998; YAHASHI et al., 1996; GIRIO et al., 2000). Este efeito foi observado para as linhagens UFMG01, UFMG04, UFMG10 e UFMG12 de *M. guilliermondii*, em cultivo com 45g/l de xilose, para as quais a produção de xilitol se deu somente após o consumo de glicose. Para cultivo com maior concentração de xilose e glicose foi observado que o consumo quase total de glicose ocorreu em 48h, coincidindo com o início de produção de xilitol para todas as linhagens em estudo.

Felipe e colaboradores (2003) e Silva (2004) sugerem que a relação glicose/xilose está diretamente relacionada à influência da glicose no processo de produção de xilitol. No estudo de Felipe e colaboradores (2003), foi observado que o cultivo de *C. guilliermondii* FT20037 em meio contendo concentração inicial de glicose correspondente a 10% da concentração de xilose, a produção de xilitol não é alterada. Silva (2004) observou para a mesma linhagem e mesmas condições que a glicose pode influenciar positivamente na produção de xilitol se estiver em proporção adequada em relação à xilose.

Tabela 7: Efeito da variação das concentrações de xilose e glicose nos parâmetros fermentativos das leveduras em estudo cultivadas em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba adicionado de suplementos.

Isolado	$E_{Máx}(g/l)$		$Yp/Setanol(g/g)$		$Q_{etanol}(g/l.h)$		Tempo (h)		Biomassa(g/l)	
	45/20	75/40	45/20	75/40	45/20	75/40	45/20	75/40	45/20	75/40
Concentração de xilose(g/l)/concentração de glicose (g/l)										
<i>M guilliermondii</i> UFMG01	14,70 ± 1,25 Bb	17,09 ± 2,94 Aa	0,45 ± 0,00 Aa	1,22 ± 0,71 BCa	0,15 ± 0,00 Ba	0,17 ± 0,03 Ba	96	96h	16,8 ± 0,8 Ca	12,92 ± 0,72 Ab
<i>M. guilliermondii</i> UFMG02	14,29 ± 0,75 Bb	19,43 ± 0,06 Aa	0,49 ± 0,01 Ab	0,73 ± 0,07 ABa	0,19 ± 0,01 ABb	0,26 ± 0,01 Aa	72	72h	13,44 ± 0,9 Ca	12,96 ± 0,83 Aa
<i>M guilliermondii</i> UFMG04	18,47 ± 2,29 Aa	19,48 ± 1,15 Aa	0,60 ± 0,05 Ab	1,45 ± 0,52 ACa	0,25 ± 0,01 Aa	0,27 ± 0,08 Aa	72	72h	17,36 ± 1,25 Ca	16,08 ± 3,81 Aa
<i>M caribbica</i> UFMG07	15,65 ± 1,78 ABb	18,23 ± 1,7 Aa	0,53 ± 0,03 Aa	0,37 ± 0,04 Ab	0,21 ± 0,02 ABa	0,18 ± 0,0B Aa	72	96h	28,00 ± 1,78 Aa	14,64 ± 2,40 Ab
<i>M caribbica</i> UFMG08	14,66 ± 0,85 Bb	18,2 ± 0,56 Aa	0,48 ± 0,01 Aa	0,83 ± 0,24 ABCa	0,20 ± 0,01 ABb	0,25 ± 0,01 Aa	72	72h	20,44 ± 1,35 Ba	15,40 ± 5,80 Aa
<i>M guilliermondii</i> UFMG10	14,37 ± 1,01 Bb	20,58 ± 1,1 Aa	0,47 ± 0,08 Aa	0,88 ± 0,36 ABCa	0,14 ± 0,02 Bb	0,28 ± 0,06 Aa	96	72h	25,76 ± 1,45 Aa	15,08 ± 1,65 Ab
<i>M guilliermondii</i> UFMG12	13,81 ± 0,65 Bb	20,67 ± 0,87 Aa	0,39 ± 0,07 Aa	0,3 ± 0,011 Aa	0,19 ± 0,02 ABa	0,28 ± 0,09 Aa	72	72h	21,56 ± 2,01 Ba	14,98 ± 0,42 Ab
Isolado	$X_{Máx}(g/l)$		$Yp/xilitol(g/g)$		$Q_{xilitol}(g/l.h)$		Temo (h)		Y(%)	
<i>M guilliermondii</i> UFMG01	57,43 ± 2,75 Aa	43,89 ± 6,74 Bb	0,66 ± 0,15 Ab	1,65 ± 0,49 Ba	0,59 ± 0,01 Ba	0,45 ± 0,08 Aa	96	96h	80,67 ± 2,15 Ba	70,00 ± 5,79 Ab
<i>M guilliermondii</i> UFMG02	53,98 ± 2,69 Aa	45,41 ± 3,22 Ba	0,40 ± 0,09 Ab	1,14 ± 0,36 Ca	0,56 ± 0,17 Ba	0,47 ± 0,01 Aa	96	96h	96,14 ± 3,17 Aa	67,61 ± 5,20 Ab
<i>M guilliermondii</i> UFMG04	58,35 ± 1,99 Aa	51,73 ± 4,52 Aa	0,46 ± 0,07 Ab	0,85 ± 0,18 Ca	0,60 ± 0,05 Ba	0,53 ± 0,07 Aa	96	96h	97,49 ± 2,02 Aa	74,30 ± 3,50 Ab
<i>M caribbica</i> UFMG07	47,64 ± 1,17 Ba	47,19 ± 1,59 Ba	0,57 ± 0,11 Ab	1,19 ± 0,18 Ba	0,49 ± 0,02 Ca	0,49 ± 0,02 Aa	96	96h	96,01 ± 1,08 Aa	73,26 ± 5,45 Ab
<i>M caribbica</i> UFMG08	54,04 ± 1,45 Aa	40,12 ± 1,27 Cb	0,89 ± 0,13 Ab	2,41 ± 0,37 Aa	0,75 ± 0,00 Aa	0,55 ± 0,1 Ab	72	72h	96,37 ± 0,98 Aa	75,36 ± 3,41 Ab
<i>M guilliermondii</i> UFMG10	40,84 ± 2,02 Ca	44,78 ± 1,62 Ba	0,35 ± 0,09 Ab	1,78 ± 0,07 Aa	0,42 ± 0,13 Ca	0,62 ± 0,02 Aa	96	72h	94,96 ± 1,35 Aa	71,28 ± 2,78 Ab
<i>M guilliermondii</i> UFMG12	54,99 ± 2,19 Aa	52,9 ± 0,03 Aa	0,68 ± 0,15 Aa	0,45 ± 0,04 Da	0,76 ± 0,08 Aa	0,55 ± 0,04 Ab	72	96h	97,22 ± 1,15 Aa	72,78 ± 1,61 Ab

$E_{Máx}$: concentração máxima de etanol (); $X_{Máx}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{Máx}$ (%): consumo máximo de açúcares totais; $Biomassa$ (g/l): concentração de células produzidas; Yp/s (g/g): fator de conversão de xilose em xilitol; Q_x (g/l.h): produtividade em xilitol; (-) não detectado. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna (comparação entre isolados) e minúsculas na mesma linha (comparação entre experimentos) não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

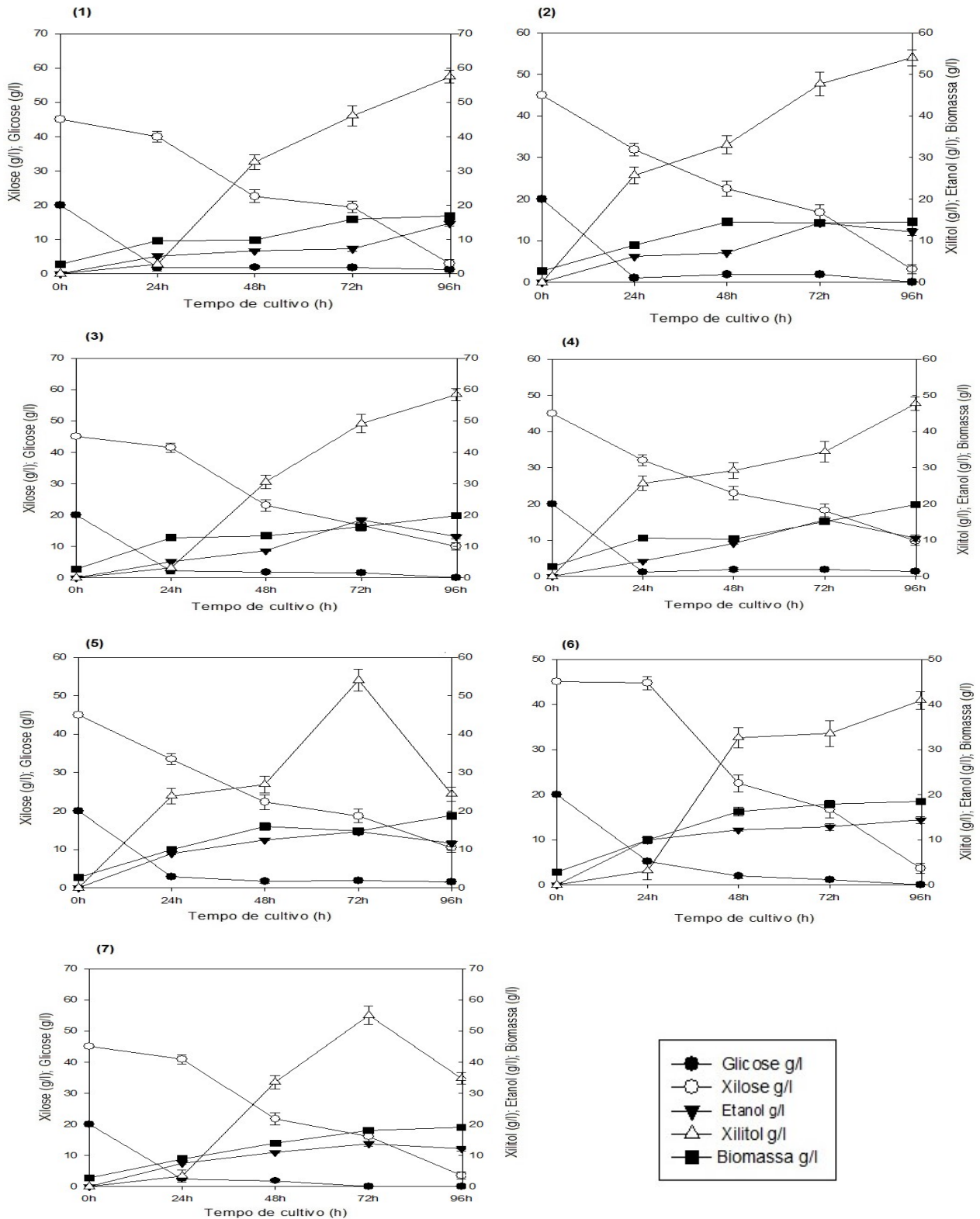


Figura 13: Perfil fermentativo das leveduras em estudo em meio a base de hidrolisado e suplementos, durante 96 horas de cultivo com 45g/l de xilose. (1) *M. guilliermondii* UFMG01; (2) *M. guilliermondii* UFMG02; (3) *M. guilliermondii* UFMG04; (4) *M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6) *M. guilliermondii* UFMG10; (7) *M. guilliermondii* UFMG12

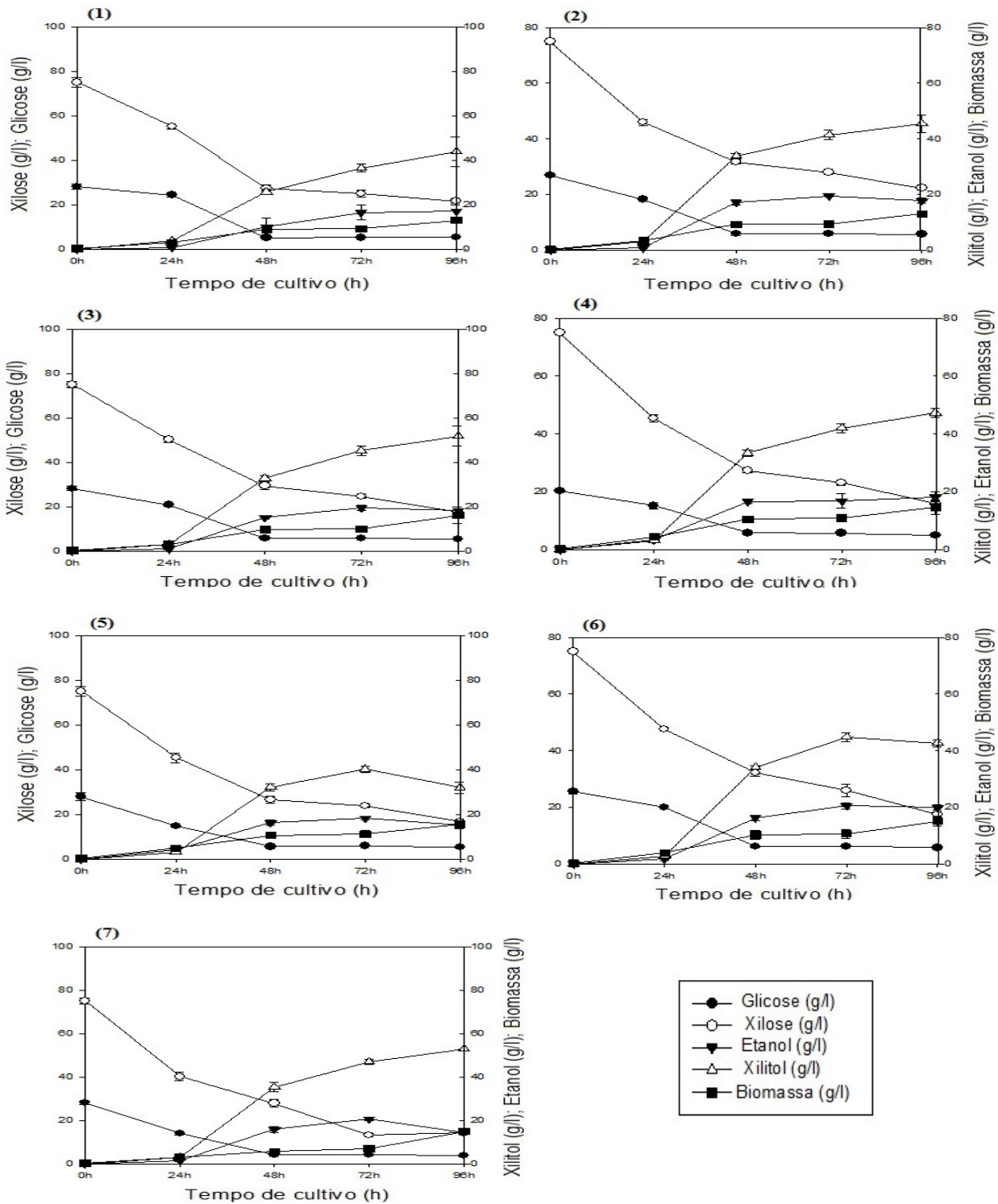


Figura 14: Perfil fermentativo das linhagens de levedura em meio a base de hidrolisado e suplementos, após 96 horas de cultivo com 75g/l de xilose (1) *M. guilliermondii* UFMG01; (2) *M. guilliermondii* UFMG02; (3) *M. guilliermondii* UFMG04; (4) *M. caribbica* UFMG07; (5) *M. caribbica* UFMG08; (6) *M. guilliermondii* UFMG10; (7) *M. guilliermondii* UFMG12

A atividade da enzima xilose redutase expressa pelas leveduras a partir do cultivo em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba suplementado, com diferentes concentrações de xilose (45 e 75g/l) e glicose (20 e 27g/l), foi avaliada até 96h. Os parâmetros estão representados nos gráficos 1 e 2, respectivamente (Figura 15).

