



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARINA OLIVEIRA SUDÁRIO

**BIOPRODUÇÃO DE XILITOL POR *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 USANDO
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU: UM ESTUDO
SOBRE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA AGITAÇÃO**

FORTALEZA

2017

MARINA OLIVEIRA SUDÁRIO

BIOPRODUÇÃO DE XILITOL POR *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 USANDO
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU: UM ESTUDO SOBRE A
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA AGITAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Bioprocessos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S94b Sudário, Marina Oliveira.
Bioprodução de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju: um estudo sobre a influência da temperatura e da agitação / Marina Oliveira Sudário. – 2017.
76 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

1. Bioprocesso. 2. Resíduos lignocelulósicos. 3. Levedura. I. Título.

CDD 661

MARINA OLIVEIRA SUDÁRIO

BIOPRODUÇÃO DE XILITOL POR *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 USANDO
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU: UM ESTUDO SOBRE A
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA AGITAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia. Área de concentração:
Bioprocessos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Marjory Lima Holanda Araujo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Tiago Lima de Albuquerque
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Marilac e Marcos.

À Mell.

Ao Lucas.

Por todo amor, suporte e apoio dedicados
durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente aos meus pais, Marilac e Marcos, por todo amor e dedicação que me ofereceram ao longo de toda minha vida. Sou quem sou e aprendi tudo o que sei por causa de vocês. Dedico a vocês tudo de melhor que tenho a oferecer.

À minha irmã Mell, por trazer graça e alegria mesmo em momento de estresse e raiva. Eu te amo, Pepinha.

Ao Lucas, por sempre me empurrar para frente e por nunca me deixar fraquejar. Obrigada por me oferecer um tanto de amor todos os dias. Você é o melhor companheiro por qual eu poderia pedir na vida.

À minha orientadora, Dr^a Maria Valderez Ponte Rocha, por quem nutro uma enorme admiração, por todo o conhecimento repassado, apoio e confiança oferecidos a mim durante os últimos meses. Serei sempre grata pela oportunidade oferecida.

As minhas amigas do coração Bárbara e Naomi pela companhia e força durante esses 6 anos de graduação. Eu, provavelmente, não teria conseguido sem vocês. As duas foram os melhores presentes que a UFC me deu.

A todos os amigos que me acolheram no grupo do GPBio e tornaram meus dias mais alegres e fáceis. Juliana, Fernando, Layanne, Jouci, Tiago, Ítalo, Tici, Lorena, Davi e Renata, fica aqui meu muito obrigada por toda ajuda e companhia a mim fornecidas.

Ao Gilmar, por ser esse excelente profissional que busca a melhora da nossa Biotecnologia todos os dias. Você é exemplar. Obrigada por todo o serviço prestado na UFC e por sua amizade.

Aos participantes da banca examinadora, Prof^ª. Dr^a. Marjory Lima Holanda Araujo e, meu querido companheiro de laboratório, Tiago Lima de Albuquerque pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Universidade Federal do Ceará por nos oferecer o espaço físico para a realização de nossas atividades curriculares.

À CAPES, que através do CNPQ, me concedeu a bolsa como apoio para os estudos.

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nos momentos mais sombrios, se a pessoa se lembrar de acender a luz. “

J. K. Rowling

RESUMO

O xilitol é um poliol utilizado em indústrias alimentícias, odontológicas, farmacêuticas e de cosméticos. A produção em larga escala desse açúcar-álcool ocorre por via química, sendo um processo que usa altas temperaturas e altas pressões, sem contar as várias etapas de purificação requeridas, tornando o processo de obtenção de xilitol muito caro. Por esse motivo buscaram-se novas maneiras de produção que possam ser tão eficientes quanto os modos tradicionais. A produção de xilitol por bioprocessos tem várias vantagens em relação aos processos químicos tradicionais, devido a isso muitos estudos sobre meio de cultura preparados a partir de hidrolisados lignocelulósicos vêm sendo realizados, uma vez que, materiais lignocelulósicos, como o bagaço de caju, são fontes/substratos de baixo custo e com potenciais aplicações em bioprocessos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de xilitol via processo biotecnológico, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 e o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como substrato, assim como avaliar as condições ótimas de temperatura e agitação para essa bioprodução. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por hidrólise do bagaço de caju utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,6 mol) diluído e aplicado como meio de cultivo. Inicialmente, avaliou-se a influência da temperatura (30 °C, 37 °C, 40 °C e 45 °C), sob agitação constante de 150 rpm. Nesta etapa, os melhores resultados encontrados foram à temperatura de 40 °C, utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju, obtendo uma concentração máxima de xilitol de 5,14 g.L⁻¹, produtividade de 0,11 g.L⁻¹.h⁻¹ e rendimento de xilitol ($Y_{P/S}$) de 0,30 g.g⁻¹. Para os meios sintéticos, as maiores concentrações de xilitol ocorreram na temperatura de 30 °C. No meio Dasgupta (MD) essa concentração de xilitol foi de 2,67 g.L⁻¹ e no meio Serpa (MS) foi de 2,63 g.L⁻¹. Entretanto, quando cultivado no MS, observou-se que o crescimento em biomassa do micro-organismo foi maior a 37 °C, atingindo a concentração de 16,11 g.L⁻¹ de biomassa, enquanto o MD apresentou um crescimento de 10,47 g.L⁻¹ quando na temperatura de 30 °C. Posteriormente, avaliou-se a influência da agitação (120, 150 e 200 rpm) e fixou-se a temperatura de 40 °C, por ter sido a temperatura que proporcionou as maiores produções de xilitol no meio a base do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju, sob estas condições os melhores resultados foram encontrados na agitação de 150 rpm, utilizando hidrolisado hemicelulósico, cujo os valores do processo já foram descritos anteriormente. Para os meios sintéticos, as maiores concentrações de biomassa ocorreram na agitação de 200 rpm, para o MD essa concentração foi de 15,71 g.L⁻¹ e para o MS foi de 16,88 g.L⁻¹. Entretanto, MD apresentou uma maior produção de xilitol a 150 rpm, atingindo a concentração de 0,52 g.L⁻¹, enquanto o MS apresentou uma concentração de 10,47 g.L⁻¹ de xilitol quando na agitação de 200 rpm. Com os resultados apresentados, pode-se considerar que o hidrolisado de bagaço de caju é um meio potencial para a produção biotecnológica de xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, sendo a maior produção atingida quando o cultivo foi conduzido a 40 °C e 150 rpm.

Palavras-chave: Bioprocesso. Resíduos lignocelulósicos. Levedura.

ABSTRACT

Xylitol is a polyol used in food, dental, pharmaceutical and cosmetic industries. Large-scale production of the sugar-alcohol occurs by via chemical, and it is a process that uses high temperatures and pressures, not counting the various purification steps required, making the process of xylitol production very expensive. For this reason, researchers are seeking new processes of production that can be as efficient as traditional modes. The production of xylitol by bioprocesses has several advantages over traditional chemical processes, due to this, many studies on culture media prepared from lignocellulosic hydrolysates have been carried out. Lignocellulosic materials, such as cashew apple bagasse, are low cost sources with potential applications in bioprocesses. In this context, the aim of this study was to evaluate the production of xylitol by biotechnological processes, using the yeast *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 and the hemicellulosic hydrolysate from cashew apple bagasse as substrate, as well as to evaluate the optimal conditions of temperature and agitation for this bioproduction. The hemicellulosic hydrolysate was obtained by hydrolysis with dilute sulfuric acid (H_2SO_4) and applied as culture medium. Initially, the influence of temperature (30 °C, 37 °C, 40 °C e 45 °C) under constant stirring, at 150 rpm, was evaluated. At this stage, the best results were observed at a temperature of 40 °C, using hemicellulose hydrolysate from cashew apple bagasse, obtaining a maximum concentration of xylitol of 5.14 g.L⁻¹, productivity of 0.11 g.L⁻¹.h⁻¹ and xylitol yield ($Y_{P/S}$) of 0.30 g.g⁻¹. For synthetic media, the highest concentrations of xylitol occurred at temperature of 30 °C, for the Dasgupta medium (MD) this concentration was 2.67 g.L⁻¹ and for the Serpa medium (MS) was 2.63 g.L⁻¹. However, when grown in MS, it was observed that the growth in biomass of the microorganism was higher at 37 °C, reaching the concentration of 16.11 g.L⁻¹ of biomass, while the MD showed a growth of 10.47 g.L⁻¹ when at 30 °C. Subsequently, the influence of the agitation (120, 150 e 200 rpm) was evaluated at 40 °C, because it was the temperature that provided the highest yields of xylitol, under these conditions the best results were found in the agitation of 150 rpm, using hemicellulose hydrolysate, whose process values have already been described previously. For synthetic media, the highest concentrations of biomass occurred in the agitation of 200 rpm, for the MD this concentration was 15.71 g.L⁻¹ and for the MS was 16.88 g.L⁻¹. However, MD showed a higher production of xylitol at 150 rpm, reaching the concentration of 0.52 g.L⁻¹, while the MS presented a concentration of 10.47 g.L⁻¹ of xylitol when in the agitation of 200 rpm. With the results presented, it can be considered that the cashew apple bagasse hydrolysate is a potential medium for the biotechnological production of xylitol by the yeast *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, being the highest production reached when the process was conducted at 40 °C and 150 rpm.

Keywords: Bioprocess. Lignocellulosic wastes. Yeast.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Xilitol	18
3.1.1	<i>Propriedades Físico-Químicas</i>	18
3.1.2	<i>Aplicações do xilitol</i>	20
3.1.2.1	<i>Indústria de alimentos</i>	20
3.1.2.2	<i>Aplicações odontológicas</i>	21
3.1.2.3	<i>Aplicações na medicina</i>	22
3.1.3	<i>Rota bioquímica</i>	23
3.1.4	<i>Métodos de obtenção</i>	24
3.1.4.1	<i>Produção por via química</i>	25
3.1.4.2	<i>Produção biotecnológica</i>	26
3.2	Bagaço de caju como matéria-prima	27
3.2.2	<i>Biomassa lignocelulósica</i>	27
3.2.3	<i>Caju</i>	29
3.3	Micro-organismos produtores de xilitol	30
3.4	Parâmetros da fermentação que influenciam a produção de xilitol	32
3.4.1	<i>Temperatura</i>	33
3.4.2	<i>Aeração</i>	34
3.4.3	<i>Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Materiais	36
4.1.1	<i>Micro-organismo</i>	36
4.1.2	<i>Bagaço de caju</i>	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	<i>Preparação e hidrólise ácida do bagaço de caju</i>	36
4.2.2	<i>Processo de detoxificação do hidrolisado</i>	36
4.2.3	<i>Meios de cultivo</i>	37
4.2.4	<i>Preparação da levedura</i>	37
4.2.5	<i>Bioprocesso para a produção de xilitol</i>	38
4.2.5.1	<i>Estudo da influência da temperatura</i>	38
4.2.5.2	<i>Estudo da influência da agitação</i>	38

4.2.6	<i>Métodos analíticos</i>	38
4.2.6.1	<i>Determinação da concentração de biomassa</i>	38
4.2.6.2	<i>Determinação da concentração de glicose, xilose e xilitol</i>	39
4.2.7	<i>Parâmetros de conversão</i>	39
4.2.7.1	<i>Concentração máxima de produto (P_{máx})</i>	39
4.2.7.2	<i>Produtividade volumétrica (Q_p)</i>	39
4.2.7.3	<i>Conversão de substrato em produto</i>	39
4.2.7.5	<i>Rendimento de produto por célula</i>	40
4.2.7.6	<i>Software de análise de dados</i>	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Influência da temperatura na produção de xilitol	41
5.1.1	<i>Experimentos utilizando o meio Dasgupta (MD)</i>	41
5.1.2	<i>Experimentos utilizando o meio Serpa (MS)</i>	44
5.1.3	<i>Experimentos utilizando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC)</i> 47	
5.2	Influência da agitação na produção de xilitol	52
5.2.1	<i>Experimentos utilizando o Meio Dasgupta (MD)</i>	52
5.2.2	<i>Experimentos utilizando o Meio Serpa (MS)</i>	56
5.2.3	<i>Experimentos utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC)</i> 59	
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características e propriedades físico-químicas do xilitol	20
Quadro 1 – Vantagens e desvantagens dos processos de produção do xilitol por vias química, microbiológica e enzimática	27
Quadro 2 - Materiais lignocelulósicos utilizados em estudos para produção de xilitol.....	29
Tabela 2 – Micro-organismos produtores de xilitol.....	31
Tabela 3 – Influência da temperatura nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular no Meio Dasgupta (MD).....	43
Tabela 4 – Influência da temperatura nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular no Meio Serpa (MS).	46
Tabela 5 – Influência da temperatura nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC).	49
Tabela 6 – Influência da agitação nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular utilizando o meio Dasgupta (MD).	54
Tabela 7 – Influência da agitação nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular utilizando o meio Serpa (MS).	57
Tabela 8 – Influência da agitação nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC).	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do xilitol	18
Figura 2 - Esquema ilustrativo da via metabólica da xilose e glicose.	24
Figura 3 – Efeito da temperatura sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Dasgupta (MD). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.	41
Figura 4 - Efeito da temperatura sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Serpa (MS). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.....	45
Figura 5 - Efeito da temperatura sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 a 150 rpm utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC). (A) crescimento celular; (B) consumo de glicose; (C) consumo de xilose e (D) produção de xilitol.	48
Figura 6 - Influência da temperatura no (A) crescimento celular e na (B) produção de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 usando o meio Dasgupta (MD), o meio Serpa (MS) e o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC) com os bioprocessos conduzidos a diferentes temperaturas e 150 rpm. Dados experimentais: (■) HBC; (■) MS; (■) MD.	51
Figura 7 - Efeito da agitação sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Dasgupta (MD). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.....	53
Figura 8 - Efeito da agitação sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Serpa (MS). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.....	56
Figura 9 - Efeito da agitação sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 a 150 rpm utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC). (A) crescimento celular; (B) consumo de glicose; (C) consumo de xilose e (D) produção de xilitol.	60

Figura 10 - Influência da agitação no (A) crescimento celular e na (B) produção de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 usando o meio Dasgupta (MD), o meio Serpa (MS) e o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC) com os bioprocessos conduzidos a diferentes agitações e 40 °C. Dados experimentais: (■) HBC; (■) MS; (■) MD.64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BC	Bagaço de caju
HBC	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju
MS	Meio Serpa
MD	Meio Dasgupta
ATCC	Do inglês <i>American Typical Culture Collection</i>
HPLC	Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Rotações por minute
YEPD	Do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	Do inglês <i>Generally Regarded as Safe</i>
IG	Índice glicêmico
VPE	Via da pentose fosfato
XR	Xilose redutase
XDR	Xilitol desidrogenase
XK	Xiluloquinase
XI	Xilose isomerase
P _{máx}	Máxima concentração de xylitol
Q _p	Produtividade referente ao xylitol
Y _{P/S}	Rendimento do produto baseado no consumo do substrato (g.g ⁻¹)
Y _{X/S}	Rendimento do crescimento celular baseado no consumo do substrato (g.g ⁻¹)
Y _{X/P}	Rendimento do crescimento celular baseado na produção do produto (g.g ⁻¹)

1 INTRODUÇÃO

O xilitol é um açúcar-álcool de cinco carbonos usado comercialmente como adoçante natural em vários produtos alimentícios (WINKELHAUSEN, 1998). Possui uma doçura equivalente à da sacarose, com quase um terço a menos do seu teor calórico (EDELSTEIN *et al.*, 2008). O xilitol tem sido amplamente estudado e documentado na literatura pelo seu baixo índice glicêmico (ISLAM, 2011), alto poder de refrescância (MUSSATTO; ROBERTO, 2002), não envolvimento na via metabólica da insulina (CHEN *et al.*, 2010), influência anticariogênica e não interferimento no valor nutricional dos alimentos (RITTER *et al.*, 2012; UITTAMO *et al.*, 2011; DASGUPTA *et al.*, 2017a).

O xilitol possui propriedades farmacológicas únicas, tais como atuação na prevenção de caries dentárias e de infecções auditiva em crianças. Também é utilizado como substituto do açúcar para diabéticos e na aplicação parenteral a pacientes com traumas (ZACHARIS *et al.*, 2012). Entretanto, a maior aplicação deste composto está, atualmente, ligada a produtos orais, como pasta de dente, goma de mascar, enxaguatório bucal, spray nasal, entre outros (BRANCO, SANTOS e SILVA, 2011).

O processo de produção do xilitol pode ser realizado através de três procedimentos: químico, microbiológico ou enzimático (PAUL *et al.*, 2013). A produção de xilitol por bioprocessos tem várias vantagens em relação aos processos químicos tradicionais. Dentre essas vantagens estão o uso de condições amenas de pressão e temperatura, bem como a não necessidade da utilização da xilose pura, que, para ser obtida, necessita de várias etapas de purificação (SILVA *et al.*, 2012). Neste contexto, muitos estudos sobre meio de cultura preparados a partir de hidrolisados lignocelulósicos vêm sendo feitos (ARRUDA *et al.*, 2010; IRMAK *et al.*, 2017; LÓPEZ-LINARES *et al.*, 2018).

Os materiais lignocelulósicos são os recursos renováveis mais abundantes da Terra. Esses materiais são constituídos, geralmente, de celulose, hemicelulose e lignina, definindo a estrutura da maioria dos vegetais onde se encontram associados em uma complexa estrutura. A hemicelulose, por sua vez, é um polissacarídeo constituído, principalmente, de xilose e representa até 40% da massa seca em algumas plantas (RAO *et al.*, 2016; CORREIA, 2013). A partir da técnica de hidrólise ácida diluída, as hexoses (manose, galactose e outros) e pentoses (xilose e arabinose) constituintes da hemicelulose podem ser liberadas e, posteriormente, fermentadas para produzir bioprodutos, tais como etanol e/ou xilitol. (MICHEL, 2007; ROCHA *et al.*, 2014).