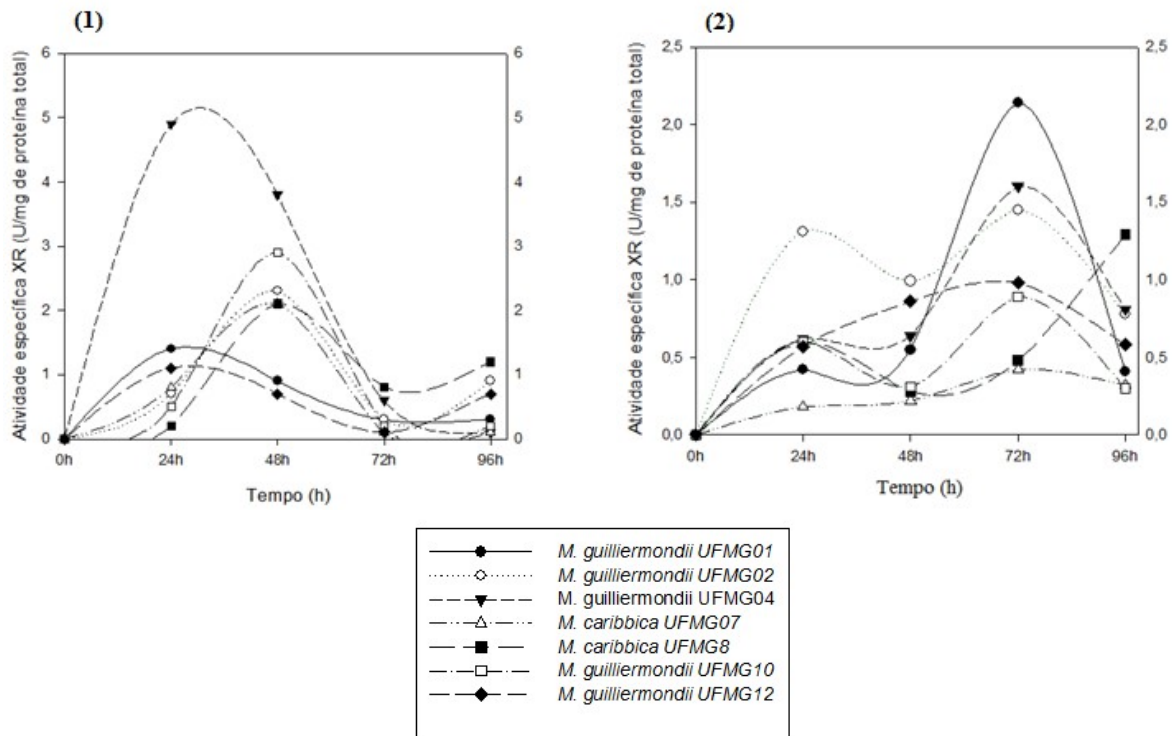


Figura 15: Perfil da atividade enzimática da XR expressa pelas linhagens de levedura em meio a base de hidrolisado e suplementos, com diferentes concentrações de xilose e glicose, após 96 horas de cultivo. (1) Ensaio com 45g/l de xilose; (2) Ensaio com 75g/l de xilose.

Conforme já discutido nos experimentos anteriores, a presença de glicose no meio de cultivo resultou em aumentos na produção da enzima XR. No entanto, de modo geral, o aumento da concentração inicial de açúcares no meio resultou em diminuição na atividade da enzima XR. No experimento com menor concentração de açúcares (Gráfico 1) é possível observar valores de atividade de XR em sua maioria entre 0,5 e 2,0U.mg⁻¹. Já no experimento com maiores concentrações de açúcares (Gráfico 2) foram observados valores de atividade enzimática em sua maioria entre 0,5 e 1,5U.mg⁻¹. Os valores de produção de xilitol para essas condições de cultivo foi estatisticamente semelhante em sua maioria (p<0,05), o qual está diretamente relacionado a produção da enzima XR, que também apresentou faixa de atividade semelhante entre os experimentos. Também, é possível observar que no experimento com menor concentração de açúcares a atividade máxima da XR é obtida em tempos menores dos que os

observados para o cultivo com maior concentração de xilose e glicose. Esse efeito também está diretamente relacionado a produção de xilitol que para o primeiro ocorre após 24h de cultivo e para o segundo após 48h de cultivo.

O panorama geral observado nos experimentos descritos nos itens 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3 baseados no cultivo das leveduras em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba sugere que os valores de produção máxima de xilitol pode variar em função da aeração, concentração de xilose e densidade celular do inóculo. Também foi observada que a produção de etanol pelas leveduras não influencia na produção de xilitol, visto que as leveduras não produzem etanol a partir de xilose e sim a partir de glicose. Foi possível perceber que as linhagens de levedura utilizaram as fontes de carbono tanto para o crescimento celular quanto como substrato para a produção de xilitol e etanol. Também foi observada a produção de xilitol em relação à concentração de xilose e glicose presente no meio de cultivo. Foi possível perceber que as maiores concentrações de xilitol obtidas foram nos processos em que se utilizou 45g/l de xilose e 20g/l de glicose. No experimento em que a concentração foi elevada para 75g/l de xilose e 27g/l de glicose, foi observada a manutenção da concentração de xilitol já obtida em experimentos com menor concentração de xilose e até mesmo uma diminuição da produção de xilitol, o que pode estar relacionado ao consumo máximo de açúcares pelas linhagens testadas. Nas condições avaliadas a concentração máxima de xilose consumida por essas leveduras é 50g/l. Em relação à glicose, observa-se que no cultivo em apenas xilose como fonte única de carbono houve menor crescimento celular e produção de xilitol, enquanto em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba, no qual há glicose, observa-se o aumento do crescimento celular e produção de xilitol e etanol.

Diante desses resultados, os isolados das espécies de leveduras que obtiveram melhores parâmetros fermentativos em hidrolisado, considerando principalmente a produção de xilitol foram *Meyerozyma caribbica* UFMG08 e *Meyerozyma guilliermondii* UFMG04. Diante de extensivos estudos já realizados com a espécie *M. guilliermondii* e a necessidade de estudos sobre a produção de xilitol por leveduras da espécie *M. caribbica*, a linhagem UFMG08 foi escolhida para o estudo da produção de xilitol a partir de otimização do processo fermentativo em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba, no qual foi realizado um estudo sobre a influência de cada um dos fatores, já citados, no processo fermentativo, mais especificamente na produção de xilitol por meio de um delineamento fatorial fracionado

5.4 Otimização da produção de xilitol a partir hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 e hidrolisado de biomassa de levedura de cervejaria

A partir dos resultados que demonstraram o potencial de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 para produção de xilitol a partir de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba e da necessidade em otimizar este processo, um delineamento fatorial fracionado (DFF) foi planejado como etapa inicial dessa otimização, seguido de um Delineamento Central Composto Rotacionado (DCCR). Ademais, foi realizada a avaliação de uma fonte alternativa de nitrogênio, o extrato de biomassa de leveduras de cervejaria, com vistas a diminuir o custo de produção de xilitol. O extrato de levedura de cervejaria foi utilizado tanto no DFF quanto no DCCR.

5.4.1.Obtenção de extrato de levedura de cervejaria

Foram obtidos 48,5g de extrato de levedura de cervejaria após a autólise de 300g de biomassa. A tabela 10 apresenta a composição centesimal do extrato obtido para proteína e nitrogênio totais. Para fins de comparação, a tabela também apresenta valores relatados na literatura para extrato de levedura de cervejaria, extrato de levedura de destilaria de álcool e extrato de levedura comercial. Para todos os experimentos foi considerado o método de Kjeldhal para obtenção de proteína e nitrogênio total. O extrato obtido pelo presente trabalho apresenta menor concentração de proteína total (28.87%) e conseqüentemente menor concentração de nitrogênio (4,62%), que os demais. Este fato pode estar relacionado ao método de obtenção do extrato de levedura, que apesar de ser bastante semelhante entre os extratos utilizados para comparação, possui alguns pontos divergentes, como número de lavagens na etapa de desamargamento e adição de enzimas no processo de autólise. Outro fator a ser considerado é que a biomassa da levedura pode variar na composição dependendo da qualidade do substrato na qual se encontrava e das condições de cultivo. Além do número de ciclos de produção que pode também alterar sua composição química, principalmente devido a sucessivas lavagens (HALASZ & LASZTIVY, 1991).

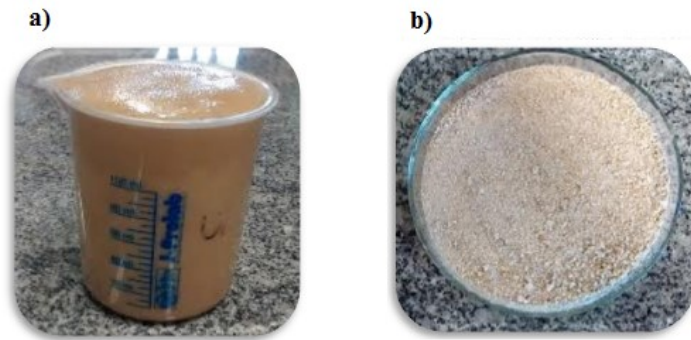


Figura 16: Resíduo de cervejaria 30% (p/v) (a); Extrato de levedura de cervejaria (b).

Tabela 8: Comparação da composição de diferentes extratos de levedura.

Amostra	Proteína total (%)	Nitrogênio total (%)	Referência
Extrato de levedura cervejaria	28,87 ± 0,28	4,62 ± 0,04	Este trabalho
Extrato de levedura cervejaria	44,64	7,29	Tangler & Erten, 2008
Extrato de levedura de cervejaria	50,62	8,1	Saksinchai et al., 2001
Extrato de levedura de destilaria de álcool	54,5	8,72	Yamada et al., 2003
Extrato de levedura comercial (Himedia)	65,62	10,5	Descrição do fabricante

Apesar do extrato obtido nesse trabalho possuir menor concentração de nitrogênio, os resultados da otimização da produção de xilitol por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 revelaram que ao ser utilizado como suplemento de meio de cultivo a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba, nas mesmas condições e mesma concentração, resultou no mesmo efeito da suplementação com ureia ou extrato de levedura comercial (item 5.4.2).

5.4.2 Delineamento fatorial fracionado

Os fatores utilizados basearam-se em estudos anteriores (Gonçalves, 2013, Ferreira et al., 2011; Silva et al., 2012; Chen et al. 2012) e nos experimentos prévios realizados com essa linhagem. A matriz do planejamento experimental com a combinação dos fatores e as respostas obtidas experimentalmente em cada uma dessas combinações podem ser visualizada

na Tabela 11. A análise dos efeitos dos fatores sobre as respostas permitiram a avaliação de quais deles influenciaram significativamente a produção de xilitol e a tomada de decisão com relação à escolha dos fatores a serem selecionados para o próximo passo da otimização.

As interpretações dos efeitos dos fatores sobre as respostas estão apresentadas nos gráficos de efeitos principais (Figuras 17, 19, 21, 23, 25 e 27) e nos gráficos de interações (Figuras 18, 20, 22, 24, 26 e 28), onde pode ser observado o comportamento do fator sobre a resposta e da interação dos fatores sobre a resposta, respectivamente.

As variáveis respostas relacionadas a produção de xilitol ($X_{m\acute{a}x}$: produção máxima de xilitol, $Y_{p/s}$: fator de conversão de açúcares em xilitol, Q_p : produtividade em xilitol, $XR_{m\acute{a}x}$: atividade máxima da enzima xilose redutase; Biomassa: crescimento celular em g/l) foram influenciadas significativamente pela aeração e pelas interações da concentração de xilose no hidrolisado com a fonte e a concentração da fonte de nitrogênio e pela interação da aeração com a fonte e a concentração da fonte de nitrogênio. Para as análises estatísticas as variáveis foram testadas em nível de confiança de 90% (ANOVA, $p < 0,1$).

A aeração se mostrou o fator mais significativo, influenciando tanto no crescimento celular, quanto na produção de xilitol, na eficiência de conversão de açúcares em xilitol e na produtividade volumétrica em xilitol (ANOVA, $p < 0,1$). O aumento da aeração de 1,0 para 2,5 resultou em aumento de até 153% no crescimento celular e na manutenção da produção de xilitol. Essa elevação na taxa de crescimento pode ser explicada por uma taxa maior de consumo de xilose que foi de 75% para 96% (valores médios). Já, o aumento da aeração de 2,5 para 5,0 resultou em aumento na produção de xilitol em até 670% (7,70g/l para 51,60g/l), mas não induziu um crescimento celular maior do que o observado quando a aeração era 2,5 (Figuras 17 e 21).

Com essa condição de aeração o consumo máximo médio de açúcar também foi reduzido de 96% ($V_{frasco}/V_{meio} = 2,5$) para 70% ($V_{frasco}/V_{meio} = 5$). O fornecimento de oxigênio é parâmetro chave para determinar se ocorrerá maior crescimento celular ou produção de xilitol. Para um processo eficiente, é necessário determinar a aeração que permitirá a utilização balanceada da fonte de carbono tanto para o crescimento celular quanto para a produção de xilitol (KUZMANOVA, 1998).

Também foi observado que a produtividade volumétrica em xilitol (Q_p) aumentou com o aumento da aeração. Com aeração 1, a produção máxima de xilitol em todas as unidades experimentais ocorreu após 96 horas de cultivo, enquanto com aeração 2 ocorreu em sua maioria em 72 horas de cultivo e com aeração 5, ocorreu em sua maioria com 48 horas de cultivo (Figura 25).

A concentração de xilose no hidrolisado e a fonte de nitrogênio não influenciaram de forma isolada nas respostas, apenas a interação desses teve influência significativa na atividade da enzima XR (Figura 19).

Para a produção máxima de xilitol foi possível observar que a fonte de nitrogênio em si não influencia na resposta, mas sim a sua concentração. O aumento de 0,0 para 10,0g/l da fonte de nitrogênio culminou em um aumento da produção de xilitol. Dessa forma, não houve diferença significativa nas respostas ao se utilizar extrato de levedura comercial e o extrato de levedura de cervejaria obtido no presente trabalho.

Tabela 9: Fatores e respostas do planejamento fatorial fracionado para otimização da fermentação de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.