Além disso, existe atualmente um incentivo para que ocorra o uso de resíduos lignocelulósicos de matérias-primas agroindustriais para a obtenção de produtos de alto valor agregado por meio da aplicação de vários processos de conversão. Isso ocorre, pois, a eliminação final de resíduos lignocelulósicos gerados durante o processamento de matérias-primas agrícolas pode causar problemas ambientais associados à queima e/ou à acumulação. (VALLEJOS *et al.*, 2016).

Com isso, buscando assim, alternativas para uma produção ecologicamente correta, e economicamente viável do xilitol, surge, como uma opção promissora, a utilização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju como substrato.

Segundo dados da FAOSTAT (2013), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o Brasil é o quinto maior produtor mundial de castanha de caju com a produção de mais de 230 mil toneladas em 2011. O bagaço de caju (BC) é o resíduo sólido obtido após extração do suco de caju e que representa aproximadamente 20% do peso total do pedúnculo. É um dos principais produtos residuais da indústria agropecuária de caju, além de ser um subproduto lignocelulósico de baixo custo e alta abundância. Portanto, o BC trata-se de um material lignocelulósico com potencial para ser aplicado como uma matéria-prima alternativa promissora para a produção de xilitol (RODRIGUES, 2014; SANTOS *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2014).

O Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Bioprocessos – GPBio desenvolveu diversos estudos utilizando o bagaço de caju como matéria-prima, por exemplo, na produção de etanol (ROCHA *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2015), na produção de xilitol (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015) e na produção da enzima xilose redutase (SERPA, 2016), tendo esses estudos contribuído de forma direta para o tema proposto nesse estudo.

O processo de conversão via micro-organismos utiliza bactérias, fungos e leveduras para produzir xilitol a partir de um hidrolisado hemicelulósico. Entretanto, a produção de xilitol a partir de bactérias e fungos é bem menos estudada quando em comparação ao uso de leveduras (RAFIQUL; SAKINAH, 2013). As leveduras são preferidas para a produção biotecnológica de xilitol, principalmente por causa das suas altas taxas de assimilação de pentose, levando à alta produtividade de xilitol (AHMAD, SHIM E KIM, 2013).

Dentre os gêneros de leveduras capazes de produzir xilitol, *Candida sp.* é um dos mais extensivamente estudados (AHMAD, SHIM E KIM, 2013), entretanto, essas leveduras são conhecidas por possuírem capacidade de causar infecções devido às suas propriedades de virulência e características patogênicas (MOTHIBE; PATEL, 2017).

A levedura *Kluyveromyces marxianus*, por sua vez, apresenta vantagens quando usada em cultivos biotecnológicos a alta densidade e fermentações de açúcares 5C e 6C a altas temperaturas, além de serem relatadas por produzir 0,4-0,6 g/g de xilitol, devido à sua capacidade natural de assimilar xilose (MUELLER; WILKINS; BANAT, 2011). A característica de termotolerância dessa levedura faz com que ela se destaque nos estudos fermentativos em relação a outros micro-organismos, pois além das reações enzimáticas serem aceleradas, diminui-se o risco de contaminação por outros micro-organismos (NONKLANG et al., 2008).

A bioprodução de xilitol por leveduras também é fortemente influenciada pelo processo e cultivo (pH, temperatura, aeração, condições do reator e concentração do inóculo), pela composição nutricional (fonte de carbono, fonte de nitrogênio e micronutrientes e suas concentrações) e pela natureza genética das cepas microbianas (isolados de tipo selvagem, cepas recombinantes e mutantes) (RAFIQUL; SAKINAH, 2013). Portanto, o estudo das condições de cultivo ótimas para o crescimento de leveduras visando a produção biotecnológica são de extrema importância.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a produção de xilitol através de processos biotecnológicos utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 e hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju, além de avaliar as condições ótimas de temperatura e agitação para essa bioprodução.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a produção de xilitol por via biotecnológica utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como meio de cultivo indefinido por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a influência da temperatura na produção de xilitol utilizando meios definidos;
- Determinar a influência da temperatura na produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como meio indefinido;
- Determinar a influência da agitação na produção de xilitol utilizando meios definidos;
- Determinar a influência da agitação na produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como meio indefinido;
- Avaliar o impacto da presença de glicose no meio para a produção de xilitol;
- Comparar os resultados obtidos nas diferentes temperaturas e agitações quando utilizado os diferentes meios.

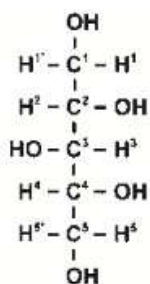
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Xilitol

3.1.1 Propriedades Físico-Químicas

O xilitol é um carboidrato natural que é classificado na sistemática da química orgânica como um poliálcool (poliálcool ou açúcar-álcool) cuja fórmula molecular é $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano). De estrutura aberta, a molécula de xilitol possui cinco grupos hidroxila (OH), cada um deles ligado a um átomo de carbono (Figura 1), razão pela qual esse composto é conhecido como polihidroxiálcool acíclico ou pentitol (MÄKINEN, 2000)

Figura 1 – Estrutura química do xilitol



Fonte: Mäkinen (2000).

Foi primeiramente sintetizado e descrito em 1891 pelo químico Emil Fischer (alemão, 1852-1919) e por sua equipe, que o prepararam na forma de xarope a partir da reação da xilose com amálgama sódica, sendo caracterizado como um cristal branco rômbo e altamente solúvel quando em contato com a água (BÄR, 1991).

É um adoçante natural que pode ser encontrado nas fibras de muitos vegetais, algas, líquens, cogumelos, frutas e legumes (PEPPER; OLINGER, 1988), além de ser um intermediário do metabolismo de carboidratos em mamíferos, inclusive no homem (RUSSO, 1976).

O xilitol é altamente conhecido por possuir elevado poder adoçante, apresentando 40% menos calorias que a sacarose (PEREIRA *et al.*, 2009). Apresenta como característica principal seu alto poder refrescante que se dá devido ao seu elevado calor endotérmico ($34,8 \text{ cal.g}^{-1}$) tornando-o, dentre os polióis, aquele que proporciona maior sensação de refrescância bucal (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). É quimicamente menos reativo (devido a ausência de

um grupo carbonil redutor) do que sua aldose/cetose correspondente e, portanto, traz dificuldades para micróbios cliva-lo e gerar energia (DASGUPTA *et al.*, 2017a).

Dentre outras, também possui características organolépticas e de benefícios à saúde, como: efeito refrescante natural (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2013), alta solubilidade (CARNEIRO *et al.*, 2012), baixo índice glicêmico (ISLAM, 2011), não carcinogênico (UITTAMO *et al.*, 2011) e cariostático (RITTER *et al.*, 2012), citadas por Albuquerque (2014). Essas características são responsáveis por tornar o xilitol bastante aplicável no processamento de alimentos, como balas, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas e bebidas (MONEDERO, PÉREZ-MARTÍNEZ e YEBRA, 2010).

Não apresenta efeitos teratogênicos, além de ser higroscópico, solúvel (a 20 °C), tem boa estabilidade química e microbiológica, tanto em forma cristalina como em solução. A percepção da doçura é considerada semelhante à da sacarose, e seu poder adoçante equivalente a 10% ao da sacarose, porém a viscosidade é inferior (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2013).

Nos últimos anos, a demanda por xilitol tem crescido 6% ao ano devido aos seus múltiplos benefícios, principalmente no mercado alimentício. Dois principais fatores têm contribuído com essa demanda crescente: um é o constante aumento da preocupação com a saúde e o outro é o desejo por alimentos livres de açúcares e de baixa calorias de origem natural. Globalmente, xilitol possui um vasto mercado composto de uma demanda anual de 161,5 milhões de toneladas métricas equivalente a um valor de US\$ 670 milhões (em 2013), e possui previsões de atingir 250 milhões de toneladas métricas até 2020, com um valor de mercado de aproximadamente US\$ 1 bilhão, de acordo com o site da companhia PR Newswire (DASGUPTA *et al.*, 2017a). Algumas propriedades físico-químicas do xilitol estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características e propriedades físico-químicas do xilitol

Propriedades	Características ou Valores
Fórmula empírica	$C_5H_{12}O_5$
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Ponto de Fusão	92-96 °C
Ponto de Ebulição	216 °C (1 atm)
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa a 10%)	1,03 g/mL
Solubilidade em água a 20 °C	63 g/100 g solução
Viscosidade (solução aquosa a 10%)	1,23 cP (a 20 °C)
Calor de Solução (endotérmico)	34,8 cal/g
Valor Calórico	2,4 kcal/g
Poder adoçante	Similar ao da sacarose, superior ao do sorbitol e manitol
Estabilidade	Estável a 120 °C (não carameliza)

Fonte: Adaptado de Mussatto e Roberto (2002).

3.1.2 Aplicações do xilitol

O xilitol é intitulado por alguns como o “adoçante do futuro”, termo que é explicado devido as propriedades diferenciadas que esse álcool-carboidrato possui, tendo emprego relevante em diversos ramos industriais, como na indústria farmacêutica, alimentícia e odontológica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

3.1.2.1 Indústria de alimentos

O aumento da ingestão de açúcares, em especial da sacarose, tem levado a ampliação dos riscos de problemas de saúde em escala mundial, estando, portanto, as populações mais susceptíveis a problemas causados por esse consumo exacerbado, como obesidade e cáries (LIMA e BERLINCK, 2003).

Tendo em vista o crescente número de pessoas que apresenta algum tipo de distúrbio metabólico e necessita, por isso, diminuir ou mesmo cessar seu consumo de açúcar, vários centros de pesquisa nacionais e estrangeiros têm tentado encontrar um substituto do açúcar que seja, ao mesmo tempo, nutritivo e benéfico para a saúde, atuando na cura ou na

prevenção de doenças. O xilitol, por sua vez, é um composto que satisfaz essas exigências, pois, além de ser um adoçante perfeitamente capaz de substituir a sacarose, é tolerado por diabéticos e tem várias aplicações clínicas (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

Outra vantagem é que, devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações com aminoácidos, conhecidas como reações de “Maillard”. Isto significa que ele não sofre reações de escurecimento não enzimático, que provocam diminuição do valor nutricional do alimento. Dessa forma, recomenda-se sua utilização na preparação de produtos nos quais as reações de Maillard são indesejáveis, tais como os alimentos infantis obtidos por secagem (MANZ *et al.*, 1973).

Segundo Mussatto e Roberto (2002), sendo o xilitol uma substância atóxica, classificada pela Food and Drug Administration (FDA) como um aditivo do tipo GRAS (Generally Regarded as Safe), sua incorporação em alimentos é legalmente permitida. O xilitol é extremamente bem tolerado quando ingerido em doses espaçadas de no máximo 20 g cada uma. Contudo, a quantidade consumida por dia não deve ultrapassar 60 g, já que a ingestão de doses mais elevadas pode produzir efeito laxativo (CULBERT *et al.*, 1986).

As características do xilitol o tornam bastante aplicável no processamento de alimentos, como balas, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas e bebidas (MONEDERO, PÉREZ-MARTÍNEZ e YEBRA, 2010).

3.1.2.2 Aplicações odontológicas

A cárie dentária é uma doença infecciosa pandêmica associada à presença de certos micro-organismos nas superfícies dos dentes. Esses organismos utilizam certos açúcares 6C (e múltiplos de 6C) como fonte primária de energia. Simultaneamente, essas moléculas de carboidratos podem ser usadas por bactérias orais que, assim, tornam o ambiente químico favorável para uma propagação máxima (MÄKINEN, 2000).

Uma das consequências desta fermentação pode ser uma acidificação do microambiente das células e uma aderência física das células bacterianas a elas mesmas e as superfícies dentárias (MÄKINEN, 2000). As bactérias do gênero *Streptococcus*, encontradas na flora bucal, são altamente cariogênicas, uma vez que, em condições ácidas, produzem uma grande quantidade de ácido lático e sintetizam polissacarídeos insolúveis extracelularmente, que aumentam a adesão da placa bacteriana na superfície dos dentes (KANDELMAN, 1997).

A anticariogenicidade, uma das propriedades mais relevantes do xilitol, é determinada principalmente pela sua não-fermentabilidade por bactérias do gênero

Streptococcus, cuja proliferação na flora bucal torna-se então limitada (KONIG, 2000). Com a redução da concentração de *Streptococcus mutans*, diminui a quantidade de polissacarídeos insolúveis e aumenta a de polissacarídeos solúveis, o que resulta em uma placa menos aderente e de fácil remoção pela escovação habitual dos dentes (GALES; NGUYEN, 2000).

A salivagem é estimulada pelo agradável sabor do xilitol e, uma vez aumentada a quantidade de saliva, aumenta-se também a quantidade dos minerais nela presentes. Alguns desses minerais (em particular íons cálcio e fosfato) promovem a remineralização dos dentes e, conseqüentemente, a reversão das cáries em estágio inicial (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

Além de *S. mutans*, estudos mostram a eficácia da utilização de xilitol contra outros micro-organismos prejudiciais à saúde bucal, como: *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (TAPIAINEN *et al.*, 2004), *Escherichia coli* ATCC 8739 e cepas de *E. coli* enteropatogênica (SILVA *et al.*, 2011), *Staphylococcus aureus* (AKIYAMA *et al.*, 2002; MITIĆ-ĆULAFIĆ *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (AMMONS *et al.*, 2011) e *Burkholderia cepacia* (SAJJAN *et al.*, 2004), citadas por Albuquerque (2014).

3.1.2.3 Aplicações na medicina

Pesquisas com animais e humanos demonstram que o xilitol, além de poder ser utilizado como um ingrediente alimentício e no tratamento de cáries, possui várias aplicações clínicas, sendo indicado para tratar diabetes, lesões renais e parenterais, bem como para prevenir otite, infecções pulmonares e osteoporose, dentre outras (MUSSATTO e ROBERTO, 2002).

O xilitol possui um índice glicêmico (IG) significativamente mais baixo (IG de 13) se comparado com a sacarose (IG de 65) e glicose (IG de 100) e ver-se um aumento no interesse pela possibilidade desse açúcar em combater a diabete hiperglicêmica (ROVNER; NANSEL; GELLAR, 2009). O uso de carboidratos rapidamente absorvidos, como sacarose, é contraindicado para diabéticos, o que faz do xilitol um bom adoçante para diabéticos. Como é um açúcar lentamente absorvido, não provoca mudanças rápidas na concentração de glicose no sangue (YLIKAHRI, 1979; BASSLER; HEESSEN, 1963).

Pacientes em estados pós-operatórios ou pós-traumáticos apresentam uma excreção excessiva dos hormônios do “stress” (cortisol e hormônios do crescimento entre outros), os quais provocam resistência à absorção da insulina e impedem a utilização eficiente da glicose pelo organismo (MUSSATTO e ROBERTO, 2002). Segundo Ylikahri (1979), o tratamento de tais pessoas com xilitol produz apenas aumento limitado dos níveis de glicose e insulina no sangue, beneficiando-lhes a saúde.

Otite média aguda é o principal motivo para visitas médicas e prescrições de antibióticos em crianças. Os tratamentos (terapia antimicrobiana e cirurgia) às vezes têm eficácia questionável, riscos e custos elevados. Uma medida preventiva potencial a otite média aguda é o uso de xilitol, que é capaz de reduzir a adesão de *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* às células nasofaríngeas (AZARPAZHOOH; LAWRENCE; SHAH, 2016).

O xilitol, quando aplicado às vias aéreas como agente iso-osmolar, pode potencialmente reduzir a concentração de sal das vias aéreas e, portanto, reduzir a colonização bacteriana, além de aumentar o volume de líquido na superfície da via aérea. Assim, o xilitol nebulizado pode ser testado para prevenção e tratamento da colonização das vias aéreas (DURAIRAJ *et al.*, 2007).

O xilitol também combate a osteoporose estimulando a absorção de cálcio pelo intestino e facilitando sua passagem do sangue para os ossos. O conteúdo de cálcio nos ossos é, assim, aumentado, diminuindo a necessidade de reabsorção, levando a um aumento no volume ósseo e conteúdo mineral (MATTILA *et al.*, 2005).

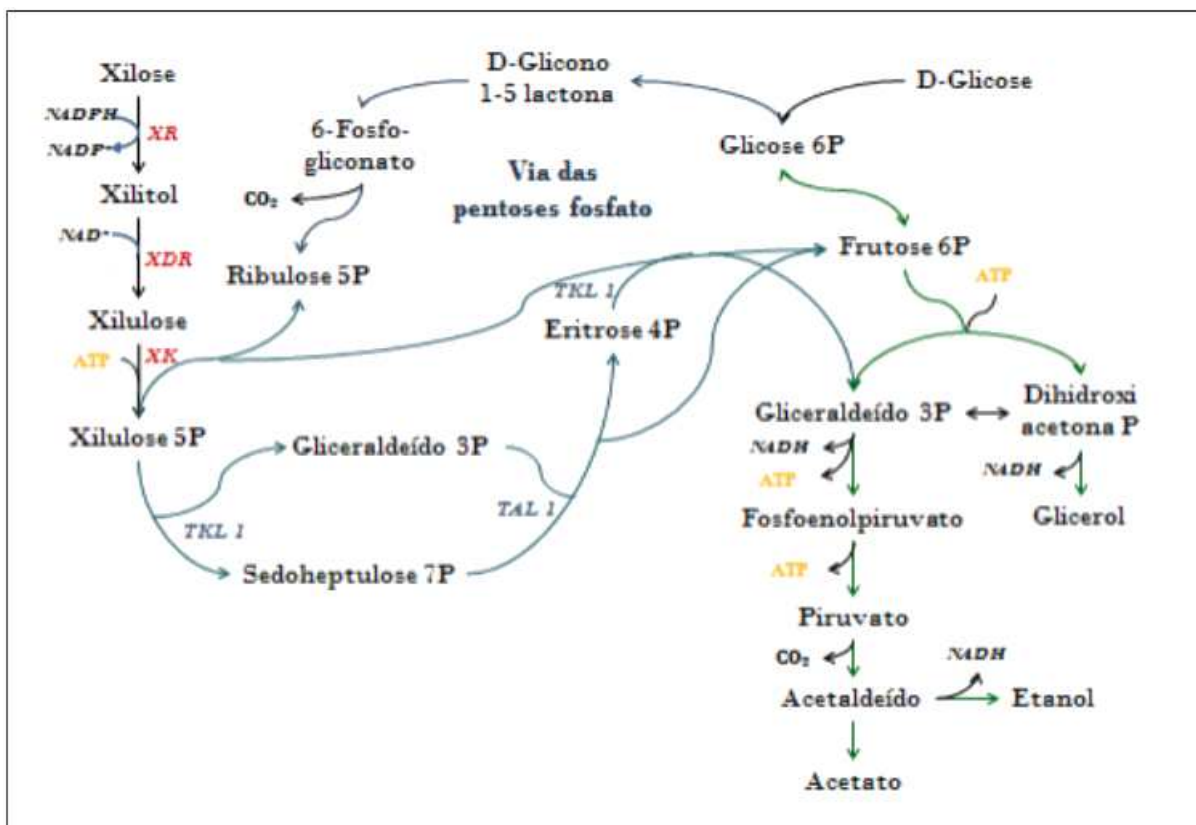
3.1.3 Rota bioquímica

O xilitol é derivado da redução de D-xilose (uma aldose) (MÄKINEN, 2000), que é o segundo carboidrato mais abundante na natureza. A rota bioquímica para o metabolismo da xilose é a via da pentose fosfato (VPF) (JEFFRIES, 2006).

A via da pentose fosfato tem duas fases. A fase oxidativa converte a hexose, D-glicose 6P, para pentose, D-ribulose 5P, mais CO₂ e NADPH. A fase não-oxidativa converte D-ribulose 5P em D-ribose 5P, D-xilulose 5P, D-sedoheptulose 7P, D-eritrose 4P, D-frutose 6P e D-gliceraldeído 3P. D-Xilose e L-arabinose entram na VPF através da D-xilulose (JEFFRIES, 2006), que através da xiluloquinase (XK) é fosforilada a xululose-5P (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014), conforme o fluxo metabólico ilustrado na Figura 2.

Através de uma redução de apenas um passo, D-xilose é convertida em xilitol pela xilose redutase (XR; EC 1.1.1.21). O xilitol resultante é secretado ou posteriormente oxidado em xilulose pela xilitol desidrogenase (XDR; EC 1.1.1.9) (GRANSTROM *et al.*, 2007).

Figura 2 - Esquema ilustrativo da via metabólica da xilose e glicose.



Fonte: Adaptado de Jeffries (2006).

A XR é uma enzima oxido-redutase, membro da família de enzimas da aldose-redutase. É no citoplasma de micróbios que assimilam a xilose que ocorre esta enzima intracelular, na qual dá início ao processo do metabolismo da xilose por reduzir a xilose a xilitol (RAFIQUL e SAKINAH, 2014).

Uma acumulação de NADH em excesso ocorre durante o crescimento de micro-organismos em xilose. Isso acontece, em parte, devido ao desbalanço entre cofator e metabólito. XR possui uma maior afinidade por NADPH do que por NADH, entretanto XDR usa apenas NAD^+ , o que leva a um acúmulo de NADH que não pode ser reciclado pela respiração em condições de oxigênio limitado. Alguns micro-organismos, como a *S. cerevisiae*, tentam compensar esse acúmulo produzindo glicerol, mas, durante a assimilação de xilose, esse processo não é suficiente, levando a um acúmulo de xilitol (JEFFRIES, 2006).

3.1.4 Métodos de obtenção

O processo de produção do xilitol pode ser realizado através de três procedimentos: o químico, através de redução química de xilose por meio de reações de hidrogenação; via

microbiológica, onde há a conversão por micro-organismos que são responsáveis em converter xilose em xilitol e a via enzimática, que vem sendo estudada para a produção de xilitol por meio da enzima xilose redutase (XR) (PAUL *et al.*, 2013; SERPA, 2016).

O xilitol também pode ser obtido a partir de fontes naturais, como vegetais, fungos ou líquens por extração sólido-líquido, mas como ele está presente em pequena proporção (menos de 900 mg em cada 100 g de matéria-prima), esse processo torna-se inviável economicamente (TAMANINI e HAULY, 2004).

3.1.4.1 Produção por via química

A produção de xilitol foi iniciada na Finlândia, durante os anos 70, após o desenvolvimento da produção em larga escala de D-xilose. Posteriormente, a redução catalítica de D-xilose para xilitol pelo uso de altas pressões e temperaturas foi atingida e, por fim, refinada como um método de produção industrial de xilitol (KUMAR *et al.*, 2009a).

Esse processo, que fornece de 50 a 60% de rendimento de xilitol, é realizado em reatores com elevadas pressões (31-40 atm) e temperaturas (100-130 °C) e tem um tempo de duração de 3 a 5 horas, dependendo das condições de temperatura e pressão empregadas (MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977).

A alta pressão facilita a solubilidade do hidrogênio no líquido a granel, favorecida pelo aumento na temperatura, para promover uma alta velocidade de hidrogenação. A temperatura regula as reações cinéticas e influencia significativamente a seletividade do produto (SU *et al.*, 2013).

Esse processo inclui cinco etapas: 1. Hidrólise ácida do material natural rico em xilana (madeira); 2. Purificação do hidrolisado até obter-se uma solução de xilose pura; 3. Hidrogenação catalítica da xilose pura a xilitol, com um catalisador (liga de Ni e Al₂); 4. Purificação da solução de xilitol obtida; 5. Cristalização do xilitol (MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977).

A via química para produção de xilitol oferece altos rendimentos e eficiência de conversão. Mas sofre de grandes desvantagens pois necessita de equipamentos caros e especializados, passos de purificação intermediária extensivos, recuperação do produto, desativação catalítica e reciclo (que é complexo devido a homogeneidade da solução) com grande necessidade de energia, o torna o processo muito caro (DASGUPTA *et al.*, 2017a).

As altas temperaturas e altas pressões utilizadas, sem contar as várias etapas de purificação requeridas, tornam o processo de obtenção de xilitol muito caro e, por esse motivo,

buscam-se novas maneiras de produção que possam ser tão eficientes quanto os modos tradicionais (SANTOS *et al.*, 2008)

3.1.4.2 Produção biotecnológica

A conversão biotecnológica é principalmente realizada por biocatalisadores, envolvendo bactéria, fungo, leveduras e/ou cepas recombinantes, porém também pode ser realizada por células livres ou sistemas de enzimas imobilizadas (DASGUPTA *et al.*, 2017a).

O processo enzimático há algumas décadas vem sendo intensamente investigado e tem aumentado o interesse dos cientistas. Esse processo consiste na redução direta de xilose em xilitol por meio da enzima xilose redutase (XR) assistida pela coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) (BRANCO, SANTOS e SILVA, 2011).

A redução enzimática por enzimas livre ou a catálise por enzimas imobilizadas pode ser uma opção alternativa devido ao seu alto rendimento em escala laboratorial (PARK *et al.*, 2005). Entretanto, produção em larga escala pode não ser econômica devido ao alto requerimento de cofator, sendo o NADPH bastante intável (DASGUPTA *et al.*, 2017a).

A produção de xilitol por via microbiana tem sido amplamente estudada como uma alternativa ao processo químico, pois não precisa de extensivos passos para a purificação de xilose e é operada a baixo custo. A literatura apresenta diversas pesquisas a respeito da produção de xilitol por meio do metabolismo microbiano (TADA, KANNO e HORIUCHI, 2012). A principal vantagem encontrada no processo microbiano em relação ao químico é o seu custo mais baixo por não necessitar de uma extensa purificação da xilose (SERPA, 2016).

Micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos possuem a capacidade de fermentar xilose comercial ou xilose presente no hidrolisado derivado de resíduos lignocelulósicos para xilitol (RAO *et al.*, 2016). Biotecnologicamente utilizam-se diversos micro-organismos, incluindo fungos filamentosos e bactérias, sendo as leveduras (ou suas enzimas isoladas) objetos principais das pesquisas atuais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

Em muitos casos, sob condições microaeróbicas, leveduras são capazes de transformar resíduos contendo D-xilose em etanol ou xilitol. Essa produção varia de acordo com o micro-organismo em questão, sugerindo uma regulação de vários fatores (YABLOCHKOVA; BOLOTNIKOVA; MIKHAILOVA, 2003).

No Quadro 1 algumas outras vantagens e desvantagens dos processos de produção do xilitol são apresentadas.

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens dos processos de produção do xilitol por vias química, microbiológica e enzimática

Processo	Vantagens	Desvantagens
Químico	Otimizado Maior produtividade	Alto custo Uso de recursos naturais (madeira)
Microbiológico	Menor custo Sustentável Maior eficiência	Baixa produtividade
Enzimático	Sustentável Máxima eficiência Maior produtividade	Alto custo

Fonte: Branco (2010)

3.2 Bagaço de caju como matéria-prima

3.2.2 Biomassa lignocelulósica

Em busca de baratear mais ainda o processo e, além disso, encontrar soluções para reaproveitamento de resíduos agroindustriais, o potencial de utilização de matérias primas renováveis vem sendo avaliado (ALBUQUERQUE, 2014).

A utilização de materiais lignocelulósicos para a produção de bioprodutos de alto valor é promissora, pois estes representam uma fonte abundante e renovável de fontes de carbono. Materiais lignocelulósicos, como sabugo de milho, palha de arroz, bagaço de cana, bagaço de caju, pó de madeira, casca de aveia, dentre outros, representam importantes e baratas fontes de substratos microbianos (ZOU *et al.*, 2010). Esses resíduos, por sua vez, podem ser hidrolisados, em geral por ácidos diluídos, e liberar D-xilose disponível para conversão microbiana em xilitol (WEI *et al.*, 2010).

Neste contexto, os materiais lignocelulósicos são considerados como perspectiva para aplicação em bioprocessos. Há grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos sendo acumulados anualmente, decorrentes da produção agrícola, entre outros fatores que operam esses recursos naturais. O grande acúmulo desses resíduos desencadeia uma série de problemas. Há um desequilíbrio do meio ambiente, ocasionado pela decomposição desse material, além do fator econômico devido à degradação desses resíduos proporcionar a perda de potenciais recursos energéticos (MICHEL, 2007)

A maior parte do constituinte de biomassa terrestre é a lignocelulose, correspondendo a cerca da metade do material vegetal que se produz pela fotossíntese, o que representa o mais abundante recurso orgânico no solo (PÉREZ *et al.*, 2002). De maneira geral, os materiais lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, definindo a estrutura da maioria dos vegetais onde se encontram associados em uma complexa estrutura. De acordo com a natureza dos vegetais, há uma variação na composição desses constituintes. Além destes compostos, proteínas, gorduras e cinzas também fazem parte de uma fração do material lignocelulósico (CORREIA, 2013).

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose (KESHWANI, 2009). Há vários métodos de pré-tratamento que destroem as paredes celulares expondo os polímeros de açúcares. Na hidrólise ácida da celulose, por exemplo, a celulose é hidrolisada, gerando-se glicose, que pode ser usado para posterior produção de diversos produtos com valor agregado, por exemplo, etanol (ROCHA *et al.*, 2011).

Já a hemicelulose é considerada um heteropolímero menor que a celulose, possuindo ramificações com diversos carboidratos como a arabinose, xilose, galactose, manose, além de ácidos urônicos (STAMBUK *et al.*, 2008). Com a técnica da hidrólise ácida diluída, há a liberação das hexoses (manose, galactose e outros) e pentoses (xilose e arabinose) constituintes da hemicelulose. Sendo a xilose considerada como o segundo açúcar mais abundante na biosfera, os hidrolisados obtidos por essa técnica acabam se caracterizando por apresentarem a xilose como componente majoritário (MICHEL, 2007).

O Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas, florestais e resíduos. Dentre os resíduos, pode-se citar o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo, a casca de aveia, as aparas de madeira e o bagaço de caju (MORAES *et al.*, 2014; TAMANINI e HAULY, 2004). Diferentes estudos são reportados na literatura em relação a utilização de resíduos lignocelulósicos para a produção de xilitol, como mostrado no Quadro 2. Isso coloca o Brasil numa situação favorável a utilização desses diversos resíduos agroindustriais para produção de produtos com valor agregado, como no caso do xilitol (ALBUQUERQUE, 2014).

Quadro 2 - Materiais lignocelulósicos utilizados em estudos para produção de xilitol.

Tipos de Substratos Lignocelulósicos	Referências
Palha de colza	López-linares <i>et al.</i> (2018)
Palha, espiga e casca de milho	Irmak <i>et al.</i> (2017)
Palha de sorgo	Dhar, Wendisch e Nampoothiri (2016)
Bagaço de caju	Albuquerque <i>et al.</i> (2015)
Colmo de bambu	Miura <i>et al.</i> (2013)
Resíduos de poda de oliveira	Mateo <i>et al.</i> (2013)
Caules de girassol	Martínez, Sáncheza e Bravo (2012)
Resíduos hortícolas	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Serragem de madeira	Rafiqul e Sakinah (2012)
Farelo de arroz	EL-Baz, Shetaia, e Elkhoulí (2011)
Palha de centeio	Franceschin <i>et al.</i> (2011)
Palha de trigo	Zhuang <i>et al.</i> (2011)
Resíduos de videira	Diéguez <i>et al.</i> (2011)
Bagaço de cana	Arruda <i>et al.</i> (2010)
Gramma hidrolisada	West (2009)
Resíduos da madeira	Ko <i>et al.</i> (2008)
Resíduos de grãos de cervejaria	Carvalho <i>et al.</i> (2007)

Fonte: Adaptado de Albuquerque (2014)

Dentro deste contexto, a produção de xilitol através do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju, torna-se uma alternativa economicamente viável para esse processo produtivo (SERPA, 2016).

3.2.3 Caju

O cajueiro, que possui nome científico *Anacardium occidentale L.*, pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma árvore de troncos tortuosos originária do norte e nordeste brasileiro (ROCHA, 2010). A Região Nordeste do Brasil é considerada a maior produtora do caju, com mais de 95 % da produção nacional, tendo como principais produtores os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia e Piauí (SOUZA, 2002).

O maior aproveitamento industrial do caju tem como principal objetivo a colheita da castanha, que é o verdadeiro fruto do caju, de onde é extraída a amêndoa. Apesar da tentativa

de utilização do pedúnculo (pseudofruto), seja através de doces, farinhas, sucos e fermentados, apenas 15 % de sua produção é aproveitada (PINHO, 2009).

O bagaço do caju (BC), que é um subproduto da extração do suco do pseudofruto, representa aproximadamente 20% do peso total do pedúnculo, sendo uma das maiores fontes de resíduos agroindustrial do setor (SANTOS *et al.*, 2007). A utilização desse subproduto tem sido restrito a complementação nutricional para ração animal (RODRIGUES *et al.*, 2011), existindo, portanto, a necessidade da realização de pesquisas que possam ampliar esse uso para a produção de produtos de valor agregado, como etanol ou xilitol (ROCHA *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). Portanto, podemos afirmar que o BC, composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, uma biomassa lignocelulósica, representa uma importante fonte de matéria-prima renovável de baixo custo e grande abundância (BRIONES, SERRANO e LABIDI, 2012).

De acordo com Serpa (2016), o bagaço de caju *in natura* é composto de 19,23 % de celulose, 17,17 % de hemicelulose, 34,77 % de lignina total, 6,52 % de extraíveis (ceras e gorduras), 4,68 % de cinzas e 2,76 % de umidade. Sendo essa fração hemicelulósica facilmente hidrolisada por ácido diluído, produzindo hidrolisado hemicelulósico (HBC), rico em xilose, que pode ser utilizado como um substrato potencial para o crescimento microbiano. O uso de HBC como uma fonte de carbono para o crescimento de micro-organismo tem grandes vantagens, como a redução do uso de xilose comercial (SERPA, 2016). Esse fracionamento do material hemicelulósico é o primeiro passo para que a xilose possa estar disponível para sua aplicação biotecnológica, como a conversão microbiana (ALBUQUERQUE, 2014).

A utilização do bagaço de caju como matéria-prima para a produção de bioprodutos já é alvo de estudos. Algumas de suas aplicações são: produção de etanol (ROCHA *et al.*, 2009; CORREIA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2011), produção da enzima tanase (RODRIGUES *et al.*, 2008) e produção de xilitol (Albuquerque *et al.*, 2014).

3.3 Micro-organismos produtores de xilitol

O processo microbiológico utiliza bactérias, fungos e leveduras para produzir xilitol a partir de xilose pura ou de um hidrolisado hemicelulósico. Entretanto, a produção de xilitol a partir de bactérias e fungos é bem menos estudada quando em comparação com o uso de leveduras (RAFIQUL; SAKINAH, 2013). A Tabela 2 apresenta alguns micro-organismos capazes de produzir xilitol.