Ensaio	Fatores				Respostas						
	Aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$)	Concentração do hidrolisado (xilose g/l)	Fonte de nitrogênio	Concentração da fonte de nitrogênio (g/l)	Biomassa (g/l)	Atividade XR (U/mg de proteína total)	$X_{\text{Máx}}$ (g/l)	$Y_{\text{P/S}}$ (g/g)	Q_{E} (g/l.h)	Y (%)	T(h)
1	1,0	20,0	ELCO	0,0	12,32	0,85	12,99	3,82	0,13	60,87	96h
2	1,0	20,0	Ureia	10,0	9,8	3,18	11,17	0,19	0,11	64,10	96h
3	1,0	20,0	ELCE	5,0	14,0	6,97	8,63	0,74	0,08	80,38	96h
4	1,0	40,0	ELCO	10,0	12,32	7,19	14,13	5,21	0,14	79,54	96h
5	1,0	40,0	Ureia	5,0	14,56	0,45	15,42	1,72	0,16	81,72	96h
6	1,0	40,0	ELCE	0,0	10,92	2,21	8,07	0,22	0,08	79,28	96h
7	1,0	60,0	ELCO	5,0	12,88	4,25	12,01	2,57	0,12	76,46	96h
8	1,0	60,0	Ureia	0,0	10,36	0,75	10,95	1,19	0,11	74,03	96h
9	1,0	60,0	ELCE	10,0	15,4	0,71	7,91	2,61	0,08	80,46	96h

ELCE: Extrato de levedura de cervejaria; *ELCO*: Extrato de levedura comercial; $X_{\text{Máx}}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{\text{Máx}}(\%)$: consumo máximo de açúcares totais; *Biomassa (g/l)*: concentração de células produzidas; $Y_{\text{P/S}} (g/g)$: fator de conversão de xilose em xilitol; $Q_{\text{P}} (g/l.h)$: produtividade em xilitol; T(h). tempo requerido para a produção máxima de xilitol, rever os gráficos para que o tempo seja definido da forma correta

Tabela 9: Continuação

Ensaio	Fatores				Respostas						
	Aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$)	Concentração do hidrolisado (xilose g/l)	Fonte de nitrogênio	Concentração da fonte de nitrogênio (g/l)	Biomassa (g/l)	Atividade XR (U/mg de proteína total)	$X_{\text{Máx}}$ (g/l)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_E (g/l.h)	Y (%)	T (h)
10	2,5	20,0	ELCO	10,0	34,44	0,55	9,15	1,93	0,35	96,69	72h
11	2,5	20,0	Ureia	5,0	31,64	0,72	11,50	2,07	0,15	98,20	72h
12	2,5	20,0	ELCE	0,0	31,64	0,35	12,13	1,27	0,16	96,16	72h
13	2,5	40,0	ELCO	5,0	28,8	10,27	9,94	1,00	0,13	97,53	72h
14	2,5	40,0	Ureia	0,0	28,8	2,67	10,79	0,59	0,14	95,87	72h
15	2,5	40,0	ELCE	10,0	31,64	0,41	7,70	0,41	0,16	92,94	48h
16	2,5	60,0	ELCO	0,0	28,84	13,82	9,28	0,19	0,12	96,0	72h
17	2,5	60,0	Ureia	10,0	31,64	18,31	10,33	0,35	0,14	96,15	72h
18	2,5	60,0	ELCE	5,0	28,84	0,67	11,78	0,72	0,16	96,52	72h

ELCE: Extrato de levedura de cervejaria; ELCO: Extrato de levedura comercial; $X_{\text{Máx}}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{\text{Máx}}(\%)$: consumo máximo de açúcares totais; Biomassa (g/l): concentração de células produzidas; $Y_{P/S}$ (g/g): fator de conversão de xilose em xilitol; Q_p (g/l.h): produtividade em xilitol; T(h). tempo requerido para a produção máxima de xilitol.

Tabela 9: Continuação

Ensaio	Fatores				Respostas						
	Aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$)	Concentração do hidrolisado (xilose g/l)	Fonte de nitrogênio	Concentração da fonte de nitrogênio (g/l)	Biomassa (g/l)	Atividade XR (U/mg de proteína total)	X (g/l)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_E (g/l.h)	Y (%)	T_f (h)
19	5,0	20,0	ELCO	5,0	34,44	0,72	27,46	0,71	0,57	68,37	48h
20	5,0	20,0	Ureia	0,0	34,44	2,53	36,97	0,78	0,77	60,07	48h
21	5,0	20,0	ELCE	10,0	22,68	0,79	45,41	1,55	0,47	89,70	96h
22	5,0	40,0	ELCO	0,0	26,04	1,53	51,60	0,62	0,53	72,57	96h
23	5,0	40,0	Ureia	10,0	26,04	0,93	41,52	0,79	0,86	64,03	48h
24	5,0	40,0	ELCE	5,0	28,84	2,12	45,13	0,86	0,94	71,46	48h
25	5,0	60,0	ELCO	10,0	20,72	0,48	48,89	0,18	0,50	75,46	96h
26	5,0	60,0	Ureia	5,0	21,0	0,85	43,98	0,94	0,91	62,18	48h
27	5,0	60,0	ELCE	0,0	22,68	1,28	46,67	0,46	0,64	63,44	72h

ELCE: Extrato de levedura de cervejaria; ELCO: Extrato de levedura comercial; $X_{M\acute{a}x}$: concentração máxima de xilitol; $Y_{M\acute{a}x}(\%)$: consumo máximo de açúcares totais; Biomassa (g/l): concentração de células produzidas; $Y_{p/s}$ (g/g): fator de conversão de xilose em xilitol; Q_p (g/l.h): produtividade em xilitol;

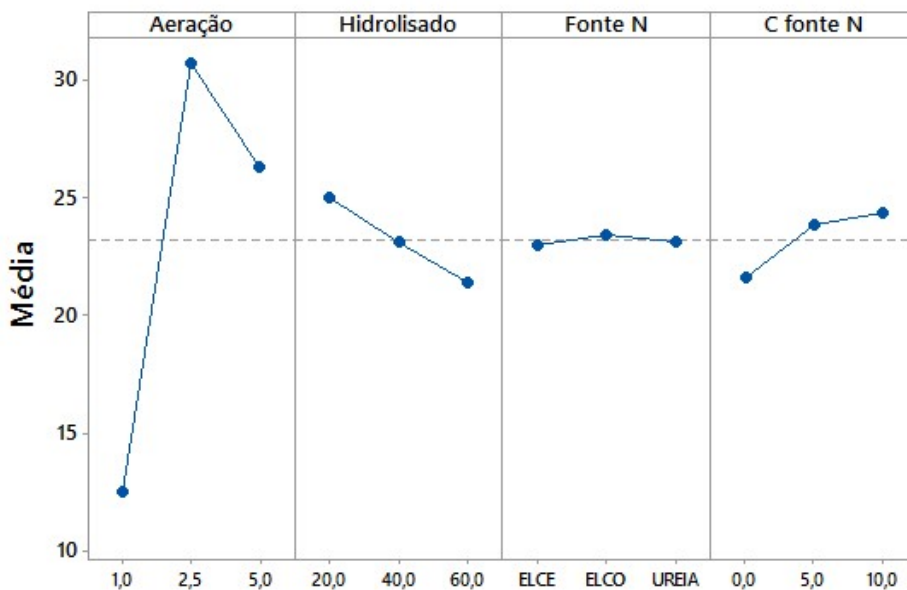


Figura 17: Gráfico de efeito principal. Influência dos fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) no crescimento celular (g/l) no tempo máximo de 96h. *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

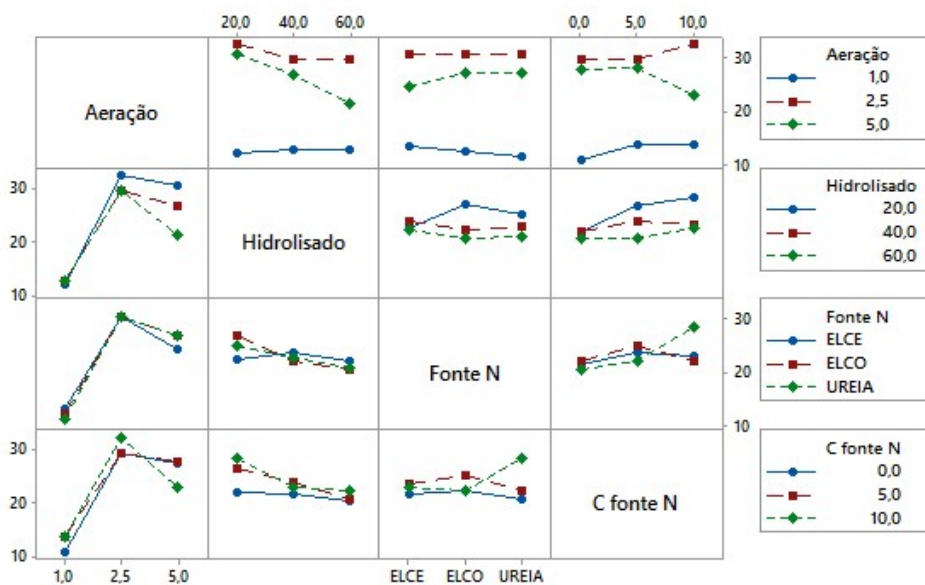


Figura 18: Gráfico de interação. Influência da interação dupla entre os fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) no crescimento celular (g/l) no tempo máximo de 96h. *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

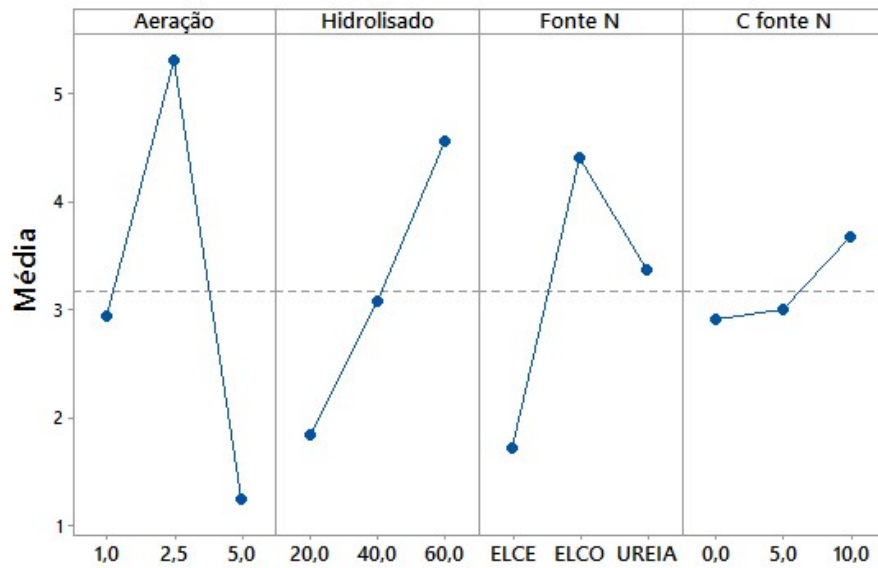


Figura 19: Gráfico de efeito principal. Influência dos fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na atividade específica máxima da xilose redutase. *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

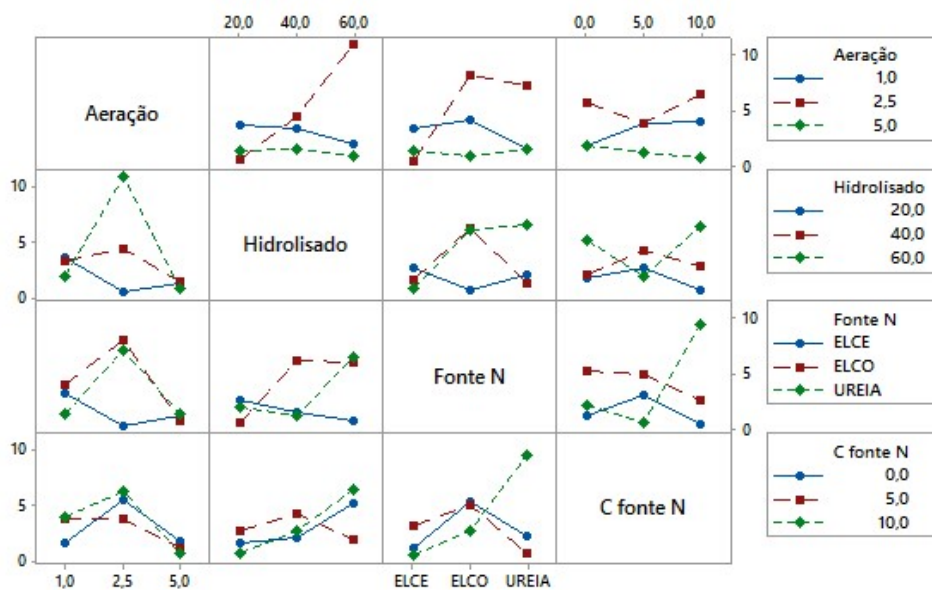


Figura 20: Gráfico de interação. Influência da interação dupla entre os fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) no crescimento celular (g/l) no tempo máximo de 96h. *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

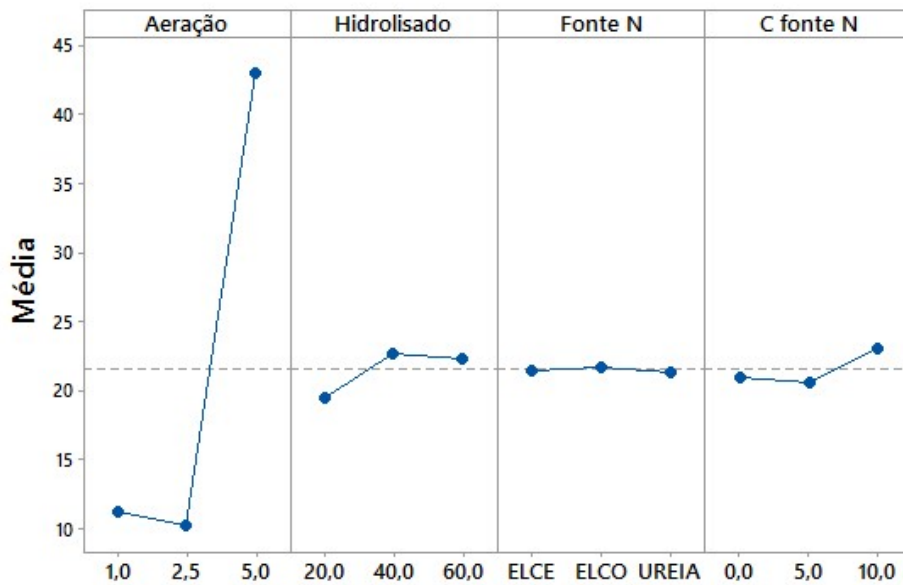


Figura 21: Gráfico de efeito principal. Influência dos fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na produção máxima de xilitol. *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