O metabolismo da xilose em bactérias se inicia com a conversão, mediada por xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5), da xilose em xilulose, prosseguindo até a via da pentose fosfato para que ocorra a manutenção e o crescimento celular, ignorando a via de produção de xilitol devido à ausência de XR e XDR (DASGUPTA *et al.*, 2017a).

Tabela 2 – Micro-organismos produtores de xilitol

Micro-organismo	Referência
Gênero	
Bactérias	
<i>Enterobacter liquefaciens</i> 553	Yoshitake <i>et al.</i> (1973)
<i>Corynebacterium</i> sp. B-4247	Rangaswamy e Agblevor (2002)
Fungos	
<i>Penicillium crustosom</i> CCT 4034	Sampaio <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus niger</i> PY11	Kang <i>et al.</i> (2016)
Leveduras	
<i>Candida tropicalis</i> IF0 0618	Horitsu <i>et al.</i> (1992)
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7221	Kim <i>et al.</i> (2004)
<i>Candida</i> sp. 559-9	Ikeuchi <i>et al.</i> (1999)
<i>Pichia</i> sp.	Rao <i>et al.</i> (2007)
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	Neeru <i>et al.</i> (2013)
<i>Debaromyces hansenii</i> UFV-170	Sampaio <i>et al.</i> (2004)
<i>Debaromyces nepalensis</i> NCYC 3413	Kumdam <i>et al.</i> (2012)
<i>Hansunela anomala</i> NCAIM Y.01499	Mareczky <i>et al.</i> (2015)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IMB2	Mueller <i>et al.</i> (2011)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCA510	Albuquerque <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Adaptado de Dasgupta (2017a)

Estudos apontam que algumas bactérias, como *Enterobacter liquefaciens* (YOSHITAKE *et al.*, 1973), *Corynebacterium* sp. (RANGASWAMY; AGBLEVOR, 2002), *Mycobacterium smegmatis* (IZUMORI; TUZAKI, 1988) e *Gluconobacter oxydans* (SUZUKI *et al.*, 2002) produzem xilitol em pequenas quantidades.

Yoshitake *et al.* (1973) mostraram que uma cepa *Enterobacter* cresceu em D-xilose e produziu xilitol extracelularmente. A produção de xilitol pela estirpe ocorreu por uma XR dependente de NADPH, provando que a conversão enzimática não se limitava a fungos e leveduras. No entanto, as bactérias capazes de fermentar xilose não atraem o interesse dos pesquisadores devido à quantidade relativamente baixa de xilitol produzido (RAFIQUL; SAKINAH, 2013).

Nos estudos sobre produção de xilitol, os fungos filamentosos *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Neurospora* sp. demonstraram produzir pequenas quantidades de xilitol em meio contendo xilose (CHIANG; KNIGHT, 1960). Ressalta-se, entretanto, que estudos com fungos filamentosos para produção de xilitol são escassos na literatura.

As leveduras são mais indicadas para a fermentação de xilitol, principalmente por causa das suas altas taxas de assimilação de pentose e à produtividade de xilitol, que ocorre devido a níveis de expressão estáveis de XR e XDR (AHMAD, SHIM E KIM, 2013).

Dentre os gêneros capazes de produzir xilitol, *Candida* sp. é um dos mais extensivamente estudados e se mostra um micro-organismo promissor no que concerne a produção de xilitol (AHMAD, SHIM E KIM, 2013).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é vantajosa para fermentações a alta densidade e fermentações de açúcares 5C e 6C a altas temperaturas, além de serem relatadas por produzir 0,4-0,6 g/g de xilitol. Além de produzir etanol em alta temperatura, também está sendo pesquisada como produtora de xilitol devido à sua capacidade natural de assimilar xilose (MUELLER; WILKINS; BANAT, 2011).

A característica de termotolerância dessa levedura faz com que ela se destaque nos estudos fermentativos em relação a outros micro-organismos, pois além das suas reações enzimáticas serem aceleradas, diminui-se o risco de contaminação por outros micro-organismos (NONKLANG *et al.*, 2008).

3.4 Parâmetros da fermentação que influenciam a produção de xilitol

Os micro-organismos são muito afetados pelo estado físico e químico de seus ambientes, e quatro fatores controlam o crescimento de maneira relevante: temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio (MADIGAN *et al.*, 2015).

A bioprodução de xilitol por leveduras, adicionalmente, geralmente, também é influenciada pelas condições de processo (pH, temperatura, aeração, condições do reator e

concentração do inóculo), pela composição nutricional (fonte de carbono, fonte de nitrogênio e micronutrientes e suas concentrações) e pela natureza genética das cepas microbianas (isolados de tipo selvagem, cepas recombinantes e mutantes) (RAFIQUL; SAKINAH, 2013).

O estudo das condições ambientais ótimas para o crescimento de leveduras para produção biotecnológica de xilitol estão abordados a seguir.

3.4.1 *Temperatura*

As temperaturas mínimas e máximas que influenciam o crescimento microbiano variam muito entre os diferentes organismos e, geralmente, refletem a faixa de temperatura e a temperatura média dos ambientes nos quais os organismos habitam (MADIGAN *et al.*, 2015).

A temperatura afeta os micro-organismos em duas formas opostas. À medida que as temperaturas aumentam, a taxa de reações enzimáticas aumenta e o crescimento se torna mais rápido. No entanto, acima de uma certa temperatura, as proteínas ou outros componentes celulares podem ser desnaturados ou de outra forma irreversivelmente danificados (MADIGAN *et al.*, 2015).

Para a produção biotecnológica de xilitol, a maioria das leveduras crescem de 30 °C a 37 °C. No entanto, algumas leveduras termotolerantes possuem uma temperatura ótima mais elevada (entre 40 e 45 °C) por causa da aceleração de suas enzimas a alta temperatura (RAO *et al.*, 2016).

Rodrussamee *et al.* (2011), por exemplo, estudaram o potencial de *K. marxianus* DMKU3-1042 para produção de etanol e xilitol em diferentes temperaturas (30, 40 e 45 °C) utilizando açúcares presentes em hemicelulose hidrolisada como fonte de carbono. O crescimento celular e o consumo de açúcares foram observados para todas as temperaturas estudadas, indicando que a cepa pode crescer em temperaturas consideradas mais altas. Porém, o crescimento celular, mesmo não cessando, teve intensidade diminuída de acordo com o aumento da temperatura. A produção de xilitol, entretanto, foi favorecida a 40 °C, onde se observou uma produção de 7,0 g.L⁻¹.

Já Wilkins *et al.* (2008) caracterizaram três cepas de *K. marxianus* (IMB2, IMB3 e IMB4), isoladas de uma destilaria indiana, pelo crescimento em xilose a altas temperaturas (40 e 45 °C) e em diferentes pH (4,5; 5,0 e 5,5). Observou-se que a temperatura de 40 °C, em pH 5,5, foi melhor para o rendimento de xilitol. Enquanto Kumar *et al.* (2009b) observaram que a *Kluyveromyces* sp. IPE453 obteve temperatura ótima de crescimento a 50 °C, em pH 5,0.

3.4.2 *Aeração*

A aeração é vista como um dos principais fatores experimentais para produção de xilitol, sendo a quantidade de fornecimento de oxigênio que determina se D-xilose será fermentada ou entrará no ciclo respiratório, regulando o equilíbrio do consumo de carbono para bioconversão e crescimento (EL-BAZ, SHETAIA, e ELKHOULI, 2011).

As leveduras não formam um grupo homogêneo em relação ao seu rendimento energético. O destino do piruvato, produto final da via glicolítica, determina o tipo de metabolismo. Quando todo piruvato produzido é convertido pela via dos ácidos tricarbóxicos (respiração), ocorre o metabolismo oxidativo. Quando o piruvato é reduzido a etanol ou outros compostos, ocorre metabolismo oxirredutivo (fermentação), sendo que as duas vias podem ocorrer simultaneamente (GONZÁLEZ-SISO *et al.*, 2000).

Em eucariotos, como em leveduras e fungos filamentosos, D-xilose é convertida em D-xilulose por meio de redução e oxidação, que são catalisadas por xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDR). O principal fator limitante nesse processo é o desequilíbrio redox, que é causado pela diferença na preferência de coenzimas de XR (NADPH) e XDR (NAD⁺). Esse desequilíbrio redox é a razão chave para a atividade pela qual a levedura acumula xilitol durante o cultivo anaeróbio (ZHANG *et al.*, 2012).

Portanto, é evidente que as leveduras requerem baixa oxigenação do meio de cultivo para a redução de D-xilose (EL-BAZ, SHETAIA, e ELKHOULI, 2011), pois, sob condições limitadas de oxigênio, a fosforilação oxidativa não consegue reoxidar todos os NADH gerados. Assim, a concentração intracelular de NADH aumenta e resulta na acumulação de xilitol (ALBUQUERQUE, 2014).

3.4.3 *Potencial Hidrogeniônico (pH)*

Em analogia com a faixa de temperatura, cada micro-organismo possui uma faixa de pH, tipicamente com cerca de 2-3 unidades de pH, dentro das quais o crescimento é possível. Além disso, cada organismo demonstra um pH ótimo bem definido, onde o melhor crescimento ocorre. A maioria dos ambientes naturais tem um pH entre 3 e 9, e os micro-organismos com pH ótimo de crescimento nesta faixa são mais comuns (MADIGAN *et al.*, 2015).

A determinação do efeito do pH na redução de xilose por XR foi considerada potencialmente valiosa devido à ionização dependente do pH dos grupos envolvidos na ligação

ao substrato e na catálise (NIDETZKY *et al.*, 2003). Yokoyama *et al.* (1995) relataram que o pH ideal para a redução da D-xilose por XR purificado de *Candida tropicalis* foi de 6,0.

Já em estudos sobre processos microbiológicos para produção de xilitol, o pH ideal de produção para *Kluyveromyces* sp. IIPE453 (KUMAR *et al.*, 2009b) e *K. marxianus* IMB4 (WILKINS *et al.*, 2008) foi determinado como sendo 5,0 e 5,5, respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 *Micro-organismo*

A levedura utilizada no presente estudo foi a *Kluyveromyces marxianus* ATCC (*American Typical Culture Collection*) 36907, adquirida do banco de cultura da Fundação André Tosello com recursos de projeto.

4.1.2 *Bagaço de caju*

O bagaço foi obtido a partir do processamento do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale L.*) para extração do suco e gentilmente fornecido pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia[®], localizada no estado do Ceará, Brasil.

4.2 Métodos

4.2.1 *Preparação e hidrólise ácida do bagaço de caju*

O bagaço de caju (BC) foi primeiramente lavado por três vezes em água corrente e, em seguida, seco à 60 °C por 24 horas em estufa (Tecnal – TE 394/1). O BC foi, então, triturado e padronizado por peneiramento, selecionando-se as partículas de 0,25 mm a 0,84 mm.

O bagaço já triturado e peneirado foi, posteriormente, submetido a uma hidrólise ácida com H₂SO₄ 0,6 mol.L⁻¹ (20 % m/v) e posto em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 121 °C por 30 minutos. Logo após, realizou-se uma filtração à vácuo, utilizando um funil de Büchner, e o filtrado teve seu pH ajustado para 6,0 com Ca(OH)₂. Por fim, o hidrolisado foi, novamente, filtrado à vácuo para eliminação do precipitado formado.

4.2.2 *Processo de detoxificação do hidrolisado*

Após ter seu pH ajustado, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC) passou por um processo de detoxificação usando carvão ativado em grânulos de origem natural com o intuito de remover inibidores microbianos como, por exemplo, furfural, hidrometilfurfural e ácido acético. Foram adicionados 3 g de carvão ativado a cada 100 mL de

HBC (3% m/v) que, em seguida, foram mantidos a 200 rpm e 30 °C por 2 horas em um agitador orbital (Tecnal – TE 422). Por fim, o hidrolisado foi filtrado à vácuo para a retirada do carvão. O hidrolisado hemicelulósico com pH ajustado, detoxificado e suplementado foi utilizado como meio de cultivo para o processo fermentativo.

Os processos de preparação, hidrólise ácida e detoxificação do bagaço de caju foram executados de acordo com a metodologia utilizada por Albuquerque (2014) e Serpa (2016).

4.2.3 Meios de cultivo

Além do hidrolisado hemicelulósico (HBC), que representa um meio indefinido, dois meios definidos descritos previamente foram testados para o fim de comparação. Os meios utilizados foram aqueles citados por Serpa (2016) e Dasgupta *et al.* (2016). Sendo o Meio Serpa (MS) composto de 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (K₂HPO₄), 1 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) e 18,8 g.L⁻¹ de xilose. Enquanto no Meio Dasgupta (MD) foram adicionados 20 g.L⁻¹ de xilose, 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 0,15 g.L⁻¹ de fosfato dissódico (Na₂HPO₄), 0,15 g.L⁻¹ de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) e 0,06 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄). O meio de HBC, por sua vez, foi suplementado com 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (K₂HPO₄) e 1 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O). Todos os meios tiveram seu pH ajustado para 6,0 e foram esterilizados a 110 °C por 10 minutos.

4.2.4 Preparação da levedura

A levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi armazenada em meio Ágar YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) inclinado (composto por 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de dextrose e 20 g.L⁻¹ de ágar) sob refrigeração a 4 °C.

Para que ocorresse a ativação das colônias antes do uso do micro-organismo, a levedura foi transferida para um meio Ágar YEPD em placas de Petri[®] e incubadas a 30 °C por 72 horas em uma estufa bacteriológica (Marconi – MA 032). Após esse período, 3 colônias foram retiradas das placas e inoculadas em 100 mL de meio sintético composto por 5 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) e 1 g.L⁻¹ de fosfato dipotássico (K₂HPO₄), em um Erlenmeyer

de 250 mL. O inóculo foi acondicionado em um agitador orbital (Tecnal – TE 422) por 24 horas a 30 °C e agitação de 180 rpm.

4.2.5 Bioprocesso para a produção de xilitol

O processo fermentativo em batelada teve como objetivo avaliar a produção de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Como dito previamente, foram avaliados três meios de produção, sendo dois definidos (MS e MD) e um indefinido (HBC). 10 mL do inóculo preparado (10% do volume total) foram adicionados em 90 mL de meio de produção, em Erlenmeyer de 250 mL. As condições do processo avaliadas foram a temperatura e a agitação. Os cultivos foram incubados em agitador orbital (Tecnal, TE-420, SP-Brasil). Durante o processo fermentativo, o pH foi monitorado e amostras foram coletadas do meio de produção em 0, 4, 8, 24, 30 e 48 horas, para posteriormente ser analisado o teor de açúcares, a concentração de biomassa e a concentração de xilitol. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.2.5.1 Estudo da influência da temperatura

A influência da temperatura na produção de xilitol foi analisada utilizando os meios MS, MD e HBC. A temperatura foi variada nos valores de 30, 37, 40 e 45 °C. A agitação foi mantida em 150 rpm.

4.2.5.2 Estudo da influência da agitação

Partindo do estudo realizado para avaliar a influência da temperatura na produção do xilitol, com o melhor resultado destes processos foram realizados ensaios a fim de avaliar a influência das agitações de 120, 150 e 200 rpm.

4.2.6 Métodos analíticos

4.2.6.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por meio da medida da densidade ótica das amostras (DO) medida por um espectrofotômetro (Biochrom Libra S11) usando um

comprimento de onda de 600 nm. A quantificação se deu por uma curva padrão, que relaciona peso seco (g.L^{-1}) com uma função da densidade ótica.

4.2.6.2 Determinação da concentração de glicose, xilose e xilitol

As alíquotas foram filtradas em filtro de seringa de $0,22 \mu\text{m}$ e as concentrações de glicose, xilose e xilitol foram medidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou, em inglês, HPLC), utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, E.U.A.) e a coluna Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a $65 \text{ }^\circ\text{C}$, como eluente foi utilizado H_2SO_4 5 mmol.L^{-1} em água deionizada (MiliQ Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) com uma vazão de 0.5 mL.min^{-1} , utilizando um detector de índice de refração (IR) Waters. Foram injetados $20 \mu\text{L}$ de cada amostra e a concentração foi determinada pela comparação do tempo de retenção das amostras com o tempo de retenção dos padrões de glicose, xilose e xilitol.

4.2.7 Parâmetros de conversão

4.2.7.1 Concentração máxima de produto ($P_{\text{máx}}$)

A concentração máxima do produto, $P_{\text{máx}}$ (g.L^{-1}), representa o maior valor de concentração de xilitol encontrado durante o período de cultivo.

4.2.7.2 Produtividade volumétrica (Q_p)

A produtividade volumétrica do xilitol, Q_p ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), foi calculada como a razão da concentração máxima de xilitol obtida, $P_{\text{máx}}$ (g.L^{-1}), e o tempo de fermentação em que $P_{\text{máx}}$ foi obtida, t , de acordo com a Equação 1:

$$Q_p = \frac{P_{\text{máx}}}{t} \quad (1)$$

4.2.7.3 Conversão de substrato em produto

O rendimento de xilitol baseado no consumo de xilose, $Y_{P/S}$ (g.g^{-1}), pelo micro-organismo *K. marxianus* ATCC 36907 foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} \quad (2)$$

Onde:

$Y_{P/S}$: concentração de xilitol por xilose (g.g^{-1});

dP : taxa de variação na concentração de produto ao longo do tempo (g.L^{-1});

dS : taxa de variação na concentração de substrato ao longo do tempo (g.L^{-1});

4.2.7.4 Conversão de substrato em biomassa

A conversão de xilose consumida em biomassa, $Y_{X/S}$ (g.g^{-1}), foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (3)$$

Onde:

$Y_{X/S}$: concentração de biomassa por xilose (g.g^{-1});

dX : taxa de variação na concentração de biomassa ao longo do tempo (g.L^{-1});

dS : taxa de variação na concentração de substrato ao longo do tempo (g.L^{-1});

4.2.7.5 Rendimento de produto por célula

A quantidade de xilitol produzido por célula, $Y_{P/X}$ (g.g^{-1}), foi calculado como mostra a Equação 4.