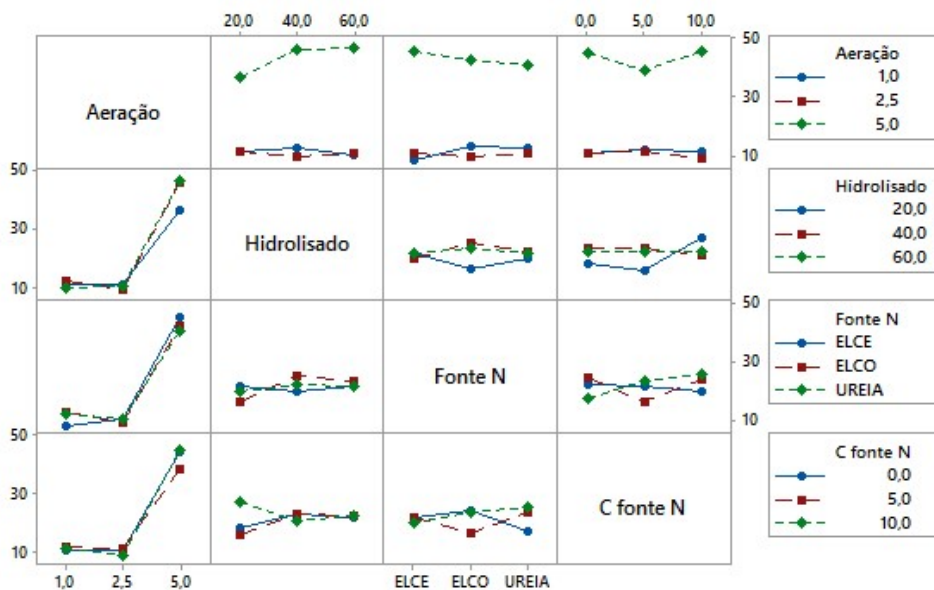


Figura 22: Gráfico de interação. Influência da interação dupla entre os fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na produção máxima de xilitol. *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

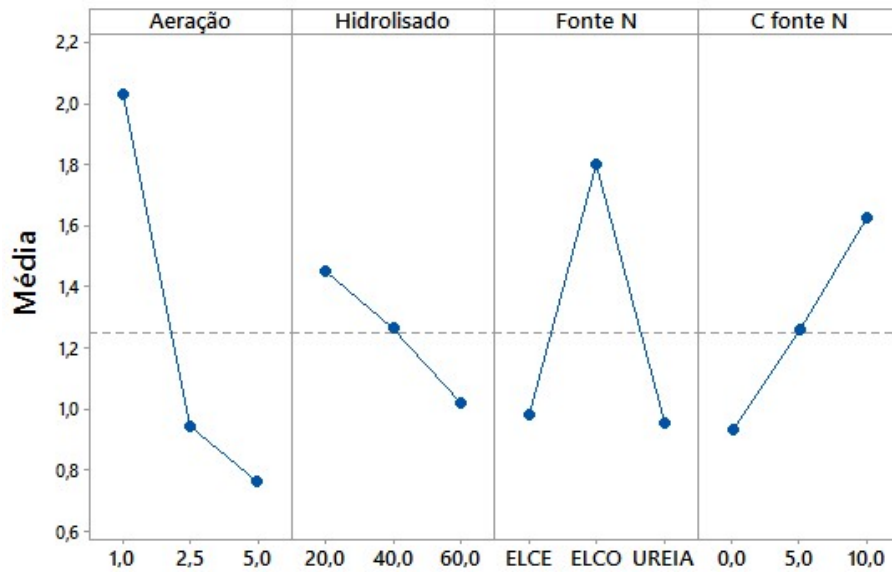


Figura 23: Gráfico de efeito principal. Influência dos fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na eficiência de conversão de açúcares em xilitol (Yp/s). *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

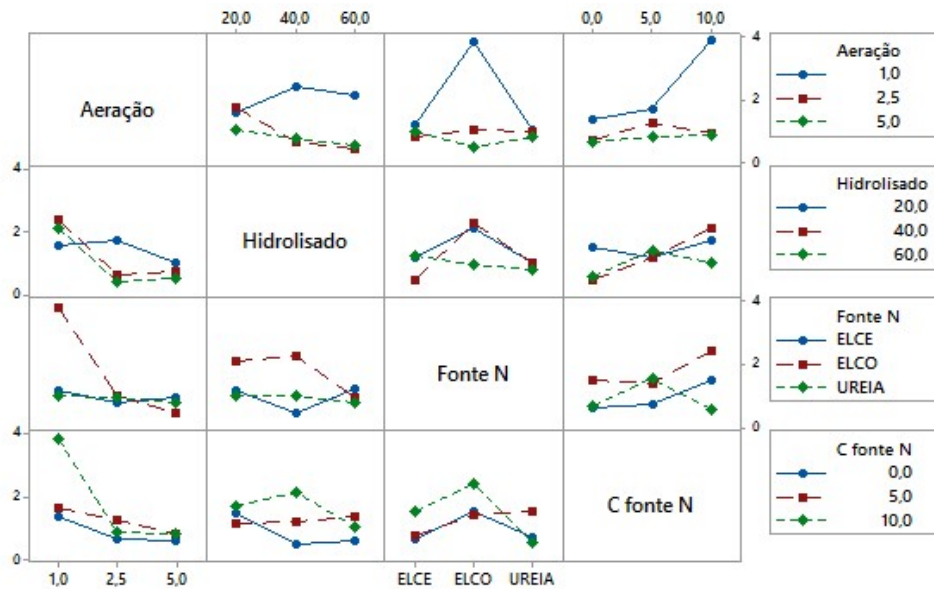


Figura 24: Gráfico de interação. Influência da interação dupla entre os fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na eficiência de conversão de açúcares em xilitol (Yp/s). *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

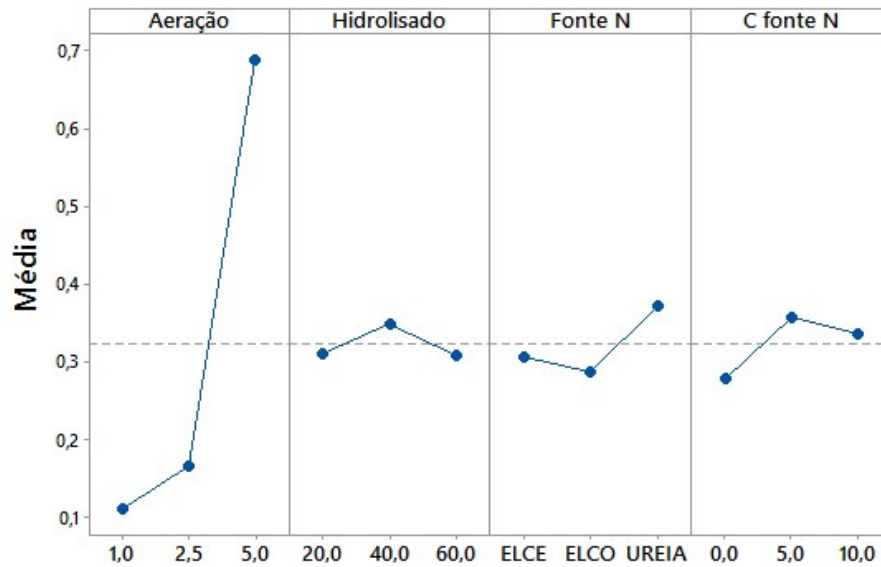


Figura 25: Gráfico de efeito principal. Influência dos fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na produtividade volumétrica máxima em xilitol (Qp). *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

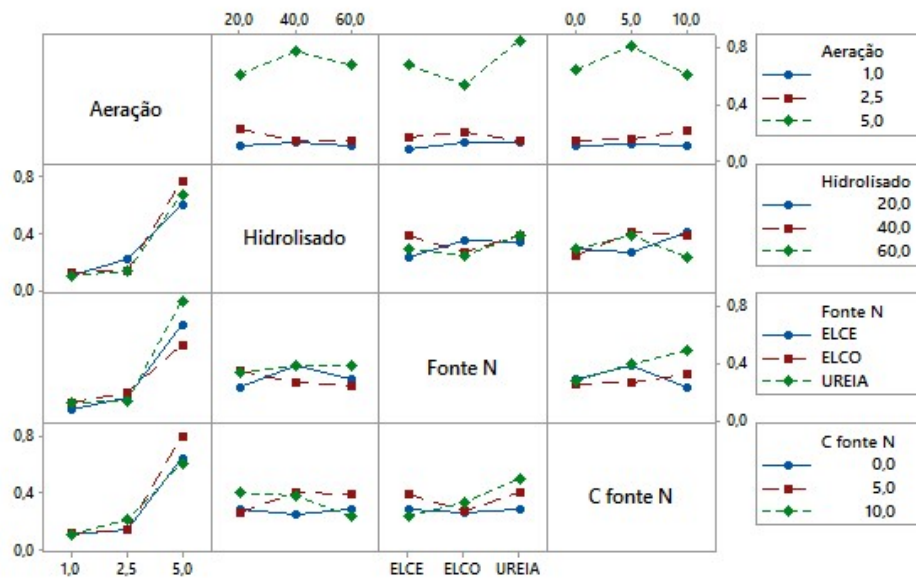


Figura 26: Gráfico de interação. Influência da interação dupla entre os fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) na produtividade volumétrica máxima em xilitol (Yqp). *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

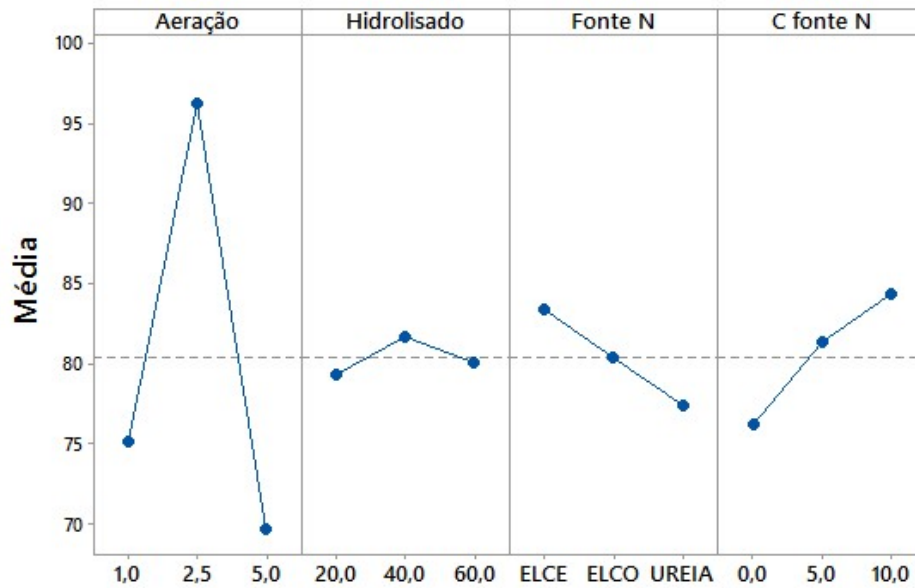


Figura 27: Gráfico de efeito principal. Influência dos fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) no consumo máximo de açúcares (Y%). *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

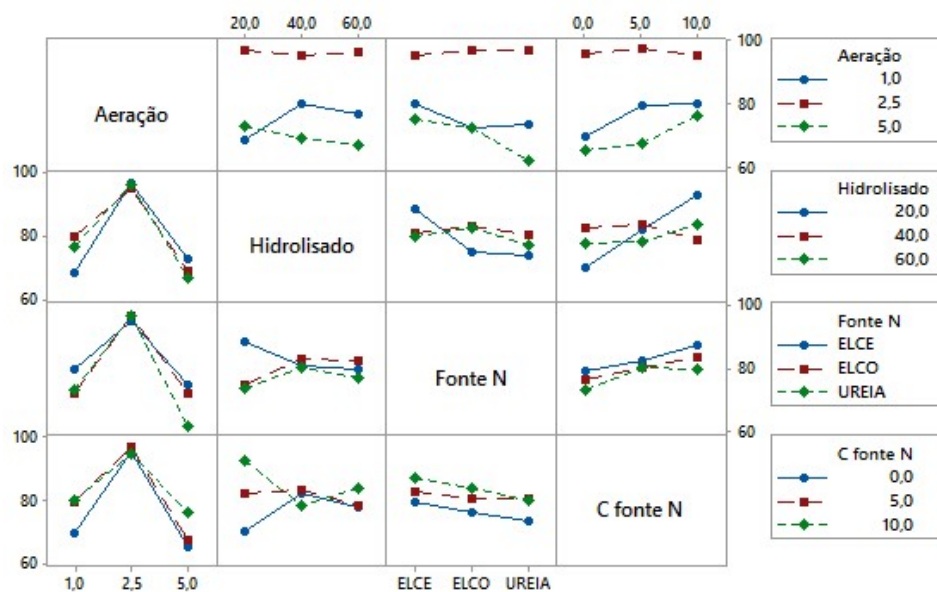


Figura 28: Gráfico de interação. Influência da interação dupla entre os fatores (aeração, concentração de xilose no hidrolisado, fonte de nitrogênio e concentração da fonte de nitrogênio) no consumo máximo de açúcares (Y%). *ELCE (Extrato de levedura de cervejaria; ELCO (Extrato de levedura comercial).

Os resultados obtidos a partir do delineamento fatorial fracionado permitiram direcionar o planejamento experimental da segunda fase de otimização por meio de um delineamento central composto rotacionado (DCCR). A estratégia a ser utilizada:

1. Deslocar ascendentemente a concentração mínima de aeração;
2. Deslocar ascendentemente a concentração mínima de xilose no hidrolisado;
3. Deslocar ascendentemente a concentração máxima de extrato de levedura;
4. Escolher uma das fontes de nitrogênio;

5.4.3 Delineamento Composto Central Rotacionado

O DCCR foi proposto com o objetivo de se delinear a região ótima de produção de xilitol e construir modelos preditivos capazes de estimar as variáveis resposta de interesse. As tabelas apresentam a matriz de planejamento experimental com as combinações dos fatores avaliados e as variáveis resposta obtidas e estimadas pelos modelos ajustados no DCCR. A figura 24 mostra o perfil fermentativo de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em cada uma das condições avaliadas, após 96 horas de cultivo. Os valores máximos de produção obtidos foram selecionados para o ajuste dos modelos matemáticos de segunda ordem que descrevem a produção máxima de xilitol ($X_{m\acute{a}x}$), a eficiência de conversão de açúcares em xilitol ($Y_{p/s}$), a produtividade em xilitol (Q_p), o consumo máximo de açúcares totais ($Y_{\%}$) e a atividade máxima da enzima xilose redutase (XR) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba. A tabela mostra os modelos ajustados, ou seja, apresentando os valores reais de cada fator avaliado na condição descrita. Esses modelos podem ser utilizados para predição de valores máximos de resposta e são submetidos à validação.

Tabela 10: Fatores e respostas do DCCR, com seis repetições no ponto central relacionadas à produção de xilitol por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.

Ensaio	Fatores			Respostas						
	D-xilose (g/l)	Aeração (vfrasco/vmeio)	Extrato de levedura (g/l)	$X_{máx}$ (g/l)	$X_{máx}$ ajustada (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ ajustado (g/g)	Q_p (g/l.h)	Q_p ajustado (g/l.h)	Tempo (h)
1	34,0	3,0	12,0	60,75	51,62	0,68	0,53	0,63	0,47	96
2	34,0	4,5	12,0	48,71	47,06	0,48	0,42	0,68	0,55	72
3	46,0	3,0	12,0	50,32	50,27	0,54	0,51	0,56	0,54	96
4	46,0	4,5	12,0	56,05	53,24	0,53	0,50	0,58	0,52	96
5	34,0	3,0	17,0	46,80	39,03	0,49	0,32	0,49	0,35	96
6	34,0	4,5	17,0	53,90	54,99	0,59	0,65	0,56	0,56	96
7	46,0	3,0	17,0	39,94	44,61	0,35	0,40	0,42	0,49	96
8	46,0	4,5	17,0	21,32	36,07	0,22	0,40	0,22	0,36	96
9	40,0	2,5	15,0	56,80	55,91	0,55	0,56	0,59	0,59	96
10	40,0	5,0	15,0	48,90	57,54	0,61	0,68	0,51	0,64	96

X: produção de xilitol em g/l; $Y_{p/s}$: fator de conversão biomassa em xilitol em g/g; Q_p : produtividade em xilitol em g/l.h; Tempo: tempo de cultivo no qual X foi máxima.