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (4)$$

Onde:

$Y_{P/X}$: concentração de xilitol por biomassa (g.g^{-1});

dP : taxa de variação na concentração de produto ao longo do tempo (g.L^{-1});

dX : taxa de variação na concentração de biomassa ao longo do tempo (g.L^{-1});

4.2.7.6 Software de análise de dados

O tratamento e análise dos dados obtidos nos processos de produção de xilitol foram realizados utilizando o software OriginPro 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

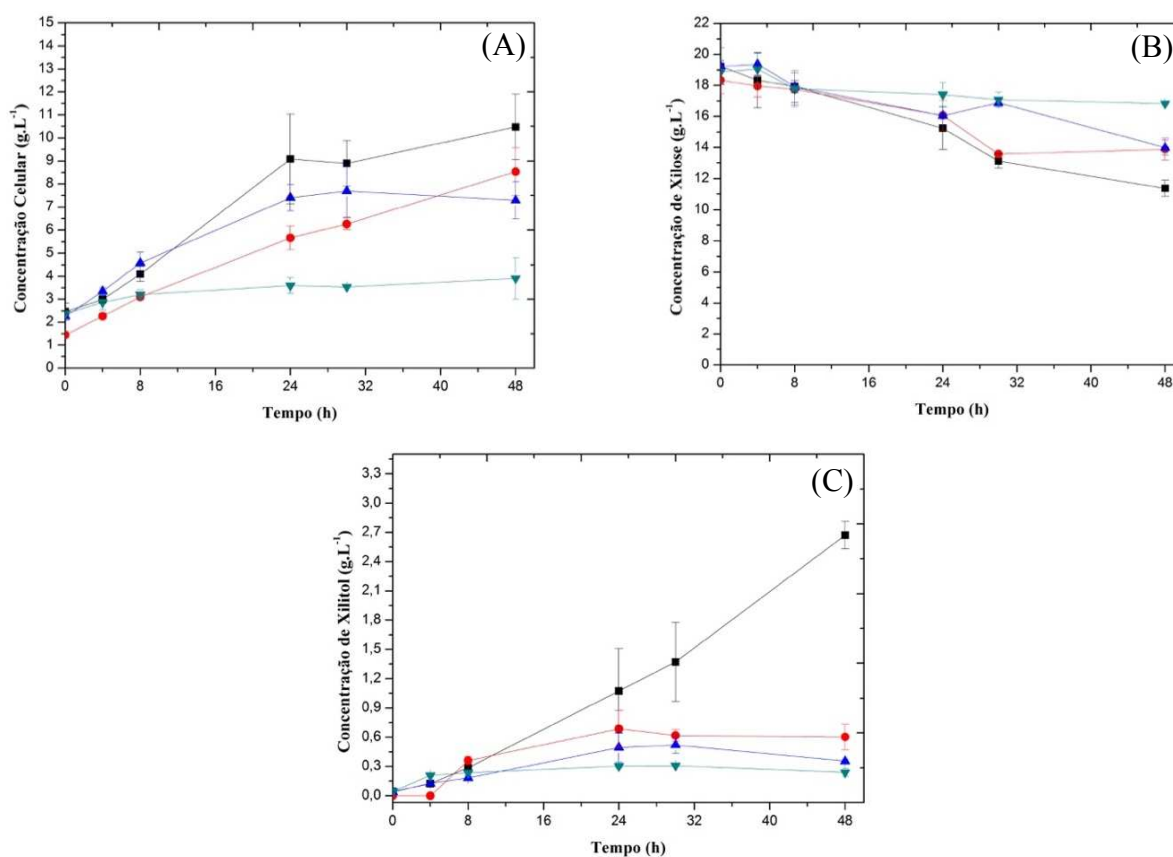
5.1 Influência da temperatura na produção de xilitol

5.1.1 Experimentos utilizando o meio Dasgupta (MD)

Avaliou-se a influência da temperatura na produção de xilitol pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907 utilizando o meio Dasgupta (MD). O perfil de crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol, levando-se em consideração as diferentes temperaturas, estão apresentados na Figura 3.

O maior crescimento celular foi obtido na temperatura de 30 °C, com concentração celular de $10,5 \pm 1,42 \text{ g.L}^{-1}$. O crescimento microbiano diminuiu com o aumento da temperatura, obtendo $8,5 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1}$, $7,8 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,9 \pm 0,9 \text{ g.L}^{-1}$ a 37 °C, 40 °C e 45 °C, respectivamente.

Figura 3 – Efeito da temperatura sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Dasgupta (MD). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.



Legenda: (■) 30 °C; (●) 37 °C; (▲) 40 °C e (▼) 45 °C.

Fonte: Autoria própria

O decréscimo no crescimento a medida que se aumenta a temperatura pode estar diretamente relacionado com a temperatura ideal de funcionamento das enzimas envolvidas nas rotas ligadas ao crescimento quando em meio contendo xilose e sulfato de amônio. Visto que o maior crescimento ocorre a 30 °C, podemos inferir que essas enzimas trabalham melhor a essa temperatura e tende a perder suas atividades à medida que se distancia da temperatura ideal.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 consumiu xilose em todas as temperaturas avaliadas, entretanto este consumo não foi de forma acentuada, sendo a menor concentração final de $11,4 \pm 0,51 \text{ g.L}^{-1}$, representando um consumo total de apenas $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose durante as 48 horas de processo para esta temperatura. O maior consumo de xilose ocorreu durante o processo a 30°C, o mesmo em que se atingiu a maior concentração de biomassa.

Corroborando com o maior consumo de xilose e com o crescimento microbiano, a maior produção de xilitol ocorreu a 30 °C, atingindo uma produção de $2,7 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$, o que representa uma conversão de, aproximadamente, 35% da xilose consumida.

Um empecilho enfrentado nas fermentações utilizando o MD foi a grande variação de pH ao longo do tempo, pois, devido a falta do efeito tamponante entre os componentes do meio, ao fim do processo, o pH atingia valores entre 2,5 e 3,0, ficando assim muito ácido. Este baixo valor pode ter sido prejudicial tanto ao crescimento celular como a produção de xilitol.

O crescimento de *K. marxianus* no meio Dasgupta foi similar ao obtido por Arruda *et al.* (2010), que avaliaram a produção das enzimas XR e XDR para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto o meio utilizado era composto por 75 g.L^{-1} de xilose, concentração essa 4,4 vezes maior do que a apresentada no presente meio. Arruda *et al.* (2010) notaram uma produção máxima de biomassa celular de $10,6 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 horas de fermentação a 30 °C.

Já Dasgupta *et al.* (2016), responsáveis pela elaboração do MD, realizaram um estudo sobre a purificação, caracterização e *docking* molecular da XR de *Kluyveromyces* sp. IIPE453 e relataram uma biomassa de células secas de 4 g.L^{-1} com um rendimento de $0,18 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$ e uma produção de xilitol de aproximadamente 4 g.L^{-1} com um rendimento de $0,22 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$ após 48 horas de processos a 45 °C. Além disso, a concentração inicial de xilose (20 g.L^{-1}) foi quase completamente consumida.

Os parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção e máximo crescimento de todos os processos estão apresentados na Tabela 3. A levedura avaliada apresentou seu maior rendimento de xilitol ($Y_{P/S}$), bem como melhor produtividade, no processo

conduzido a 30 °C, sendo eles 0,33 g.g⁻¹ e 0,042 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Seu maior rendimento de massa celular ($Y_{X/S}$) foi de 1,48 g.g⁻¹ e ocorreu a 37 °C. Já o rendimento de xilitol em relação a biomassa ($Y_{P/X}$), ou seja, o quanto de xilitol foi produzido por 1 g de células, foi maior a 30 °C, onde a biomassa foi capaz de produzir a maior quantidade de produto (0,33 g.g⁻¹).

Tabela 3 – Influência da temperatura nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular no Meio Dasgupta (MD)

Parâmetros	TEMPERATURAS			
	30 °C	37 °C	40 °C	45 °C
Biomassa (g.L⁻¹)	10,47 ± 1,43	8,53 ± 1,04	7,76 ± 0,09	3,9 ± 0,90
Y_{X/S} (g.g⁻¹)	1,02	1,48	1,05	0,47
Y_{P/S} (g.g⁻¹)	0,33	0,30	0,20	0,06
Y_{P/X} (g.g⁻¹)	0,33	0,16	0,09	0,13
Q_p (g.L⁻¹.h⁻¹)	0,042	0,028	0,017	0,013
P_{máx} (g.L⁻¹)	2,67 ± 0,14	0,68 ± 0,19	0,52 ± 0,08	0,30 ± 0,001

Fonte: Autoria própria

Kumar *et al.* (2009) estudaram a produção de xilitol e etanol por uma cepa de *K. marxianus* a partir de meio contendo xilose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, alcançando-se uma biomassa de 4,30 ± 0,1 g.L⁻¹ com um rendimento de 43 ± 0,05 (% $Y_{X/S}$) em 50 horas de fermentação. Sendo esses valores inferiores aos encontrados no presente estudo.

A partir da Tabela 3, pode ser observado que na temperatura de 30 °C a concentração de xilitol foi significativamente maior do que em temperaturas maiores, visto que o consumo de substrato (xilose) durante esse processo ocorreu de forma mais acentuada, favorecendo essa maior produção. O maior crescimento celular também ocorreu a 30 °C, entretanto a diferença de crescimento nesse processo não foi tão significativa quando em relação as maiores temperaturas, demonstrando que a xilose consumida passa a ser cada vez mais direcionada para o crescimento e manutenção do micro-organismo a medida que a temperatura aumenta.

Apesar dessa diferença no comportamento das concentrações máximas ao longo da variação de temperatura, é possível perceber que a concentração de xilitol acompanha a concentração de crescimento, sempre em ordem decrescente, sugerindo que a produção de xilitol é diretamente ligada ao crescimento microbiano.

5.1.2 Experimentos utilizando o meio Serpa (MS)

Concomitante a avaliação realizada utilizando MD, foi estudado a influência da temperatura na produção de xilitol pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907 utilizando o meio Serpa (MS). O perfil de crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol, levando-se em consideração as diferentes temperaturas, estão apresentados na Figura 4.

O maior crescimento celular de *K. marxianus* ATCC 36907 utilizando o MS ocorreu no processo conduzido a 37 °C, atingindo uma concentração celular de $16,1 \pm 0,78 \text{ g.L}^{-1}$. A 30 °C houve um decréscimo no crescimento, que, após as 48 horas de cultivo, atingiu uma concentração de $12,9 \pm 1,96 \text{ g.L}^{-1}$, concentração essa ainda superior a aquela obtida utilizando o MD.

A levedura foi capaz de consumir xilose em todas as temperaturas, porém, como observado anteriormente, esse consumo não se deu de forma acentuada, restando uma concentração final mínima de $8,89 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ no processo conduzido a 37 °C, acompanhando assim o maior crescimento. Entretanto, o consumo de xilose se deu forma similar quando conduzido a 30 °C, onde a concentração final foi de $9,49 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}$. Em ambos os processos, a 37 °C e a 30 °C, foram, consumidos aproximadamente, $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose.

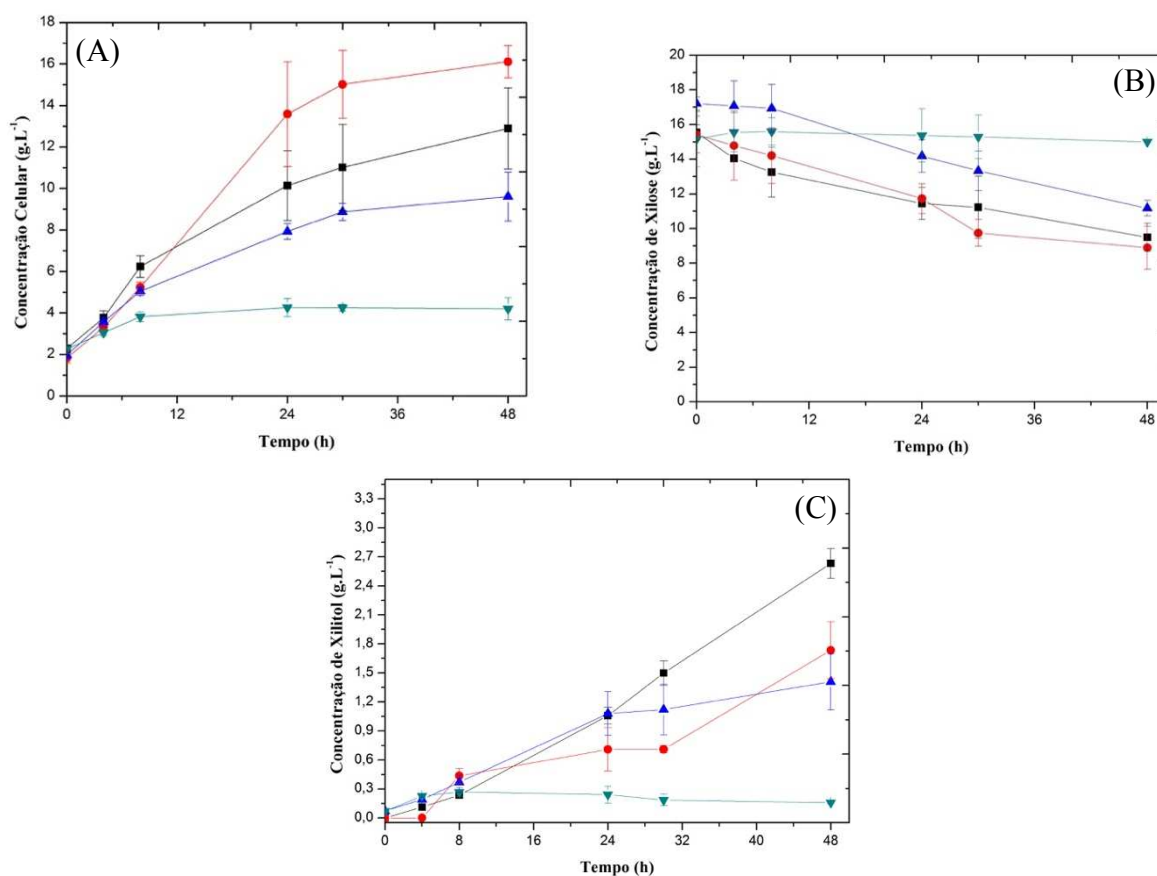
Apesar de a maior concentração de crescimento e o maior consumo de xilose terem sido a 37 °C, a maior produção de xilitol foi atingida durante o processo que ocorreu na temperatura de 30 °C, obtendo $2,63 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol. Isso indica que a xilose consumida durante esse processo foi direcionada em maior parte para a produção de xilitol, diferente do que acontece no cultivo a 37 °C, onde a xilose consumida é direcionada para a manutenção e crescimento celular ou para a produção de algum outro subproduto.

Diferente do MD, o MS possui como fonte de nitrogênio o extrato de levedura, que foi responsável por gerar uma reação de tamponamento no meio, evitando, dessa forma, as grandes variações de pH. Além disso, o extrato de levedura representa uma fonte orgânica de nitrogênio que é, por sua vez, mais benéfica do que as fontes inorgânicas de nitrogênio e apresentam maior impacto no crescimento celular e na produção de xilitol (RAO *et al.*, 2016).

Comportamento similar foi observado por Serpa (2016), responsável pela elaboração do MS, que analisou a produção de xilitol e de xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 utilizando meio sintético e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju. A levedura, quando em meio MS, apresentou melhor crescimento quando cultivada a 30 °C, apresentando uma concentração celular de $6,0 \text{ g.L}^{-1}$, entretanto a sua maior produção de xilitol foi atingida a 25 °C, produzindo uma concentração final de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Já Albuquerque (2014) avaliou o crescimento celular de *K. marxianus* CCA 510 e de *K. marxianus* ATCC 36907 em meio contendo xilose como fonte de carbono na concentração inicial de 40 g.L⁻¹, obtendo uma concentração de biomassa de 13,90 ± 0,24 g.L⁻¹ e 6,72 ± 0,32 g.L⁻¹, respectivamente, em um intervalo de tempo de 144h a 30 °C. Já a produção de xilitol foi de aproximadamente 14 g.L⁻¹ para ambas leveduras. No presente trabalho, a concentração de biomassa obtida para a *K. marxianus* ATCC 36907 foi maior do que a observada por Albuquerque (2014), entretanto a produção de xilitol foi inferior. A diferença da concentração inicial de xilose ou a presença de diferentes constituintes nos meios podem ter sido as principais causas das diferenças observadas.

Figura 4 - Efeito da temperatura sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Serpa (MS). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.



Legenda: (■) 30 °C; (●) 37 °C; (▲) 40 °C e (▼) 45 °C

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 4 estão apresentados todos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular obtidos durante os processos nas

diferentes temperaturas. A partir dos valores apresentados pode-se observar que, o cultivo conduzido a 30 °C apresentou a maior concentração de xilitol (2,63 g.L⁻¹), o que culminou no maior valor de rendimento (0,055 g.L⁻¹h⁻¹). Apesar do processo conduzido a 37 °C proporcionou o maior crescimento celular (assim como maior valor de Y_{X/S}, 2,19 g.g⁻¹) e maior consumo de xilose, sua produção de xilitol foi apenas a segunda maior (1,73 g.L⁻¹), o mesmo acontece para seu valor de rendimento (0,036 g.L⁻¹h⁻¹).