Tabela 10: Continuação

Ensaio	Fatores			Respostas						
	D-xilose (g/l)	Aeração (vfrasco/vmeio)	Extrato de levedura (g/l)	$X_{máx}$ (g/l)	$X_{máx}$ ajustada (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ ajustado (g/g)	Q_p (g/l.h)	Q_p ajustado (g/l.h)	Tempo (h)
11	30,0	3,75	15,0	61,04	51,43	0,71	0,64	0,63	0,55	96
12	50,0	3,75	15,0	56,56	53,24	0,56	0,50	0,59	0,51	96
13	40,0	3,75	10,0	55,40	59,78	0,52	0,60	0,58	0,61	96
14	40,0	3,75	20,0	48,60	53,24	0,37	0,50	0,51	0,51	96
15	40,0	3,75	15,0	61,13	63,74	0,76	0,59	0,64	0,60	96
16	40,0	3,75	15,0	58,63	53,24	0,65	0,50	0,64	0,52	96
17	40,0	3,75	15,0	50,68	53,24	0,58	0,50	0,61	0,52	96
18	40,0	3,75	15,0	51,45	53,24	0,59	0,50	0,53	0,52	96
19	40,0	3,75	15,0	49,36	53,24	0,46	0,50	0,51	0,52	96
20	40,0	3,75	15,0	45,32	53,24	0,45	0,50	0,47	0,52	96

X: produção de xilitol em g/l; $Y_{p/s}$: fator de conversão biomassa em xilitol em g/g; Q_p : produtividade em xilitol em g/l.h; Tempo: tempo de cultivo no qual X foi máxima.

Tabela 11: Modelos preditivos que descrevem a produção de xilitol (X), os fatores de conversão biomassa em xilitol ($Y_{x/B}$), a produtividade em xilitol (Q_x), o consumo de açúcares ($Y\%$) e a atividade da enzima xilose redutase (XR) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.

Respostas	Modelos preditivos	R^2
$X_{máx}$	$-12 + 65,6X_1 + 0,55X_2^* - 7,0X_3 - 10,04 X_1^2 - 0,0094 X_2^2 + 0,341X_3^2 + 0,245X_1 X_2 - 0,08X_1 X_3 - 0,082X_2 X_3$	72,50%
$Y_{p/s}$	$3,59 + 0,461 X_1 - 0,100X_2 + 0,226X_3^* + 0,00046 X_1^{2*} + 0,00562X_2^2 + 0,00218X_3^2 + 0,0076X_1 X_2 - 0,0028X_1 X_3^* + 0,00148 X_2 X_3$	87,87%
Q_p	$2,22 + 0,639 X_1 - 0,108 X_2 - 0,090 - 0,01046X_1^2 + 0,00076X_2^2 + 0,00366X_3^2 + 0,0085X_1 X_2 - 0,0124X_1 X_3 + 0,0071X_2 X_3$	35,58%
$Y\%$	$-31 + 36,5X_1 - 1,05 X_2 + 10,3X_3 + 0,0241 X_1^2 + 0,071X_2^2 - 0,421 X_3^2 + 0,32 X_1 X_2 - 1,63 X_1 X_3 - 0,176 X_2 X_3$	36,16%
XR	$11,2 - 0,52 X_1 - 0,353 X_2 + 0,204X_3 + 0,014X_1^{2*} + 0,00178X_2^{2*} + 0,0107 X_3^2 + 0,0011 X_1 X_2 + 0,0147 X_1 X_3 + 0,0112X_2 X_3$	66,21%

X_1 : Aeração, em v/v;

X_2 : Concentração de xilose, em g/l;

X_3 : Concentração de extrato de levedura, em g/l;

* $p < 0,1$

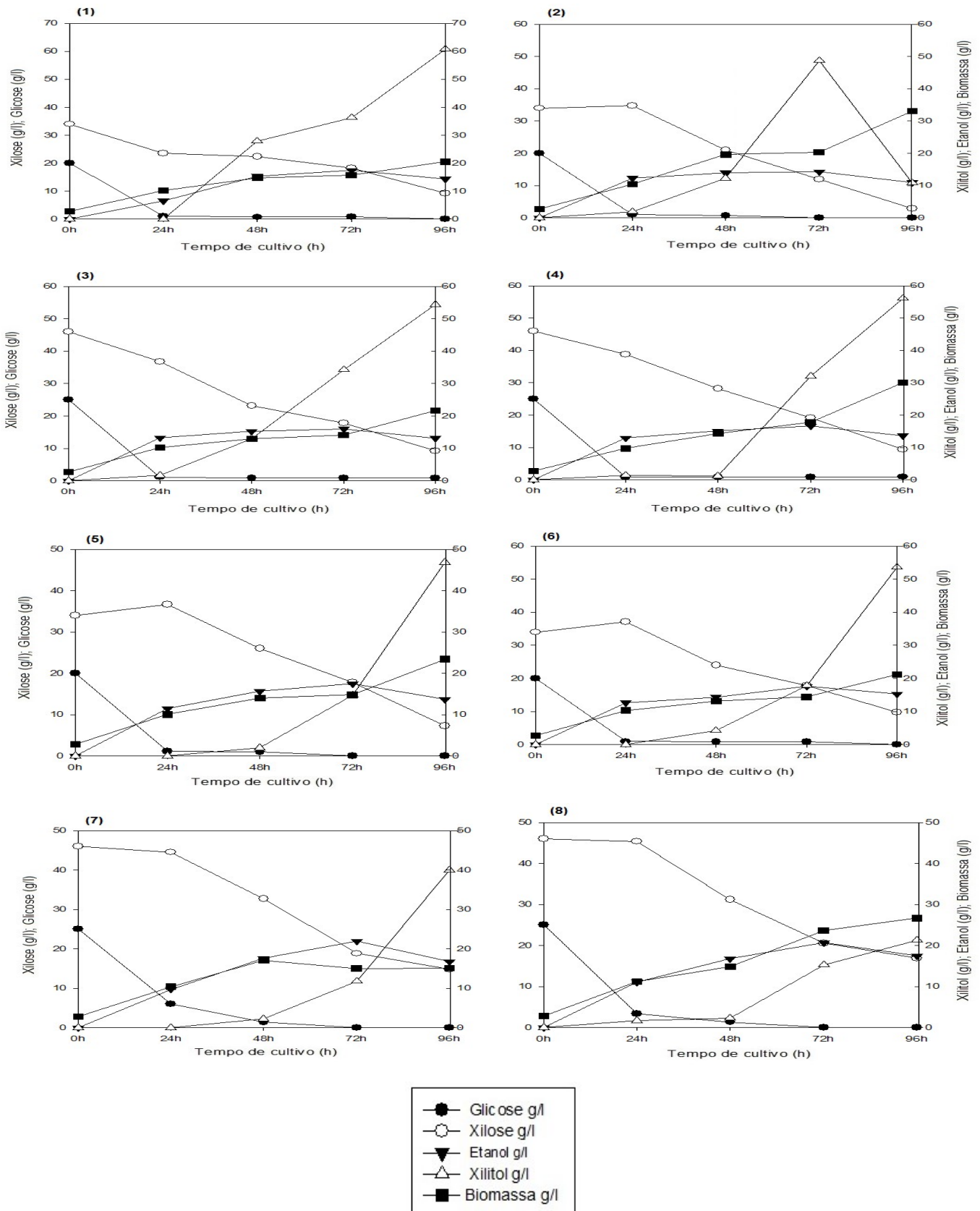


Figura 29: Perfil da fermentação de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em cada uma das condições avaliadas, em meio a base de hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba no DCCR, após 96 horas de cultivo (continua).

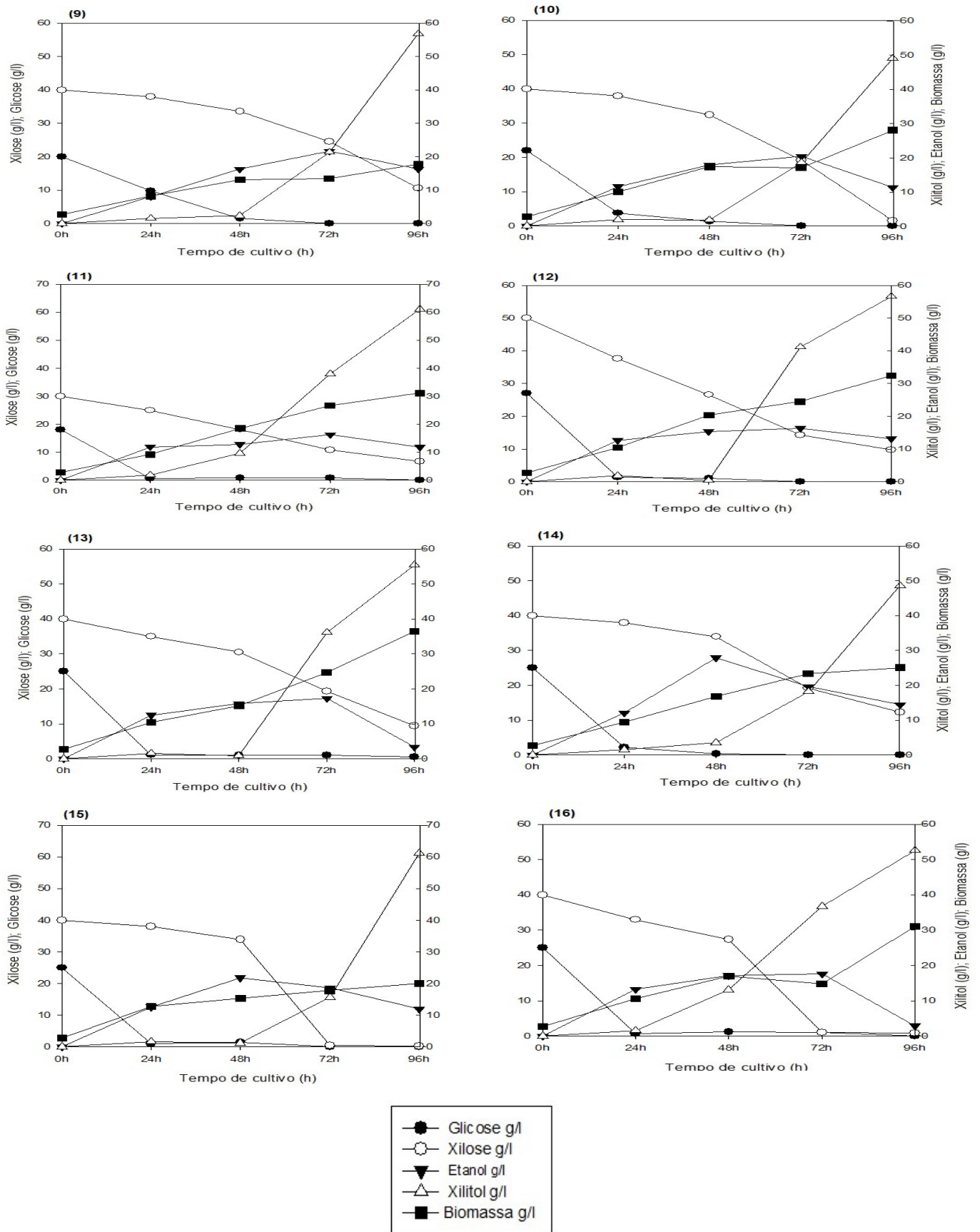


Figura 29: Continuação.

No modelo ajustado para a produção máxima de xilitol ($X_{m\acute{a}x}$) foi observado que a concentração de xilose do hidrolisado apresenta efeito significativo ($p < 0,1$). Para a eficiência de conversão de açúcares em xilitol ($Y_{p/s}$) foi observado efeito significativo da fonte de nitrogênio, efeito quadrático de xilose e interação entre xilose e fonte de nitrogênio ($p < 0,1$). Para atividade máxima da enzima xilose redutase (XR) foi observado efeito significativo quadrático da aeração e da concentração de xilose ($p < 0,1$). Já, para o crescimento celular foi verificado efeito linear da aeração ($p < 0,1$). Para as respostas consumo de açúcares totais ($Y\%$) e produtividade em xilitol (Q_p) não foi verificada influência significativa de nenhum dos fatores, como também falta de ajuste dos modelos que não foram capazes de explicar os padrões dessas respostas.

A influência dos fatores sobre os modelos pode ser visualizada pelos modelos preditivos (Tabela 11) e pelos gráficos de superfície de resposta (Figuras 30 a 35). Quando se observa que os coeficientes dos termos lineares são positivos e os coeficientes dos termos quadráticos são negativos há um forte indício de que se tenha alcançado a região ótima que é representada por um gráfico com formato de cume de um monte (NETO et al., 2010).

A região na qual a produção de xilitol ajustada é máxima (61,13g/l), a eficiência de conversão de açúcares em xilitol é máxima (0,71g/g) e a produtividade em xilitol também é máxima (0,63g/l.h) pôde ser alcançada quando se utilizou 42,66g/l de xilose, aeração 3,52 e 12,42g/l de fonte de nitrogênio (Figuras 36 a 38). Nessas condições, a desejabilidade é igual a 1,0 descrevendo uma resposta excelente (Akhanarazova & Kafarof, 1982).

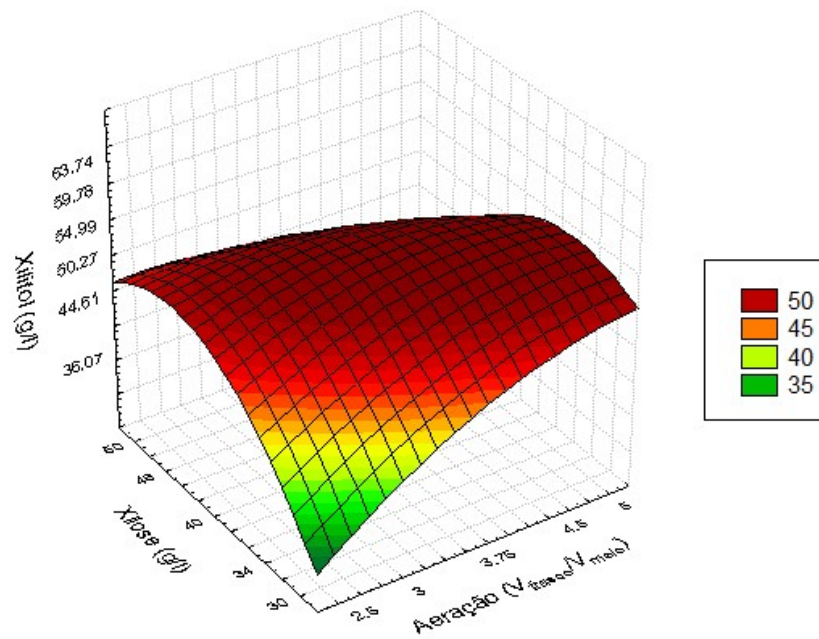


Figura 30: Gráfico de superfície de resposta da aeração (v/v) e concentração de xilose (g/l) sobre a produção máxima de xilitol ($X_{máx}$) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

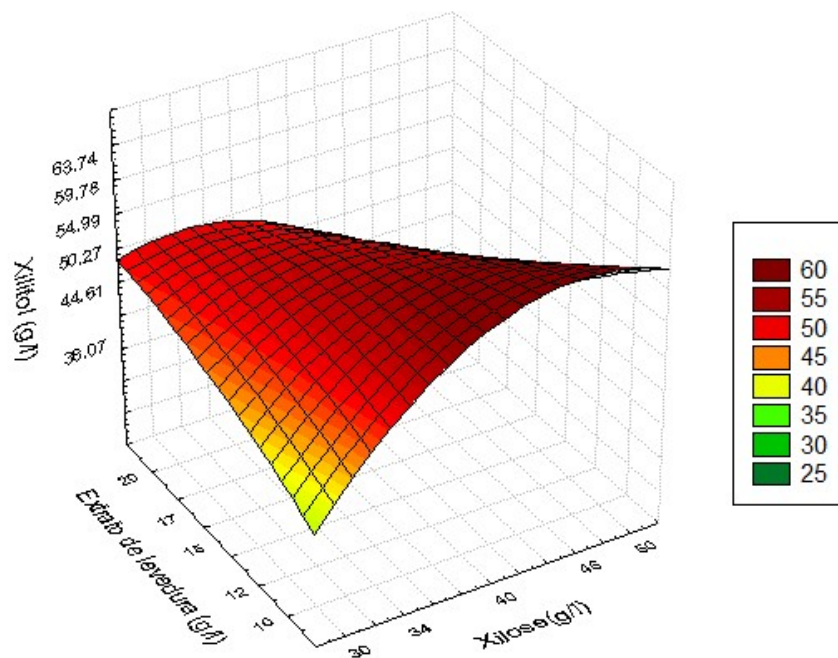


Figura 31: Gráfico de superfície da concentração da fonte de nitrogênio (g/l) e concentração de xilose (g/l) sobre a produção máxima de xilitol ($X_{máx}$) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

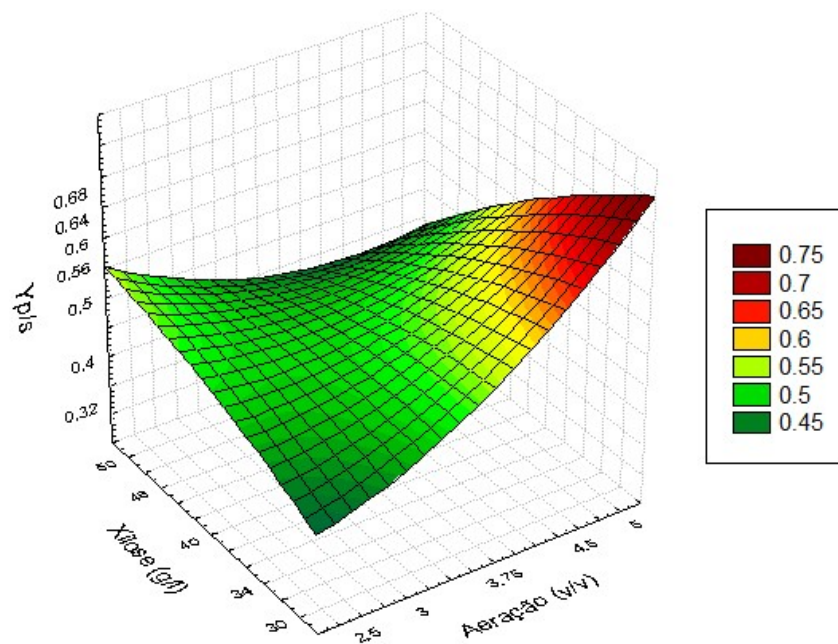


Figura 32: Gráfico de superfície de resposta da aeração (v/v) e concentração de xilose (g/l) sobre a conversão máxima de açúcares em xilitol ($Y_{p/s}$) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

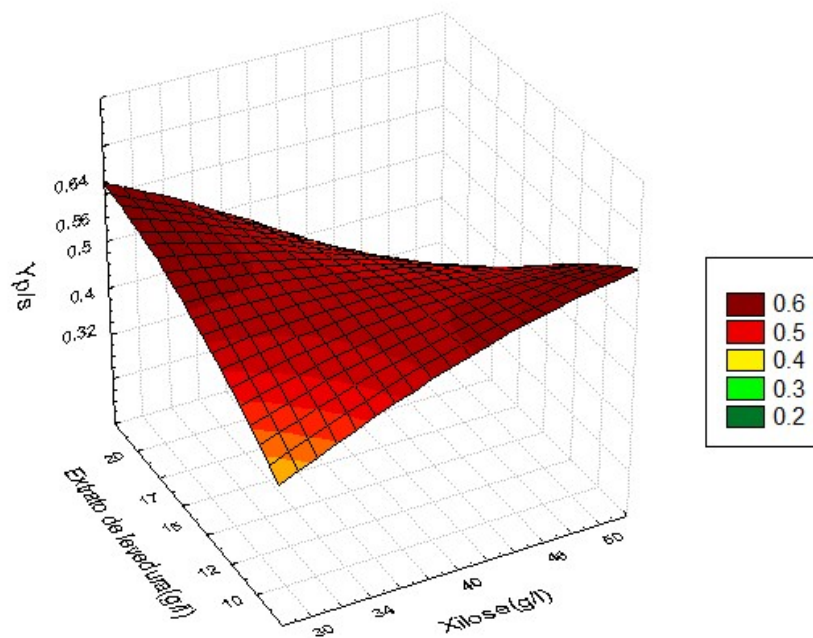


Figura 33: Gráfico de superfície de resposta da concentração da fonte de nitrogênio (g/l) e concentração de xilose (g/l) sobre a conversão máxima de açúcares em xilitol ($Y_{p/s}$) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

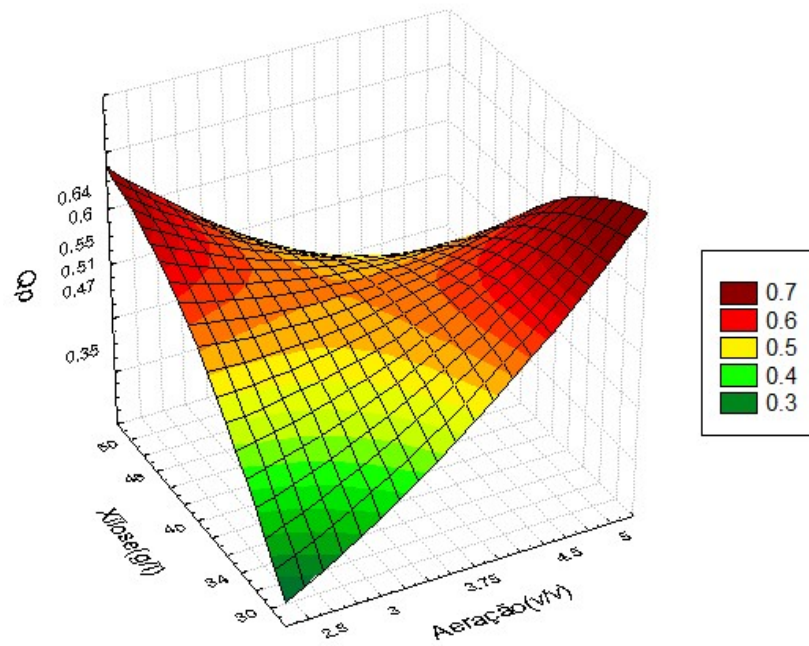


Figura 34: Gráfico de superfície de resposta da aeração (v/v) e concentração de xilose (g/l) sobre a produtividade máxima em xilitol (Q_p) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

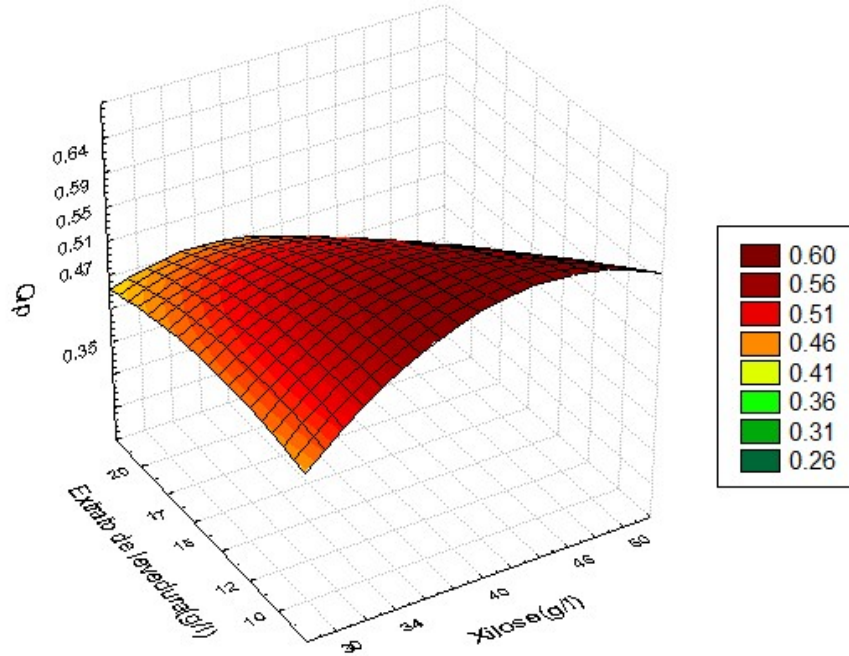


Figura 35: Gráfico de superfície de resposta da concentração da fonte de nitrogênio (g/l) e concentração de xilose (g/l) sobre a produtividade máxima em xilitol (Q_p) por *Meyerozyma caribbica* UFMG08.

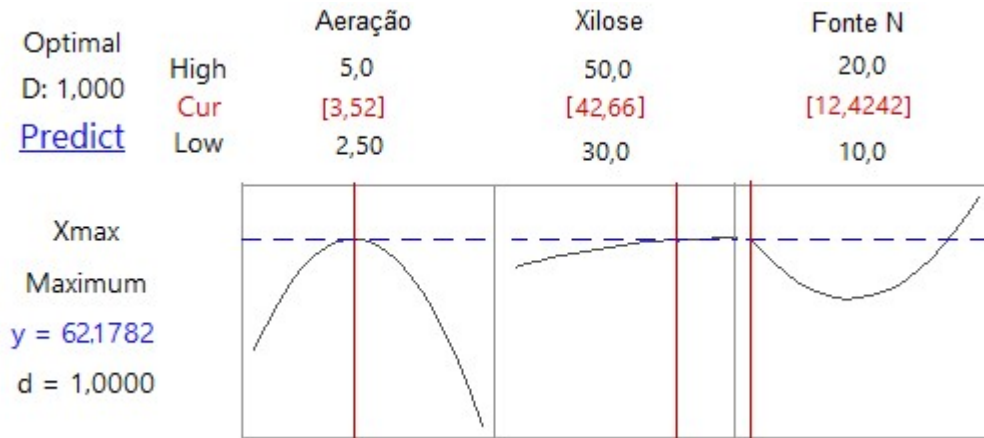


Figura 36: Condições de otimização para produção máxima de xilitol (X_{max}) ajustada pelo modelo, após cultivo de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.



Figura 37: Condições de otimização para eficiência de conversão de açúcares em xilitol ($Y_{p/s}$) ajustada pelo modelo, após cultivo de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.



Figura 38: Condições de otimização para produtividade em xilitol (Q_p) ajustada pelo modelo, após cultivo de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba.

5.4.4 Validação

Com o objetivo de validar os modelos propostos a partir das condições ótimas para produção de xilitol (Figuras 36), foi realizada uma nova fermentação com os valores obtidos para os parâmetros avaliados. Como resultado, obtiveram-se valores próximos aos preditos para produção máxima de xilitol ($X_{m\acute{a}x}$) (Predito: 62,17g/l; Obtido: 60,04g/l), eficiência de conversão de açúcares em xilitol ($Y_{p/s}$) (Predito: 0,82g/g; Obtido: 0,79g/g) e produtividade em xilitol (Q_p) (Predito: 0,65g/l.h; Obtido: 0,83g/l.h). Os valores máximos obtidos foram alcançados após 72 horas de cultivo, no qual houve o consumo de glicose em sua quase totalidade nas primeiras 24 horas e de xilose ao longo de todo o processo, possuindo consumo maior entre 24 e 48 horas (Figura 34). Houve produção de etanol, mas essa não foi expressiva (de 8 a 12g/l) e provavelmente não influenciou significativamente na produção de xilitol por *M. caribbica* UFMG08.

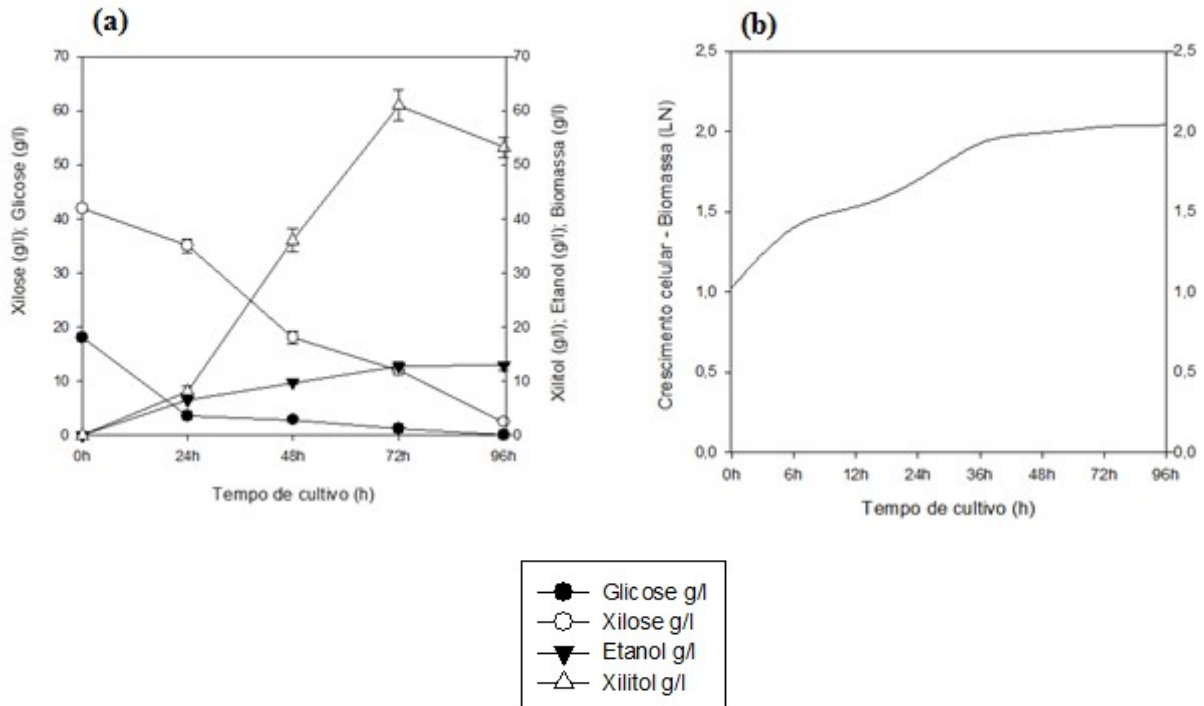


Figura 39: Perfil da fermentação de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 nas condições ótimas para produção de xilitol a partir da validação dos modelos ajustados.