No cultivo conduzido a 45 °C observou-se o melhor Y_{P/S}, 0,56 g de xilose a cada grama de substrato consumido. Já no processo conduzido a 37 °C notou-se o menor Y_{P/X}, comprovando um maior desvio de substrato para crescimento e manutenção do micro-organismo do que para a produção do poliols.

Tabela 4 – Influência da temperatura nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular no Meio Serpa (MS).

Parâmetros	TEMPERATURAS			
	30 °C	37 °C	40 °C	45 °C
Biomassa (g.L ⁻¹)	12,89 ± 1,96	16,11 ± 0,78	9,61 ± 1,17	4,21 ± 0,53
Y_{X/S} (g.g ⁻¹)	1,75	2,19	1,27	0,87
Y_{P/S} (g.g ⁻¹)	0,43	0,26	0,22	0,56
Y_{P/X} (g.g ⁻¹)	0,25	0,12	0,17	0,13
Q_p (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	0,055	0,036	0,029	0,033
P_{máx} (g.L ⁻¹)	2,63 ± 0,15	1,73 ± 0,39	1,41 ± 0,32	0,27 ± 0,31

Fonte: Autoria própria

No meio MS, assim como ocorreu no meio MD, observou-se um comportamento decrescente nas máximas concentrações de xilitol a medida que se aumentou a temperatura. Também pode-se observar que a diferença nas concentrações de xilitol dos cultivos realizados nas temperaturas mais baixas não foi tão expressiva quanto a observada no Meio Daguspta. Entretanto, o cultivo a 45 °C parece ser limitante tanto para o crescimento de *K.marxianus* quanto para a produção de xilitol em ambos os meios. Já processos conduzidos a 30 °C parecem ser ideais para a produção de xilitol quando utilizado meios com xilose como fonte de carbono.

5.1.3 Experimentos utilizando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC)

Por fim, avaliou-se a influência da temperatura na produção do xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 no meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC), cujo perfil de crescimento celular, consumos de glicose, xilose e formação do produto estão representados pela Figura 5.

A temperatura que mais favoreceu o crescimento celular foi a de 40 °C, atingindo uma concentração celular de $21,61 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$. Ao fim de 48 horas, a fermentação conduzida a 30 °C produziu uma biomassa de $17,03 \pm 1,77 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto nos processos conduzidos a 37 °C e 45 °C, o comportamento dos crescimentos microbiano foram semelhantes, atingindo concentrações celulares respectivas de $11,65 \pm 0,87 \text{ g.L}^{-1}$ e $13,17 \pm 0,93 \text{ g.L}^{-1}$.

As concentrações de biomassa obtidas no meio HBC (Figura 5A) foram superiores em todas as condições, quando comparadas às concentrações obtidas nos meios MD e MS. Este resultado se deve à maior variedade de carboidratos iniciais, uma vez que HBC contém glicose ($14,6 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose (15 g.L^{-1}).

A levedura foi capaz de consumir toda a glicose presente no meio em até 8 horas (Figura 5B). Nas temperaturas de 40 °C e 45 °C, esse consumo foi de 100% em apenas 4 horas. Após 48 h, aproximadamente, 83% da xilose foi consumida, sendo que o menor consumo foi verificado na temperatura de 45 °C, restando no meio $4,31 \pm 1,72 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose.

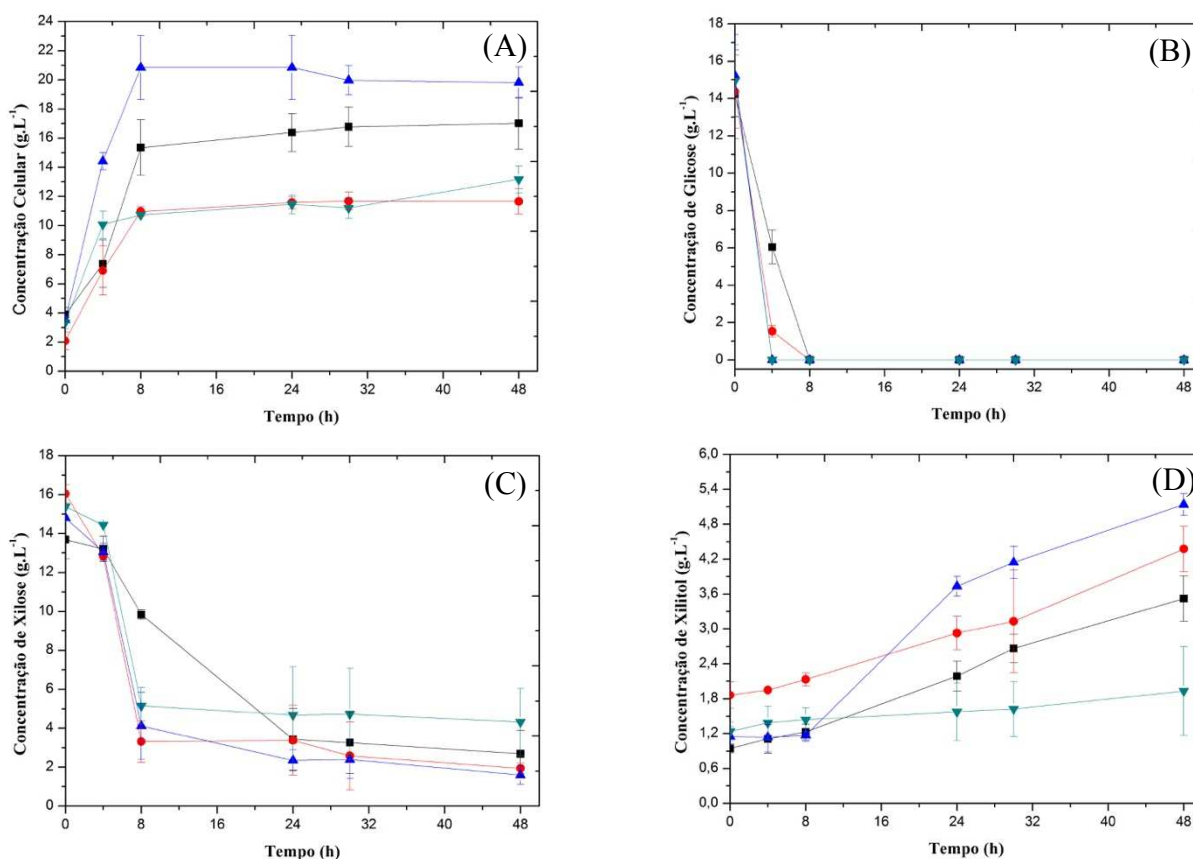
É possível observar que nas primeiras horas de processo o consumo de xilose é lento, enquanto entre 4 e 8 horas de processo, logo após o total consumo da glicose, esse consumo se torna extremamente acentuado. Evidenciando, assim, a preferência da *K. marxianus* ATCC 36907 por glicose.

A produção de xilitol atingiu uma concentração maior que 1 g.L^{-1} em todas as temperaturas, sendo 40 °C a temperatura mais propícia a essa bioprodução, visto que $5,14 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol foram produzidos durante esse processo. É interessante notar também que, apesar do processo a 37 °C apresentar a segunda maior produção de xilitol ($4,37 \pm 0,39 \text{ g.L}^{-1}$) após as 48 horas de cultivo, esse processo, e o realizado a 30 °C, produziram 2,6 g de xilitol durante a fermentação, entretanto a concentração inicial de xilitol no HBC utilizado a 37 °C era maior, levando a uma maior produção l nessa temperatura.

É possível observar, pela Figura 5D, que a formação de xilitol é acentuada após 8 horas de processo, posterior ao momento em que ocorre um maior consumo de xilose. Isso ocorre, pois, a xilose possui uma estrutura química muito similar a da glicose, podendo, assim, ativar a hexoquinase, enzima responsável por converter a glicose em glicose-6-fosfato. A glicose-6-

fosfato é, então, desviada para a VPF visando a produção de NADPH que é, por sua vez, requerido (como cofator) para a conversão de xilose em xilitol pela XR. Ao fim do consumo da glicose, o NADPH produzido é ativado, formando xilitol a partir da xilose (NELSON; COX, 2010). Podemos, dessa forma, concluir que a glicose contribui de forma positiva para o consumo da xilose e, portanto, para a produção de xilitol, devido a grande quantidade de NADPH produzido durante o desvio de glicose-6-fosfato para a VPF.

Figura 5 - Efeito da temperatura sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 150 rpm utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC). (A) crescimento celular; (B) consumo de glicose; (C) consumo de xilose e (D) produção de xilitol.



Legenda: (■) 30 °C; (●) 37 °C; (▲) 40 °C e (▼) 45 °C

Fonte: Autoria própria

Rocha *et al.* (2014) avaliaram a produção de etanol e xilitol por *Kluyveromyces marxianus* CCA 510 utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju. No processo conduzido a 30 °C, a concentração máxima de biomassa atingida foi de $11,81 \pm 0,81 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto a produção de xilitol alcançou a concentração de $6,76 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$ após 96 h de

fermentação. A glicose ($12,57 \pm 0,25 \text{ g.L}^{-1}$) foi consumida com 24 h de fermentação, enquanto a xilose ($18,59 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$) foi completamente consumida pelo micro-organismo em até 48 h de cultura. Assim como no presente trabalho, Rocha *et al.* (2014) comprovaram a preferência da *K. marxianus* por glicose em detrimento da xilose, além de apresentar uma produção de xilitol semelhante.

Misra *et al.* (2013), estudaram a produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico de milho não desintoxicado. A cepa foi capaz de produzir $7,46 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol em 48 h a partir de $21,98 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose inicial presente no hidrolisado não tratado, atingindo um rendimento de $0,37 \text{ g.g}^{-1}$. A concentração e o rendimento de xilitol obtidos no estudo conduzido por Misra *et al.* (2013) foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Na Tabela 5 estão apresentados todos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular obtidos durante os processos nas diferentes temperaturas utilizando o meio HBC. A fermentação a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou maior $Y_{X/S}$, assim como um alto valor de $Y_{P/S}$ ($1,19 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,23 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente), demonstrando que o substrato consumido pela levedura nesta condição foi dividido entre o crescimento e a produção do bioproduto. A $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ observa-se o maior rendimento de produto ($0,30 \text{ g.g}^{-1}$) e a maior produtividade ($0,107 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), justificando assim sua maior produção de xilitol. Já no cultivo conduzido a $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $Y_{X/S}$ apresentou um valor elevado, enquanto $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$ tiveram os menores valores dentre todos os cultivos, mostrando, assim, que a xilose consumida foi em grande parte direcionada para o crescimento e manutenção celular.

Tabela 5 – Influência da temperatura nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC).

Parâmetros	TEMPERATURAS			
	30 °C	37 °C	40 °C	45 °C
Biomassa (g.L^{-1})	$17,02 \pm 1,77$	$11,65 \pm 0,87$	$21,61 \pm 0,22$	$13,17 \pm 0,93$
$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})	1,19	0,21	1,08	0,89
$Y_{P/S}$ (g.g^{-1})	0,23	0,16	0,30	0,063
$Y_{P/X}$ (g.g^{-1})	0,18	0,26	0,22	0,07
Qp ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,073	0,091	0,107	0,040
Pmáx (g.L^{-1})	$3,52 \pm 0,39$	$4,37 \pm 0,39$	$5,14 \pm 0,18$	$1,93 \pm 0,76$

Fonte: Autoria própria

Albuquerque (2014) avaliou a produção de xilitol por *K. marxianus* ATCC 36907 em meio contendo xilose (40 g.L^{-1}) e glicose (20 g.L^{-1}) como fonte de carbono, além de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Os ensaios foram conduzidos a 200 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Durante esse estudo foi observado um rendimento de xilitol de $0,035 \text{ g.g}^{-1}$ e uma produtividade de $0,023 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, valores esses inferiores aos obtidos no presente estudo utilizando HBC.

Pode-se observar que, utilizando o meio HBC como fonte de substrato, a concentração celular atingida em todas as temperaturas foi satisfatória, mesmo na fermentação conduzida a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura essa que se mostrou limitante quando utilizado meios sintéticos contendo apenas xilose como substrato. Apesar do bom crescimento em todas as temperaturas, *K. marxianus* demonstrou uma preferência pelo cultivo conduzido a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Já para as concentrações de xilitol, ocorreu um comportamento crescente a medida em que se aumenta a temperatura, sendo sua produção máxima atingida a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ continuou se mostrando limitante para a produção de xilitol, assim como observado nos ensaios anteriores.

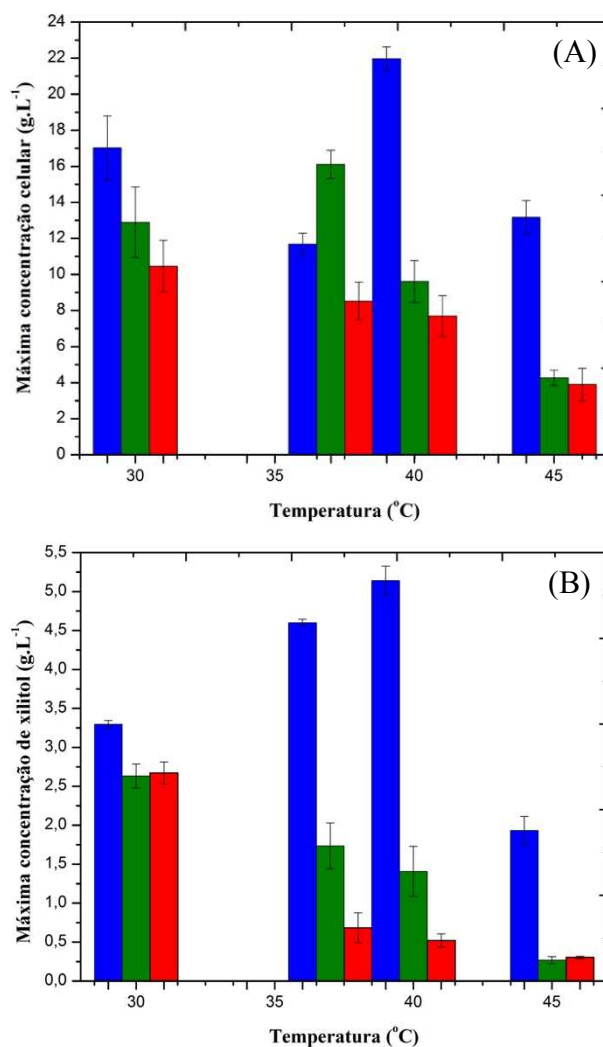
Na Figura 6 tem-se representado o comportamento das máximas concentrações celular e de xilitol nas diferentes temperaturas usadas ($30 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$) quando utilizado os três diferentes meios testados no presente trabalho (HBC, MS e MD).

Na Figura 6A, pode-se notar que as maiores concentrações celulares, em três das quatro temperaturas testadas, foram atingidas quando utilizado HBC. Esse crescimento se deve principalmente devido a presença de glicose no meio, substrato pelo qual a levedura demonstrou preferência. Apesar de apresentar um bom crescimento em todas as temperaturas, a *K.marxianus* se adaptou melhor a temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, provavelmente pelo fato das enzimas envolvidas no metabolismo da glicose funcionarem de forma mais eficiente quando nessa temperatura. Quando a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, o MS se mostrou como o mais promissor, demonstrando o maior crescimento dentre todos os meios, enquanto o meio HBC demonstrou o menor crescimento dentre todas as temperaturas. O MD apresentou os menores crescimentos em todos os bioprocessos referente ao estudo da temperatura, provavelmente, devido a alta variação de pH ao longo do processo provocada pela falta da ação tamponante do meio, algo que não ocorre no meio MS devido a presença do extrato de levedura.

Na Figura 6B, observa-se que o HBC apresentou as maiores produções de xilitol em todas as temperaturas testadas, gerando uma diferença mais significativa, para com os meios sintéticos, nas temperaturas de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Os meios sintéticos apresentaram produções semelhantes quando nas temperaturas de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$, entretanto, nas temperaturas medianas, o MS apresentou resultados relativamente melhores que o MD. As diferenças entre as

produções de MD e MS, sugerem que a variação de pH foi capaz de afetar tanto a produção de xilitol como o crescimento microbiano.

Figura 6 - Influência da temperatura no (A) crescimento celular e na (B) produção de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 usando o meio Dasgupta (MD), o meio Serpa (MS) e o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC) com os bioprocessos conduzidos a diferentes temperaturas e 150 rpm. Dados experimentais: (■) HBC; (■) MS; (■) MD.



5.2 Influência da agitação na produção de xilitol

A partir do estudo realizado sobre a influência da temperatura na produção de xilitol, foi observado que a temperatura de 40 °C se mostrou como a mais promissora para a bioprodução do açúcar quando utilizado o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como substrato, alvo de estudo do presente trabalho. Portanto, nos seguintes ensaios a temperatura de 40 °C foi fixada e estudou-se a influência da agitação na produção de xilitol.

5.2.1 Experimentos utilizando o Meio Dasgupta (MD)

Primeiramente, avaliou-se a influência da agitação na produção do xilitol pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907 no meio Dasgupta (MD). O perfil do crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol estão apresentados na Figura 7.