A Figura 39-b representa o crescimento celular em biomassa seca (g/l) de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 durante o cultivo realizado com os parâmetros ótimos preditos. Pode-se observar que o crescimento inicia-se na fase log, sendo suprimida a fase lag devido ao pré-cultivo realizado por 24 horas antes do início do processo na mesma fonte de carbono. A fase log dura até 36h, correspondendo a fase na qual é consumida quase toda a concentração de glicose do meio e há consumo de aproximadamente 50% da xilose total, período no qual inicia-se a produção de xilitol. Após 36 horas de cultivo inicia-se a fase estacionária com a manutenção da densidade celular no meio de cultivo, e apesar de não haver aumento celular, a xilose ainda é consumida, levando ao aumento de produção de xilitol até 72h, período no qual há baixas concentrações de fonte de carbono no meio, com consequente diminuição da produção de xilitol devido a morte celular.

Embora somente as condições ótimas para $X_{m\acute{a}x}$ tenham sido escolhidas para a validação, os fatores bias (F_B) e exatidão (F_A) para as respostas Q_p e $Y_{p/s}$ também foram calculados (Tabela 14). Para o modelo de produção de xilitol, nas condições ótimas, os índices F_B e F_A resultaram em valores iguais a (1,03; 1,03). Esses valores indicam um modelo preditivo confiável, pois são valores próximos de 1(0,75 a 1,25), ou seja, considerados satisfatórios para

capacidade preditiva (Baranyi, et al. 1999). Nas condições ótimas para $X_{m\acute{a}x}$, o modelo apresentou um erro de predição em torno de apenas 1,8%, sendo subestimado. Para Y_p o erro foi maior, alcançando 4,8%, também sendo subestimado. Já para $Y_{p/s}$ o erro foi de 1,2%, sendo superestimado. O intervalo de confiança dos modelos gira em torno do ponto central, o qual está relacionado a uma capacidade preditiva maior. Afastando-se a condição do ponto central ocorre perda de capacidade preditiva do modelo (Baranyi, et al. 1999). Os demais modelos, que tiveram a predição avaliada nas condições ótimas para suas respostas neste trabalho, mostraram-se pouco relevantes para a predição nas condições ótimas para X , mas importantes para o estudo dos efeitos dos fatores sobre as respostas.

Tabela 12. Validação dos modelos quadráticos obtidos para $X_{m\acute{a}x}$, Q_p e Y_p , em condições ótimas para a produção de xilitol após cultivo de *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em meio formulado a base de biomassa residual.

<i>Fatores</i>	$X_{m\acute{a}x}$ (g/l) ($R^2=72,50\%$)	Q_p (g/l.h) ($R^2=87,87\%$)	$Y_{p/s}$ (g/g) ($R^2=35,58\%$)
F_B	1,03	1,07	1,04
F_A	1,03	-1,07	1,04

Em relação aos experimentos prévios nos quais a maior produção de xilitol por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de torta de macaúba foi 54,04g/l houve aumento de 13% na produção de xilitol máxima obtida a partir da otimização do processo fermentativo, alcançando 61,13/g/l.

Há poucos relatos de trabalhos de otimização em meio a base de hidrolisados hemicelulósicos e nesses o aumento de produção relatados está entre 25 e 35%. Roberto & Silva (2001) obtiveram 25% de aumento da produção de xilitol cultivando *Candida guilliermondii* FTI20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, utilizando RSM. A produção máxima de xilitol alcançada foi de 52g/l, com uma eficiência de conversão de açúcares a xilitol de 0,65g/g e produtividade em xilitol de 0,54g/l.h. Felipe et al (1998), a partir de otimização do processo fermentativo em meio a base de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar, cultivando a mesma linhagem de *Candida guilliermondii* obteve 44g/l de xilitol, eficiência de conversão de açúcares a xilitol de 0,78g/g e produtividade em xilitol de

0,62g/l.h, alcançando 35% de aumento de produção de xilitol. Ramesh et al (2012) a partir de otimização da produção de xilitol em meio a base de palha de milho obteve um aumento de 0,76g/g na eficiência de conversão de açúcares em xilitol, cultivando *C guilliermondii* NCIM3124.

A produção máxima de xilitol obtida no presente trabalho supera em até 18% a dos trabalhos anteriormente citados, bem como valores obtidos em processos de otimização da produção de xilitol em meios semi-sintéticos, como os obtidos por Gonçalves 2014, que alcançou 26,4g/l de xilitol cultivando uma linhagem de *Candida boidinii*. Essa diferença entre os valores de produção de xilitol pode estar relacionada tanto as condições de cultivo testadas quanto as espécies utilizadas.

Os resultados obtidos posteriormente aos processos de otimização não foram tão expressivos quanto alguns relatados na literatura nos quais obtem-se mais de 40% de aumento de produção, o que pode indicar que para os fatores avaliados já havia sido alcançado condições muito próximas das ótimas nos experimentos prévios. Diante disso, para obter-se valores ainda maiores de produção seria necessário avaliar outros parâmetros além dos testados, como pH, concentração inicial do inóculo, temperatura e agitação.

A produção de xilitol por *Meyerozyma caribbica* UFMG08 estudada e otimizada primeiramente neste trabalho, demonstra grande potencial de produção de xilitol por essa linhagem, bem como o potencial dos meios de cultivo formulados a base de resíduos agroindustriais para este fim. A seleção de micro-organismos com alto potencial para a produção de xilitol e o uso de resíduos para a formulação de meios de cultivo são alternativas viáveis de reduzir os custos do processo em escala industrial e diminuir o impacto ambiental causado pelo uso de processos químicos de produção e de descartes incorretos de resíduos oriundos das agroindustrias.

6 CONCLUSÃO

A partir de um bioprocesso no qual o meio de cultivo utilizado contém apenas resíduos agroindustriais como o hidrolisado de torta de macaúba e o extrato de levedura de cervejaria foi possível obter uma produção e produtividade expressiva de xilitol, maior que algumas relatadas para espécies como *Meyerozyma guilliermondii* que é reconhecidamente uma boa produtora do composto.

Além disso, foi possível obter informações importantes acerca da fisiologia da levedura *Meyerozyma caribbica* UFMG08 quando cultivada em meio formulado a partir de biomassa residual. A metodologia de otimização combinado os níveis dos fatores definidos a partir do fatorial fracionado permitiu obter um aumento de 13% na produção de xilitol. Esse entendimento pode contribuir para passos futuros de otimização de novos parâmetros fermentativos para melhorar ainda mais a produção por essa linhagem e para o uso dela em fermentações com outros diferentes tipos de biomassas residuais.

De modo geral, foi possível verificar a importância desses tipos de biomassa residuais como substratos para o crescimento de leveduras e consequente geração de produtos com alto valor agregado, como o etanol e xilitol. Este trabalho ratifica a importância da busca por linhagens de leveduras capazes de produzir xilitol a partir de biomassa residual, o que seria uma melhor alternativa econômica para o processo de produção desses bioprodutos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus Niger***. 2010. 118p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Toledo, PR. 2010.
- AKHANAAROVA, S; KAFAROV, V. **Experiment optimization in chemistry and chemical engineering**, Mir Publishers, Moscow, 1982.
- ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.; SILVA, J.B.A.E.; PRATA, A.M.R. **Pretratament of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xilitol production by *Candida guilliermondii***. Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifton, v.70-72, p. 89-97, 1998.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J. (2010). **Pretreatment Technologies for na efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review**, “Bioresource Technology. 101(13), 4851-4861, 2010.
- AMORE,R.; KOTTER,P.; KUSTER,C.; CIRIACY,M.;CORNELIS,P.H. **Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of NAD(P)H dependent xylose reductase encoding gene (xyl1) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis***. Gene 109: 87-89, 1991.
- ARANTES, V. & SADDLER, J.N. (2010). **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis**. Biotechnology for Biofuels, v. 3, n. 4. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4. Acesso em 19 de outubro de 2013.
- ARRUDA, P.V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 165f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS (ABRELPE). **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil** (Edição 2006). São Paulo: Abrelpe, 2007.

AUTIO, J.T. **Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* in preschool children.** ASDC Journal of Dentistry for Children, v. 69, n.1, p. 81-86, 2002.

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*.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1988, 3:241-51.

BRANCO, R. F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistemas de regeneração de coenzimas como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção.** USP LORENA, 2010. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

BRANCO, R.F.; SANTOS, J. C.; MURAKAMI, L. Y.; MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; SILVA, S. S. **Xylitol Production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration.** Process Biochemistry, v. 42, p. 258-262, 2007.

BAR, A. Xylitol. In: O'BREIN NABORS, L., GELARDI, R.C., eds. **Alternative Sweeteners.** 2. ed., New York: Marcel Dekkor Inc. p.349-379, 1991.

BAZAN, S.B. **Expression of the HPV-16 L1 Capsid Protein in Methylophilic Yeasts.** Masters Thesis, 2007.

BICHO, P.A.; RUNNALS, P.L.; CUNNINGHAM, J.D.; LEE, H.; **Introduction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachylophen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars.** Applied and Environmental Microbiology, v.54, n.51, p. 50-54, 1998.

BORA, N. **Large-Scale Production of Secreted Proteins in *Pichia pastoris*.** *Methods in Molecular Biology*, v.866, 217-235, 2012.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. **On the Experimental Attainment of Optimum Conditions.** *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, v.13, n.1, p.1-45. 1951.

BRUINENBERG, P.M., et.al. **NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.19, n.4, p.256-260, 1984.

CANILHA, L. **Aproveitamento do Hidrolisado de Palha de Trigo para a Obtenção de Xilitol por Via Microbiana.** Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), Dissertação de Mestrado, pp.79, 2002.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Biocatalisadores imobilizados uso de células imobilizadas em processos biotecnológicos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ano IX, n.36, p. 48-57, 2006.

CARMO, E.J. **Clonagem e Expressão Regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia evolutiva) – Manaus, 2010.

CARVALHO, W. **Estudo da imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 108p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2000.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. **Uma visão sobre a estrutura , composição e biodegradação da madeira.** Química Nova, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CARVALHO, M.Z. **Aproveitamento do resíduo sólido de Mamona proveniente da cadeia produtiva do biodiesel como adsorvente alternativo.** 2013. 89f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. **Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate.** Biochemical Engineering Journal 25, 25-31, 2005.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J. M. **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** FEMS Microbiology Reviews, v. 24, p. 45-66, 2000.

- CHIANG C., KNIGHT S. G. **Metabolism of d-xylose by moulds.** Nature 188: 79–81, 1960.
- CHIBATA, L.; TOSA, T. **Use of immobilized cells.** Annual Review of Biophysics & Bioengineering, v.10, p.197-216, 1981.
- CORTEZ, D.V. **Permeabilização de Células de *Candida guilliermondii* Empregando Processos Químicos e Físicos e Seu Potencial Uso como biocatalisadores na Síntese de Xilitol.** 2010, 125f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.
- COVIZZI, L.G. **Seleção de um suporte semi-sintético para imobilizar células do *Botryosphaerla rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas.** 90p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2007.
- CREGG, J.M.; VEDVICK, T.S.; RASCHKE, W.V. **Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*.** Bio Technol., v.11.p.905-910, 1993.
- CUNHA, N.B. **Expressão de cinco diferentes proteínas de interesse farmacológico em sementes transgênicas de soja [*Glycine max* L. (Merril)].** 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2008.
- DALY, R. E.; HEARN, M.T.W.; **Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production.** J. Mol. Recognit. 18: 119-138, 2005.
- DANTAS, T.V.M. **Proteína Recombinante do Vírus da Artrite Encefalite Caprina com Potencial Antigênico.** Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2009, 120f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Ceará, 2009.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. **Simultaneous optimization of several response variables.** Journal of Quality Technology, Milwaukee, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

ELLMOOW, K. C., S. J. BHATNENA, J. N. JOHANSEN, M. A. BRYANT and N. W. O'DONNELL. **Biomarkers used to assess the effect of dietary xylitol or sorbitol in the rats.** Nutr. Res. 19:16326-1648, 1999.

EMBRAPA AGROENERGIA. **Produção de brinquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais.** Brasília, 2012.

EMODI, A. **Xylitol, its properties and food application.** Food Technol. v.32, 20–32, 1978.

FELIPE, M.G.A. **Biotechnological Production of xylitol from lignocellulosic materials.** In: **Lignocellulose Biodegradation.** New York: American Chemical Society, p. 300-315, 2004.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S.; **Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH.** Biomass and Bioenergy, v.13, n.1/2, p.11-14, 1997.

FELIPE, M. G. A. **Obtenção de xilitol por fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** Viçosa, M.G.: UFV, 1994. 141p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia das Fermentações) - Universidade de São Paulo.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** New York: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA-LEITÃO, V.S., GOTTSCHALK, L.M.F., FERRARA, M.A., NEPOMUCENO, A.L., MOLINARI, H.B.C., BON, E.P.S. (2010). **Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses, Waste and biomass Valorization**, 1: 65-76.

GALAI, S.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M.N. **Decolorization of an industrial effluent by free and immobilized cells of *Stenotrophomonas maltophilia* AA56. Implementations of efficient down flow column reactor.** World Journal of Microbiology Biotechnology, v.26, p.1341-1347, 2010.

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

GLIEMMO, M.F., et al. **Interactions between aspartame, glucose and xylitol in aqueous systems containing potassium sorbate**. *LWT – Food Sci. Technol.* V. 41, p.611–619, 2008.

GOLDSTEIN, I. S. **Organics Chemicals from Biomass**. Florida. Boca Raton, cap I p. 10-15, 1981.

GONÇALVES, 2014. **Bioconversão de materiais lignocelulósicos em etanol e xilitol por *Candida boidinii* UFMG14**. 132f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 2014.

GONÇALVES, D.B.; BATISTA, A.F.; RODRIGUES, M.Q.R.B.; NOGUEIRA, K.M.V.; SANTOS, V. L. **Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14**. *Bioresource Technology*, v. 146,p. 261-266, 2013.

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. **Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2**. *Biotechnol. Lett.* 1981,3:125-30.

GRILLAUD, M. et al. **Les polyols em odontologie pediatrique:interet du xylitol**. *Archives de Pediatrie*, v.12, n.7, p.1180-1186, 2005.

GUO C.; ZHAO, C.; HE, P.; LU, D.; SHEN, A.; JIANG, N.; **Screening and characterization of yeasts for xylitol production**. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101:1096-104.

GUO, X.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M. **Immobilization of *Rhodococcus sp.* AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation: new advances of trans-2methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.1-5, 2006.

GUTMANN, K., ALANEM, P., ISOKANGAS, P., **Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children.** *Community Dent Oral Epidemiol.* Jun;28(3):218-24, 2000.

HAHN-HAGERDAL, B. et al. **Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts.** *Enzyme and Microbiol Technology*, v.16, p.933-943, 1994.

HANDUMRONGKUL, C.; Ma D-P.; SILVA, J.L. **Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xy11) in *Pichia pastoris*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49:399-404, 1998.

HEIKKILÄ, H., HYÖVY, G., RAHKILA, L., SARKKI, M.L., VILJAVA, T. **A Process for the Simultaneous Production of Xylitol and Ethanol.** WO patent 91/10740, publ. 25/07/1991.

HERNANDES-SALAS, J.M.; VILLA-RAMIREZ, M.S.; VELOZ-RENDON, J.S.; RIVERA-HERNANDEZ, K.N.; GONZALEZ-CESAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, A.; TREJO-ESTRADA, S.R. **Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse.** *Bioresource Technology*, v.100, p.1238-1245, 2009.

HIGGINS, D.R. **Current Protocols in Protein Science: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** Wingfield, 1995.

HUANG, C.F.; JIANG, Y.F.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. **Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as a part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process.** *Bioresource Technology*. 102, 3322-3329, 2011.

HYNONEN, L. et al. **Food technological evaluation of xylitol.** *Adv. Food Res.*, v.28, p.373-403, 1982.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. **Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugar: challenges and opportunities.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v.1, p. 119- 134, 2007.

KADAM, K.L., Chin, C.Y., Brown, L.W. **Flexible biorefinery for producing fermentation sugars, lignin and pulp from corn stover.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 331–334, 2008.

KAVANAGH, K.L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B.; WILSON, D.K. **The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*.** Biochemistry, 2002. Jul 16:41 (28): 8785-95.

KILLIAN S.G.; van UDEN, N. **Transport of xylose and glucose in the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*.** Applied Microbiology and Biotechnology, 27: 545-548, 1988.

KIM, H.J.; YANG, J.S.; BAEK, K.; YANG, J.W. **Removal of arsenic from ground water by miceller-enhanced ultrafiltration (MEUF).** Chemosphere, v.77, p.22-33, 2006.

KIM, M.D.; JUEN, Y.S.; KIM, S.G.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. **Comparison of xylitol production in recombinat *Saccharomyces cerevisiae* strains harboring XYL1 gene of *Pichia stipitis* and GRE3 gene of *S. cerevisiae*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 862-866, 2002.

KRICKA, W.; FITZPATRICK, J.; BOND, U. **Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicelulose from biomass: a perspective.** Frontiers in Microbiology. Dublin, 2014.

KNUUTTILA, M. L. E., KUOKSA, T. H., SVANBERG, M. J., MATTILA, P. T., KARJALAINEN, K. M., KOLEHMAINEN, E. **Effects of dietary xylitol on collagen content and glycosylation in healthy and diabetic rats.** *Life Sci.*, v.67, p.283-290, 2000.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. **Immobilization Technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review.** Food Microbiology , v.21, p. 377- 397, 2004.

KURTZMAN, C.P.; SUZUKI, M. 2010. **Phylogenetic analysis of Ascomycete Yeasts that form foenzyme Q-9 and the proposal of the new Genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleromyces*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*.** Mycoscience 51: 2-14.

LAGUNAS, R. **Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae***. FEMS Microbiology Review. 104, 229-242, 1993.

LAUFENBERG, G., 2003. **Transformation of vegetable waste into added products: (A)The upgrading concept; (B) Practical implementations**. Bioresource Technology, 87,167-198.

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

LEE, W.J.; KIM, M.D.; YOO, M.S.; RYU, Y.W.; SEO, J.H.; **Effects of xylose reductase activity on xylitol production in two-substrate fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae***. Journal of Microbiology na Biotechnology, v.13, p.725-730, 2003.

LIGHTELM, M.E.; PRIOR, B.A.; du PREEZ, J.C.; BRANDT, V. **An investigation of D-(1-¹³C) xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic conditions**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 293-296 (1988).

LOURENÇO, M.V.M. **Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol**. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 2009.

LOVEREN, C. **Sugars alcohols: what in the evidence for caries-preventive effect and caries therapeutic effects?**. Caries Research, v.38, p. 286-293, 2004.

LU,J.; TSAI, 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.

LUCAS,C.; van UDEN, N. **Transport of hemicelluloses monomers in the xylose fermenting yeast *Candida shehatae***. Applied Microbiology and Biotechnology 23: 491-495. 1986.

MAEDA, H., et al. **Properties of NAD(P)H-linked aldose reductase from *Cryptococcus lactativorus***. Journal of Fermentation Technology, v.66, n.6, p.615-623, 1988.

MAKINEN, K.K. 2000. **Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol?** Medical hypotheses 54(4):603—613.

MARTON, J.M. **Avaliação de Diferentes Carvões Ativos e das Condições de Adsorção no Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana para Obtenção Biotecnológica de Xilitol**. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), Dissertação de Mestrado, pp. 103, 2002.

MAYR, P.; BRUGGLER, K.; KULBE, K.D.; NIDETZKY, B. 2000. **D-xylose metabolism by *Candida intermédia*: isolation and characterization of two forms of aldose reductase with different coenzyme specificities** . Journal of Chromatography 737: 195-202.

MELAJA, A.J.HAMALAINEN,L. **Process for making xylitol**. U.S. Patent n. 4.008.285. 18jun. 1975. Publ. 15/fev/1977.

MOISER, N.; WYMAN,C.; DALE,B.; ELANDER, R.; LEE, Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass**. Bioresource Technology, v. 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATTO, S.I. **Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz na Produção de Xilitol por *Candida guilliermondii***. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), Dissertação de Mestrado, pp. 173, 2002.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. **Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 38, n.4, p. 401- 4013, 2002.

NIDETSKY,B.; NEUHAUSER, W.; HALTRICH,D.; KULBE, K.D. **Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor**. Biotechnology and Bioengineering, v.52, p.387-396, 1996.

NOBRE, A.; LUCAS, C.; LEAO, C. **Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii***. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8): 3594-3598, 1999.

OKANO, K.; LIDA, Y.; SAMSURI, M.; PRASETYA, B.; USAGAWA, T.; WATANABE, T., 2006. **Comparison of in vitro digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi**. *Animal Science Journal*, 77, 308–313.

OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; SCHUWAN, R. F. **Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por *Fusarium* em sistema de batelada simples**. *Revista Interação*, Juiz de Fora, n.2, 2000. Disponível em:<<http://interacao.unis.edu.br/n2/art2.htm>>. Acesso em 25 de outubro de 2013.

OLIVERIO, J. L.; HILST, A. G. P. DHR – **Dedini Hidrólise Rápida (Dedini Rapid Hydrolysis) – Revolutionary process for producing alcohol from sugarcane bagasse**. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v. 106, n. 1263, p. 168-172, 2004.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae***. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar 2000. 64(1): 34-50.

PAPINI, M. et al., ***Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae***. *Microbial Cell Factories*, 11:136, 2012.

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

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M.; **Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates**. *Bioresource Technology*, v.66, p25-40, 1998^b.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. **Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental**. *Journal of Technology Management & Innovation*, v.2, 2007.

PEPPER, T., OLINGER, P. M. **Xylitol in sugar – free confections**. Food technol., v.42, n.10, p. 98-106, 1988.

PEREIRA, N.J.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Séries em biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos**. Volume I. Rio de Janeiro: Escola de Química /UFRJ, 2008.

PRADELLA, J.G.C. **Reatores com células imobilizadas**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (eds) Biotecnologia Industrial – Editora Edgard Blucher LTDA, 2001. v.2.

PROMPT, A.H. **Análise da Fermentação de xilose e glicose por leveduras *Spathaspora isoladas em madeira de decomposição***. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina (SC), Dissertação de Mestrado, pp. 85, 2012.

RAMOS, G.V.R.; BIRCHAL, V.S.; SEARA, L.M.; PEREIRA, F.D.; ALVISI, P.; **Caracterização química do autolisado de levedura de alambique e avaliação da aceitabilidade do pão de queijo adicionado do autolisado desidratado**. Ver. Nutr., Campinas, 24(3): 473-484, 2011.

RASMOVSKI, R.; VICUROVIC, V. **Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue**. Fuel, v.92, p. 1-18, 2012.

RAWAT, U.; RAO, M.B. **Purification kinect characterization and involvement of tryptophan residue at the NADPH binding site of xylose reductase from *Neurospora crassa***. Biochemica et Biophysica Acta, v.1293, p.222-230, 1996.

ROBERTO, I.C; SILVA, C.J.S.M. **Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037 using response surface methodology**. Process Biochemistry, v. 36, p.1119-1124, 2001.

ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.S.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. **Utilization os sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production**. Bioresource Technology, v. 36, p. 271-275, 1991a.

ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. **Bioconversion os Rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.57/58, p. 339-347, 1996b.

ROBERTO, I.C., SATO, S., MANCILHA, I.M. **Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of Xylitol: Effect of pH and Nitrogen Source.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.57/58, p.339-347, 1996.

ROBERTO, I.C. SATO, S.; MACILHA, 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.1223-1228,1995.

RODRIGUES, M.Q.R.B., RODRIGUES, F.T.G, GUIMARÃES, V.M. NAGEM, R.A.P. **Caracterização estrutural da alfa-galactosidase extracelular de *Debaryomyces hansenii* produzida em *Pichia pastoris*.** Anais 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Natal, 2013.

ROSEIRO, J.C., PEITO, M.A., GIRIO, F.M., AMARAL-COLLAÇO, M.T. **The Effects of the Oxygen Transfer Coefficient and Substrate Concentration on the Xylose Fermentation by *Debaryomyces hansenii*.** Archives Microbiology, v.156, p.484-490, 1991.

ROWELL, R.M. **Handbook of chemistry and Wood composites.** USA:Taylor & Francis, 2005.

SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. **Application of simples yeast extract from spent brewer´s yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*: a physiological study.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 17, p. 307-316, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. (2001). ***Molecular Cloning: A Laboratory Manual***, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAMPAIO F.C.; CHAVES-ALVE,S V.M. .; CONVERTI, A.; LOPES PASSOS, F.M.; CAVALCANTE COELHO, J.L.; **Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol**

bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. *Bioresour Technol.* 2008; 99: 502-8.

SANTOS, J.C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATO, S.I.; SILVA, S.S. **Influence of aeration rate and Carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor.** *Process Biochemistry*, v.40, p.113-118, 2005.

SARROUH, B.F. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana de açúcar e células imobilizadas: Avaliação de Parâmetros operacionais e viabilidade econômica.** 185p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2009.

SCOPEL, R.K. **Protein Purification – Principles and Practice.** 3.Ed., New York: Springer, 380p., 1983.

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

SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; **Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor.** *Process Biotechnology*, v.31, n.6, p.549-553, 1996.

SILVA, D.D.DV.; **Efeito da relação glicose-xilose na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.** 2004. 82p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2004.

SILVA, S.S. et al. **Cell immobilization and xylitol production using sugarcane bagasse as raw material.** *Appl. Biochemistry. Biotechnology.* 141, 215-228, 2007.

SILVA, C.J.S.M.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. **Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench reactor.** *Journal of Food Engineering*, v.75, p.115-119, 2006.

SILVA, V.C. **Indução da Expressão da Glicerol-3Fosfato Desidrogenase em levedura.** UNESP, Araraquara, 2009, 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.

SILVA, S.S.; MUSSATO, S.I.; SANTOS, J.C.; SANTOS, D.T.; POLIZEL, J. **Cell immobilization and xylitol production using sugarcane bagasse as raw material.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.141, p. 215-227, 2007.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. **Factores that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts - a review.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.7072, p.331-339, 1998.

SINDCERV, Sindicato Nacional da Industria da Cerveja. **Produção Nacional de Cerveja.** Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/mercado.php> Acesso em: 28/07/2015.

SOUSA, A.R.B. **Análise do Transcriptoma de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro de tabaqui (*Collossoma macropomum*) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris*.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2009, 65f. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Manaus, 2009.

SOUZA, O.; SANTOS, I. E. **Importância dos resíduos agropecuários na alimentação animal.** *Boletim pecuário*. 2002? Disponível em: <<http://www.boletimpecuario.com.br/artigos/showartigo.php?arquivo=artigo544.txt>>. Acesso em 11 de outubro de 2013.

SURYADI, H.; KATSURAGI, T.; YOSHIDA, N.; SUZUKI, S.; TANI, Y.; **Polyol production by culture of methanol-utilizing yeasts.** J.. Biosc. Bioeng. 2000;89:236-40.

SUZUKI, T.; YOKOHAMA, S.I.; KINOSHITA, Y.; YAMADA, H.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAP, K. **Expression xyrA gene encoding for D-xylose reductase of *Candida tropicalis* and production of xylitol in *Escherichia coli*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v.87, n.3, p.280-284, 1999.

TACIRO, M.K. **Processo contínuo de produção de polihidroxicanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes.** 2008, 98f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) São PAULO, 2008.

TANGULER, HASAN; ERTEN, HUSEYIN. **Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: the effect of temperature.** Food and Bioproducts processing, v.86, 317-321, 2008.

TAVARES, J.M.; DUARTE, L.C; AMARAL-CALAÇO, M. T; GÍRIO, F.M. **The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation.** Enzyme and Microbial Technology, v.26, p.743-747, 2000.

TORRES, F.A.G; MORAES, L.M.P. **Proteínas Recombinantes produzidas em leveduras.** BIO Tecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 12, p.20-22, 2000.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; NIEMELA, M. 1998. **A novel use of xylitol sugar in preventin acute otitis media.** Pediatrics 102(4): 879-884.

VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KUZMANOVA, S.; JEFRIES, T. **Effects of environmental conditions on production of xylitol *Candida boidinii*.** Wourld Journal of Microbiology and Biotechnology, v.11, p. 213-218, 1995.

VERDUYN, C., Van Kleef, R., Frank, J., Schreuder, H., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. **Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose fermenting yeast, *Pichia stipitis*.** Biochemistry. J. 226, 669–677, 1984.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. **Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria.** Revista de Nutrição, v.13, n.2, p.127-134, 2000.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. **Valor nutritivo da biomassa de células íntegras do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria.** Ver. Nutr., Campinas, 13(2): 127-134, 2000.

YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C. et al. **Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados.** Revista de Nutrição, v.16, n.4, p.423-432, 2003.

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. (1995) **The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*),** In: Biosc., Biotechn., Biochem. 59(3):439–444.

YAHASHI, Y.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. **Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding.** Journal of fermentation and bioengineering, v.18, n.2, p.148-152, 1996.

YOKOHANA, S. et al. **Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v.79, p.217-223, 1995.

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

WANG, M.Y.; YU, Y.T.; CHNG, T.M.S. **New method for preparing more stable microcapsules for the entrapment of genetically engineering cells.** Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology, v.33, p.257-269, 2005.

WARD, O.P. **Fermentation Biotechnology.** Open University Press, Buckingham, U.K. 1991.

WILSON, D.K.; KAVANAGH, K.L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. **The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo/keto reductases and opportunities for protein engineering.** Chemico-biological Interactions, v. 143/144, p.515-521, 2003.

WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, K. **Microbial conversion of D-xylose to xylitol.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v.86, p.1-14, 1999