Dentre as três agitações estudadas, a agitação de 200 rpm, ou seja, a fermentação conduzida com uma maior aeração, foi a mais propícia para o crescimento celular, produzindo uma concentração de biomassa de $15,71 \pm 0,98 \text{ g.L}^{-1}$. As seguintes agitações com melhores crescimentos foram as de 120 rpm e 150 rpm, atingindo as concentrações celulares de $9,18 \pm 0,94 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,76 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Apesar da pequena diferença nas concentrações celulares, os perfis de crescimento para as menores agitações foram próximos.

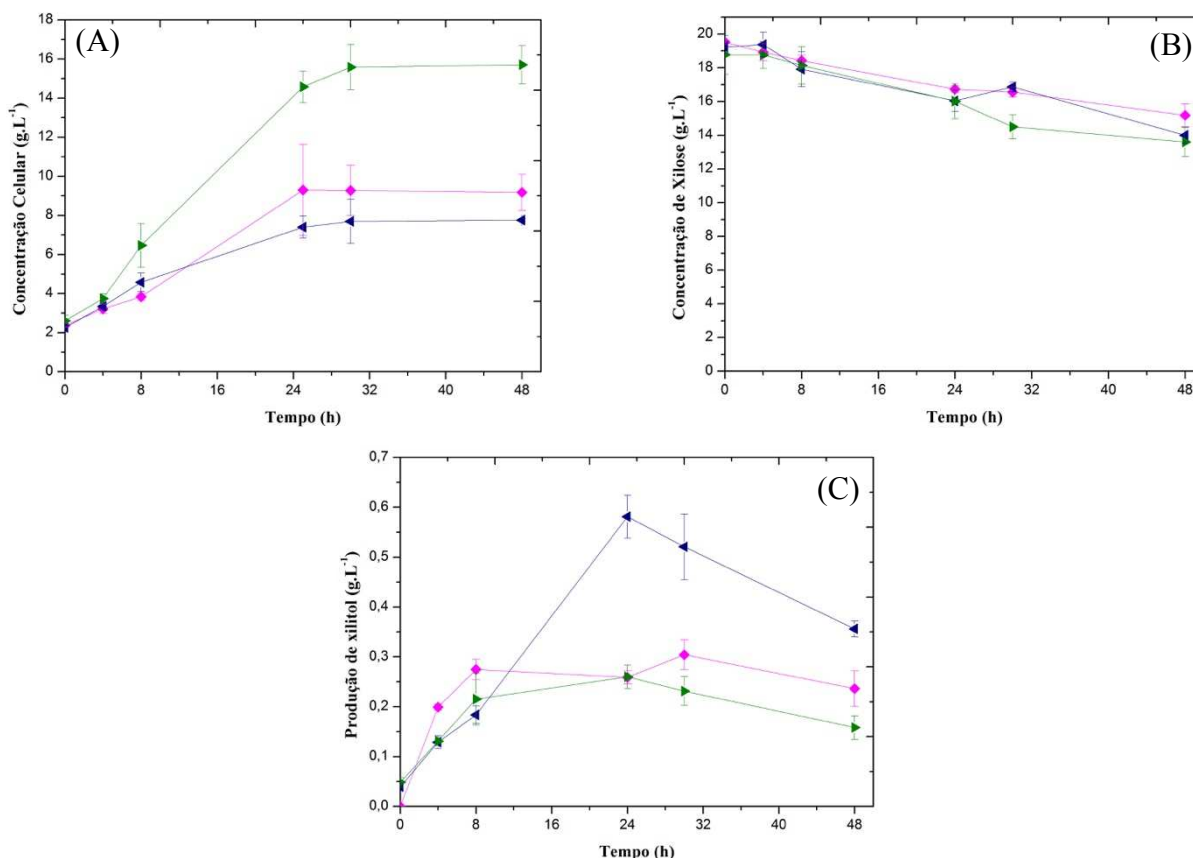
Maiores aerações favorecem maiores concentrações celulares, pois o fornecimento de oxigênio à cultura é necessário para o crescimento da levedura para que aconteça a síntese de ácidos graxos insaturados e do ergosterol necessários para o transporte de açúcar através da membrana, para que, assim, a energia necessária ao crescimento seja produzida (KURIYAMA; KOBAYASHI, 1993). Além disso, maiores agitações proporcionam um meio mais homogêneo e facilita o processo de difusão dos nutrientes, entre outros benefícios.

O consumo de xilose ocorreu de forma praticamente igual em todas as agitações. Entretanto, assim como o crescimento celular, o processo conduzido a 200 rpm também levou a um maior consumo do substrato, sendo a concentração final de $13,60 \pm 0,86 \text{ g.L}^{-1}$, levando ao metabolismo 27,5% da xilose inicial. O menor consumo ocorreu com a agitação de 120 rpm, onde somente 22,2% da xilose foi consumida ($4,34 \text{ g.L}^{-1}$).

Já a produção de xilitol foi beneficiada pela agitação de 150 rpm, levando a uma concentração máxima de $0,58 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ do bioproduto. Entretanto, a concentração final de xilitol, após 48 horas de processo, foi de $0,36 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$. Esse decréscimo na concentração de xilitol durante as horas finais do processo ocorreu para todas as agitações testadas, indicando

que uma parte do xilitol produzido pode ter sido convertida em xilulose, através da via metabólica catalisada por XDR, e posteriormente em outros metabólitos.

Figura 7 - Efeito da agitação sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Dasgupta (MD). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.



Legenda: (◆) 120 rpm; (◀) 150 rpm e (▶) 200

Fonte: Autoria própria

Vallejos *et al.* (2016) avaliaram a produção biotecnológica de xilitol por fermentação pelas leveduras *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. O meio fermentativo utilizado era composto por 30 g.L⁻¹ de xilose e 3 g.L⁻¹ de sulfato de amônio, além de outros sais. O processo foi conduzido a 30 °C e a uma agitação de 200 rpm. Após 120 h de cultivo, *C. guilliermondii* foi capaz de produzir 0,46 g.L⁻¹ de xilitol, enquanto *C. tropicalis* produziu 0,52 g.L⁻¹. Os valores de produção obtidos por Vallejos *et al.* (2016) foram próximos a aqueles apresentados neste estudo.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular obtidos durante os processos nas diferentes agitações

utilizando o MD. Quando se aumenta a agitação, uma maior quantidade de células e menos xilitol são produzidos, isto ocorre, pois, o metabolismo da levedura pode ter desviado a xilose consumida para outra via que não para a produção de xilitol. O alto valor de $Y_{X/S}$ ($2,53 \text{ g.g}^{-1}$), assim como o baixo valor de Q_p ($0,011 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), nos mostra que a maioria do substrato consumido foi redirecionado para outro fim. O mesmo fenômeno acontece durante o cultivo executado na agitação de 120 rpm. Já a 150 rpm, apesar da concentração celular menor, o rendimento de xilitol e a produtividade apresentaram seus maiores valores, $0,20 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,52 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente, justificando a maior produção de xilitol dentre as agitações.

Tabela 6 – Influência da agitação nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular utilizando o meio Dasgupta (MD).

Parâmetros	AGITAÇÕES		
	120 rpm	150 rpm	200 rpm
Biomassa (g.L^{-1})	$9,18 \pm 0,94$	$7,76 \pm 0,09$	$15,71 \pm 0,98$
$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})	2,33	1,05	2,53
$Y_{P/S}$ (g.g^{-1})	0,10	0,20	0,077
$Y_{P/X}$ (g.g^{-1})	0,04	0,09	0,04
Q_p ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,0096	0,017	0,011
$P_{\text{máx}}$ (g.L^{-1})	$0,30 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,15$

Fonte: Autoria própria

Dasgupta *et al.* (2017b) utilizaram açúcares lignocelulósicos para produzir xilitol por fermentação, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* IPE453. O processo foi conduzido utilizando um meio hidrolisado de bagaço de cana de açúcar contendo 30 g.L^{-1} de xilose e 1 g.L^{-1} de sulfato de amônio, dentre outros sais, além de ser realizado a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e com uma agitação constante de 200 rpm. A assimilação de xilose por KSIPE453 gerou $4,4 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa celular (em peso seco) com um $Y_{X/S}$ de $0,226 \pm 0,001 \text{ g.g}^{-1}$. Além do crescimento celular, observou-se a acumulação de xilitol, que chegou a produzir 3 g.L^{-1} com um $Y_{P/S} = 0,16 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$. A produtividade alcançada foi de $0,193 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. O rendimento de xilitol ($Y_{P/S}$) encontrado por Dasgupta *et al.* (2017b) foi similar a aquela encontrada para a *K. marxianus* ATCC 36907, entretanto uma maior produção de xilitol e um maior rendimento foram alcançados, provavelmente, devido a maior concentração de xilose presente no meio.

Com o auxílio da Tabela 6, pode-se notar que tanto o crescimento celular quanto a produção de xilitol são fortemente influenciados por uma agitação em específico. Ao observar

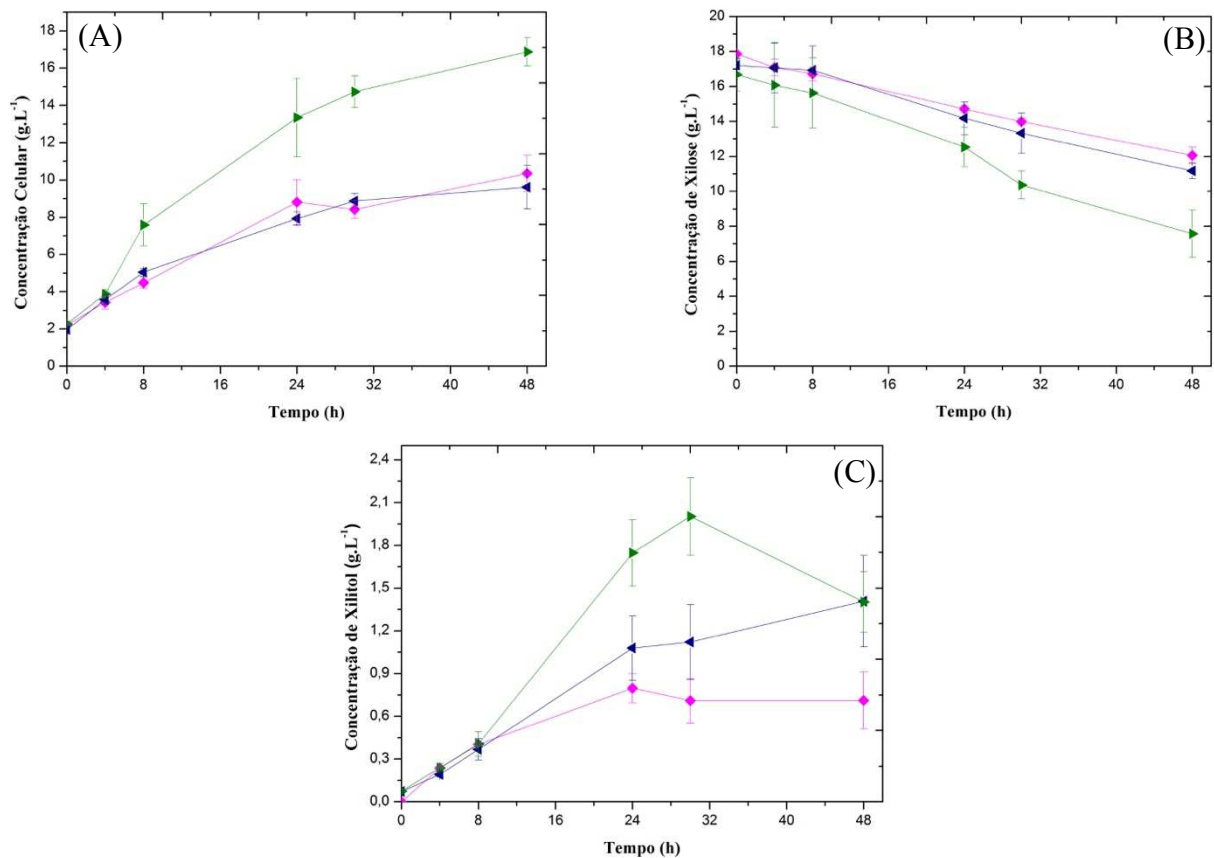
o comportamento do crescimento máximo nas diferentes agitações, é possível perceber que nos processos conduzidos a 120 rpm e 150 rpm as concentrações celulares atingidas foram praticamente iguais, se considerado o desvio padrão, enquanto a 200 rpm temos uma diferença significativa, atingindo um elevado crescimento microbiano. Comportamento similar é observado para as concentrações máximas de produção de xilitol, onde a maior concentração foi atingida a 150 rpm, enquanto nas fermentações a 120 rpm e 200 rpm as concentrações obtidas foram similares.

5.2.2 Experimentos utilizando o Meio Serpa (MS)

Utilizando o Meio Serpa, avaliou-se a influência da agitação na produção do xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 quando a 40 °C. O perfil do crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol estão apresentados na Figura 8.

Dentre todas as agitações testadas, a de 200 rpm se mostrou como a mais promissora quando utilizado o MS. Durante o processo conduzido nessa agitação foram obtidos o melhor crescimento microbiano, o maior consumo de xilose e a maior produção de xilitol. Foram produzidos $16,88 \pm 0,76 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $2,0 \pm 0,89 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol. Já a concentração final de xilose foi de $7,58 \pm 1,35 \text{ g.L}^{-1}$, representando um consumo de 54,5% da xilose presente inicialmente.

Figura 8 - Efeito da agitação sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 150 rpm utilizando meio Serpa (MS). (A) crescimento celular; (B) consumo de xilose e (C) produção de xilitol.



Legenda: (◆) 120 rpm; (◀) 150 rpm e (▶) 200

Fonte: Autoria própria

A máxima produção de xilitol foi atingida após 32 h de cultivo, apresentando uma redução ao fim do processo. Após 48 h, a concentração final de xilitol foi de $1,40 \pm 0,41 \text{ g.L}^{-1}$, concentração similar a aquela obtida durante o cultivo a 150 rpm ($1,41 \pm 0,32 \text{ g.L}^{-1}$). Esse decréscimo na concentração provavelmente ocorreu pois, em uma maior presença de oxigênio, decorrente da maior agitação, o NADH acumulado é reciclado pela respiração, gerando NAD^+ , que, por sua vez, é o cofator da enzima XDR, responsável por oxidar o xilitol em xilulose (JEFFRIES, 2006).

Os processos conduzidos a 150 rpm e 120 rpm mostraram um comportamento bastante similar tanto para o crescimento microbiano quanto para o consumo de xilose. Em ambas condições foram produzidos, aproximadamente, 10 g.L^{-1} de biomassa e consumido 6 g.L^{-1} de xilose. Entretanto, no cultivo conduzido a 150 rpm uma maior quantidade de xilitol foi produzida, gerando uma diferença de $0,61 \text{ g.L}^{-1}$ na produção.

Na Tabela 7 estão representados todos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular obtidos nos ensaios utilizando o MS. Como esperado, o cultivo conduzido a 200 rpm mostrou os melhores valores de $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e produtividade, sendo eles $1,60 \text{ g.g}^{-1}$, $0,30 \text{ g.g}^{-1}$, $0,067 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente. O processo realizado a 150 rpm, demonstrou os menores valores de $Y_{X/S}$ ($1,26 \text{ g.g}^{-1}$), $Y_{P/S}$ ($0,22 \text{ g.g}^{-1}$) e produtividade ($0,029 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), apesar de apresentar a segunda melhor produção de xilitol e o maior valor de $Y_{P/X}$ ($0,17 \text{ g.g}^{-1}$).

Tabela 7 – Influência da agitação nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular utilizando o meio Serpa (MS).

Parâmetros	TEMPERATURAS		
	120 rpm	150 rpm	200 rpm
Biomassa (g.L^{-1})	$10,35 \pm 0,98$	$9,61 \pm 1,17$	$16,88 \pm 0,76$
$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})	1,40	1,27	1,60
$Y_{P/S}$ (g.g^{-1})	0,25	0,22	0,30
$Y_{P/X}$ (g.g^{-1})	0,12	0,17	0,15
Q_p ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,033	0,029	0,067
$P_{\text{máx}}$ (g.L^{-1})	$0,78 \pm 0,1$	$1,41 \pm 0,32$	$2,0 \pm 0,27$

Fonte: Autoria Própria

Jia *et al.* (2016) avaliaram o rendimento da produção de xilitol pela levedura *C. tropicalis* CICC1779. A produção de xilitol foi realizada num meio contendo xilose com a seguinte composição: extrato de levedura ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$), peptona ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 (5 g.L^{-1}) e

MgSO₄ (0,5 g.L⁻¹). A fermentação foi conduzida em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio (pH 6,0) e 60 g de xilose pura. O agitador foi operado a 210 rpm nas 24h iniciais e a 180 rpm para as 24h seguintes. Os rendimentos de xilitol atingiram 0,84 g.L⁻¹ e uma produtividade de 3,25 g.L⁻¹h⁻¹. De acordo com os resultados obtidos por Jia *et al.* (2016), pode-se notar que os maiores crescimentos no valor de $Y_{P/S}$ e no valor da produtividade ocorrem nas primeiras 24 h de processo onde a agitação é mantida em 210 rpm. Quando essa agitação é diminuída para 180 rpm, pode-se observar uma estabilização no rendimento de xilitol e um acentuado decréscimo na produtividade. Corroborando, assim, com os resultados obtidos no presente estudo, os maiores valores foram obtidos no processo conduzido a 200 rpm.

Ao observar a Tabela 7, pode-se perceber que apenas a maior agitação foi capaz de causar uma diferença significativa no crescimento da levedura, enquanto nas agitações mais baixas os resultados atingidos foram análogos. Já para as máximas concentrações de xilitol é possível observar um comportamento crescente à medida que se aumenta a aeração, concluindo dessa forma que se trata de uma variável de extrema importância para a produção desse poliál.

5.2.3 Experimentos utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC)

Finalmente, analisou-se a influência da agitação na produção do xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju como fonte de substratos, cujo perfil de crescimento celular, consumos de glicose, xilose e formação do produto estão representados pela Figura 9.

Assim como aconteceu com o MS, os cultivos realizados com HBC foram fortemente afetados por uma agitação em específico. O melhor crescimento microbiano e a maior produção de xilitol foram atingidos a 150 rpm, produzindo $21,61 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $5,14 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol. O segundo maior crescimento ocorreu a 200 rpm, gerando concentrações de $16,35 \pm 0,57 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, enquanto a segunda maior produção ocorreu a 120 rpm, onde $4,19 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol foram produzidos.

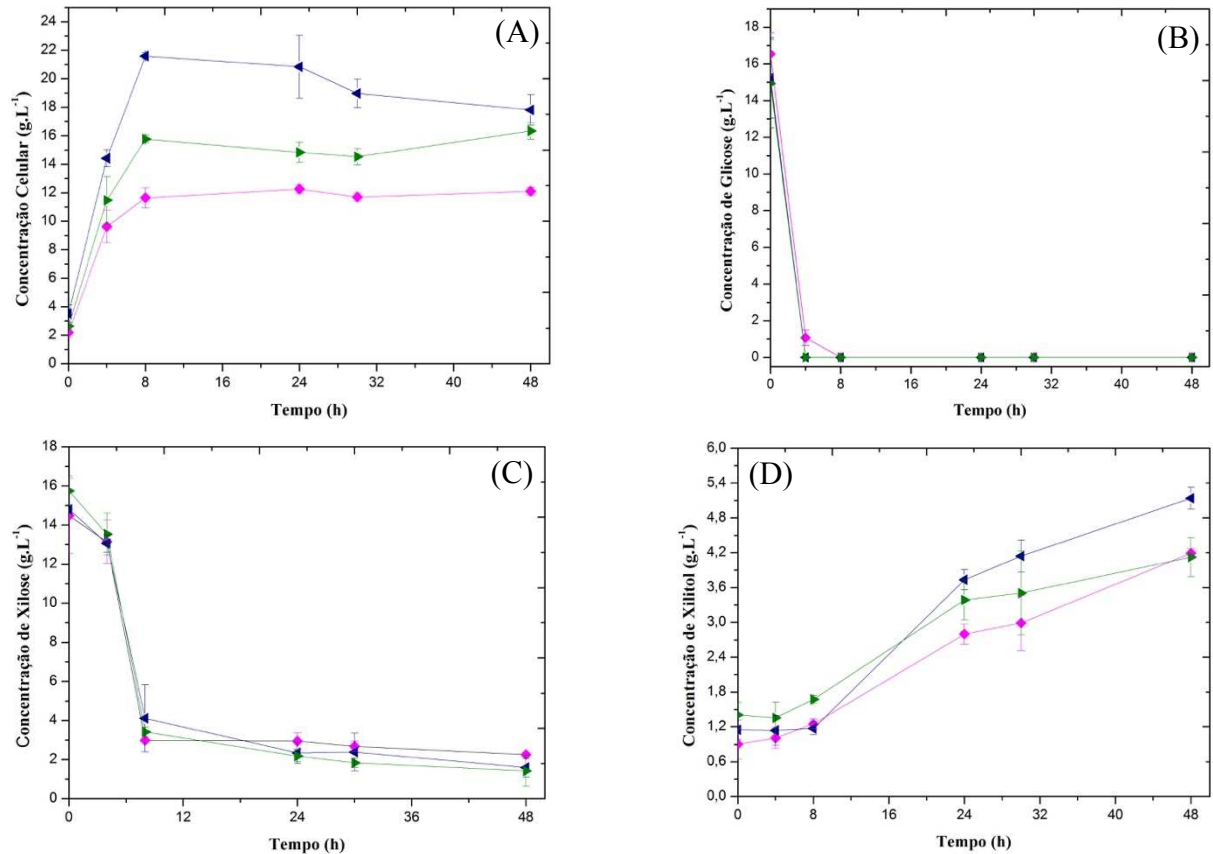
Para o consumo de xilose no experimento conduzido a 150 rpm foram consumidos $13,21 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose, enquanto a 200 rpm esse consumo foi levemente maior, $14,33 \text{ g.L}^{-1}$. Esses valores representam, respectivamente, o consumo de 89,25% e 91% da xilose presente inicialmente.

A glicose presente no meio ($15,23 \pm 1,48 \text{ g.L}^{-1}$) foi consumida por completo nas primeiras 4 h de cultivo em maiores agitações. Já a 120 rpm, esse consumo ocorreu em 8 h. Foi observado um consumo acentuado de xilose entre 4 e 8 h de processo, ou seja, logo após o consumo completo da glicose. Confirmando, assim, a preferência da *K. marxianus* ATCC 36907 por glicose.

Também foi possível confirmar que ocorre um expressivo aumento na produção de xilitol a partir de 8 h processo, logo após o momento em que ocorre um maior consumo de xilose. Visto que após o consumo da glicose, a enzima que converte xilose a xilitol (XR) é ativada e a produção de xilitol é acelerada (TOCHAMPA *et al.*, 2005).

Por fim, é possível notar que o processo conduzido a 120 rpm pode vir a ser bastante promissor para a produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico como fonte de substrato, visto que, apesar de gerar uma baixa concentração de biomassa e consumir a menor quantidade de xilose, durante essa fermentação foi produzido uma quantidade de xilitol próxima a aquela observada para a fermentação a 200 rpm.

Figura 9 - Efeito da agitação sobre as variáveis de estado do bioprocessamento produtivo de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 a 150 rpm utilizando hidrolisado hemicelulásico de bagaço de caju (HBC). (A) crescimento celular; (B) consumo de glicose; (C) consumo de xilose e (D) produção de xilitol.



Legenda: (◆) 120 rpm; (◀) 150 rpm e (▶) 200

Fonte: Autoria própria

Hernández-pérez, Arruda e Felipe (2016) utilizaram a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 para avaliar a produção de xilitol aplicando palha de cana-de-açúcar como matéria-prima. A palha de cana-de-açúcar foi submetida a uma hidrólise com ácido diluído de maneira similar a realizada no presente trabalho e suplementado com extrato de farelo de arroz, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. As concentrações iniciais de xilose e glicose foram $50,60 \text{ g.L}^{-1}$ e $9,75 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio e concentração inicial de biomassa celular de 1 g.L^{-1} foram incubados em um agitador rotativo a 30°C e 200 rpm por 48h. Ao fim do processo foram obtidos $7,16 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa com um rendimento de $0,20 \text{ g.g}^{-1}$ e $14,24 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol com um rendimento de $0,55 \text{ g.g}^{-1}$. 57,8% da concentração inicial foi consumida. Além de atingir uma produtividade de 0,30 e uma eficiência de 60%. No presente estudo foi obtido uma concentração de biomassa,

aproximadamente, três vezes maior do que a observada por Hernández-pérez, Arruda e Felipe (2016), possivelmente, graças a uma maior quantidade de glicose no HBC. Entretanto, os autores foram capazes de produzir uma maior quantidade de xilitol, provavelmente devido a maior concentração de xilose presente no meio.

Na Tabela 8 estão representados todos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular obtidos nos ensaios utilizando HBC. Como esperado, devido a maior produção de xilitol, a fermentação a 150 rpm apresentou os melhores valores de $Y_{P/S}$ ($0,30 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) e rendimento ($0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$), como também apresentou o maior valor para $Y_{X/S}$ ($1,37 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), indicando que a xilose consumida foi direcionada de forma balanceada tanto para o crescimento da levedura como para a produção do polioli. Já para o processo conduzido a 120 rpm, podemos observar que o menor rendimento de biomassa foi atingido ($0,81 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), mas o rendimento do xilitol ($0,27 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) ficou próximo daquele observado para 150 rpm, indicando um direcionamento da xilose levemente maior para a produção do açúcar do que observado no processo anterior, fato esse comprovado pelo mais alto valor de $Y_{P/X}$ ($0,33 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$). Enfim, a 200 rpm foi obtido o menor valor para $Y_{P/S}$ ($0,19 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), assim como o menor valor de $Y_{P/X}$ ($0,20 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), demonstrando que, durante o período observado, o substrato consumido foi em grande parte voltado para o crescimento e manutenção da *K.marxianus*.

Tabela 8 – Influência da agitação nos parâmetros de conversão, produtividade, máxima produção de xilitol e máximo crescimento celular utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC).

Parâmetros	AGITAÇÕES		
	120 rpm	150 rpm	200 rpm
Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$12,27 \pm 0,29$	$21,61 \pm 0,22$	$16,35 \pm 0,57$
$Y_{X/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,81	1,37	0,96
$Y_{P/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,27	0,30	0,19
$Y_{P/X}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,33	0,22	0,20
Q_p ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,087	0,11	0,086
$P_{\text{máx}}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$4,20 \pm 0,07$	$5,14 \pm 0,18$	$4,12 \pm 0,33$

Fonte: Autoria própria

López-Linares *et al.* (2018) avaliaram a produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii* e *Candida guilliermondii* utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de colza. O hidrolisado destoxificado foi utilizado como meio de fermentação que, por sua vez, foi realizada em frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL de hidrolisado inoculado com uma

concentração celular inicial de 3 g.L^{-1} . Os frascos foram mantidos num agitador rotativo a 200 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 144 h. *D. hansenii* e *C. guilliermondii* foram capazes de atingir um rendimento de xilitol de $0,42 \text{ g.g}^{-1}$. Entretanto, a primeira levedura foi capaz de atingir uma produtividade de $0,16 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, enquanto a outra obteve apenas $0,10 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. *C. guilliermondii*, apresentou um maior valor de $Y_{X/S}$, sendo ele $0,06 \text{ g.g}^{-1}$ versus $0,01 \text{ g.g}^{-1}$ obtido pela *D. hansenii*. Os valores de $Y_{P/S}$ e produtividade apresentados por López-Linares *et al.* (2018) foram próximos a aqueles demonstrados pela *K. marxianus* ATCC 38907 quando a 150 rpm e $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Já os valores de $Y_{X/S}$ foram substancialmente maiores no presente estudo em todas as condições.

Com o auxílio da Tabela 8, foi possível observar a influência positiva da agitação de 150 rpm tanto no crescimento celular como na produção de xilitol, entretanto essa influência é mais evidente durante o crescimento, onde é gerado uma diferença mais significativa quando comparado as outras agitações. Para a produção de xilitol, os cultivos a 120 rpm e 200 rpm geraram resultados extremamente similares, o que evidencia, porém não de forma acentuada, a maior produção a 150 rpm. Também pode-se notar que as agitações influenciaram as concentrações de biomassa de formas diferentes, onde a rotação mais baixa levar a um menor crescimento, enquanto a maior a rotação levou apenas a um crescimento mediano.

Na Figura 10, tem-se representado o comportamento das máximas concentrações celular e de xilitol nas diferentes agitações usadas (120 rpm, 150 rpm e 200 rpm) quando utilizado os três diferentes meios testados no presente trabalho (HBC, MS e MD).

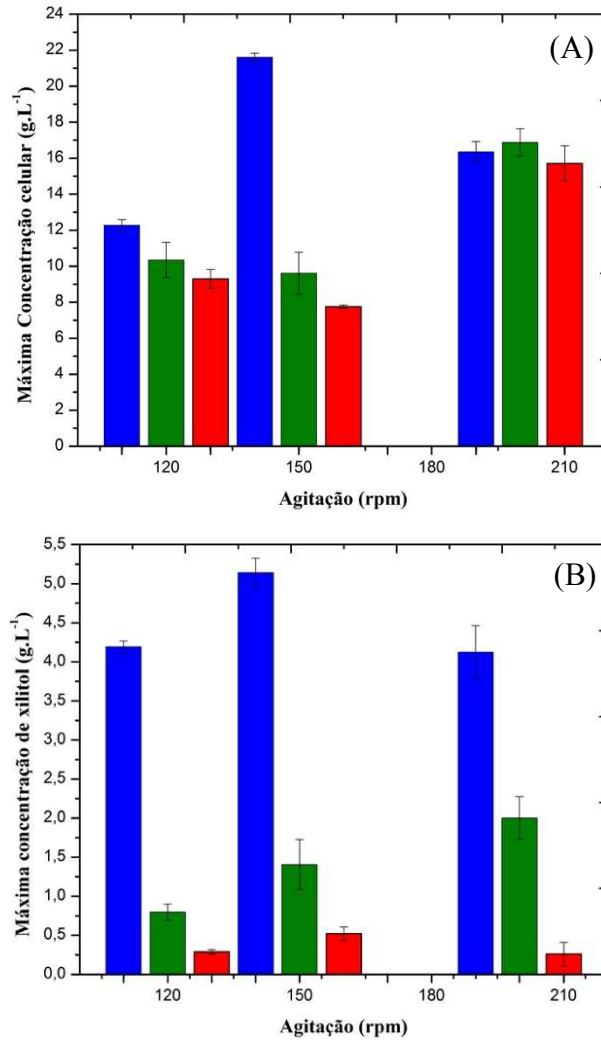
Na Figura 10A, pode-se notar que os crescimentos nos processos conduzidos a 120 rpm e 200 rpm foram similares para os três meios, com o HBC apresentando uma concentração de biomassa levemente maior a 120 rpm e o MS a 200 rpm. Entretanto, quando a 150 rpm, o HBC apresentou uma alta concentração de biomassa, significativamente maior do que aquela apresentada pelos meios sintéticos. Tanto o MD quanto o MS apresentaram a maior taxa de crescimento quando a 200 rpm, provavelmente, devido a maior presença de oxigênio, visto que maiores oxigenações favorecem maiores concentrações celulares (KURIYAMA; KOBAYASHI, 1993). Os meios sintéticos apresentaram crescimento semelhantes quando a 120 rpm e 150 rpm. Por fim, assim como no estudo das temperaturas, o meio MD apresentou os menores crescimentos dentre todos os meios estudados.

Na Figura 10B, fica mais uma vez nítido que, dentre os três meios estudados nesse trabalho, HBC representa o melhor meio de cultivo para a produção de xilitol por bioprocessos utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC 36907, visto que esse apresentou as maiores concentrações de xilitol em todas agitações estudadas, sendo a diferença de produção

significativamente maior do que aquelas apresentadas pelos meios sintéticos. Apesar de apresentar uma produção considerável nas três agitações testadas, HBC foi capaz de produzir mais xilitol quando a 150 rpm. Entre os meios sintéticos, o MS apresentou a melhor produção, sendo a maior delas a 200 rpm. Já o MD apresentou uma baixa produção em todas agitações estudadas a 40 °C, tendo sido sua maior produção a 30 °C.

A partir da utilização dos diferentes meios, pode-se perceber a forte influência da glicose em meios de produção de xilitol, visto que sua presença induz a produção de NADPH, cofator da enzima XR, responsável por converter xilose em xilitol. Quando em meio definido contendo apenas xilose, a levedura passa a consumir esse açúcar com o objetivo de gerar energia e posteriormente crescer, levando a uma baixa produção de xilitol. Entretanto, no cultivo realizado utilizando HBC, a *K. marxianus* utiliza a glicose, seu substrato de preferência, para gerar essa energia/crescimento e produzir NADPH que, posteriormente, auxilia na redução da xilose, gerando uma maior quantidade de xilitol. Utilizando os meios definidos também foi possível de observar a influência da fonte de nitrogênio e da ação tamponante nos meios, sendo a fonte orgânica aquela que apresentou melhores resultados.

Figura 10 - Influência da agitação no (A) crescimento celular e na (B) produção de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 usando o meio Dasgupta (MD), o meio Serpa (MS) e o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju (HBC) com os bioprocessos conduzidos a diferentes agitações e 40 °C. Dados experimentais: (■) HBC; (■) MS; (■) MD.



6 CONCLUSÃO

A melhor condição de cultivo, utilizando o HBC, foi a que utilizou uma agitação de 150 rpm a 40 °C, obtendo $5,14 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol e $21,61 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Com o presente estudo, foi possível concluir que a temperatura e a agitação influenciam diretamente na produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de caju, e que a presença da glicose pode beneficiar a produção de xilitol, favorecendo o crescimento celular no início do bioprocessamento.

REFERÊNCIAS

- ADITIVOS E INGREDIENTES. OS POLÍOIS. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/81.pdf. Acesso em: 01 de nov. 2017.
- AHMAD, I.; SHIM, W. Y.; KIM, J.-H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1279-84, 2013
- AKIYAMA, H; OONO, T.; HUH, W. K.; YAMASAKI, O.; OGAWA, S., KATSUYAMA, M., ICHIKAWA, H., IWATSUKIA, K. Actions of Farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 48, p. 122-128, 2002.
- ALBUQUERQUE, Tiago Lima de *et al.* Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p.33-40, out. 2015.
- ALBUQUERQUE, Tiago Lima de. **Produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de caju**. 2014. 163 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- AMMONS, M. C. B.; WARD, L. S.; DOWD, S.; JAMES, G. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n.4, p. 316-23, 2011.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE AGROENERGIA. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS (USDA). – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 01 de novembro de 2017.
- ARRUDA, Priscila Vaz de *et al.* Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p.815-822, 4 ago. 2010.
- AZARPAZHOOH, Amir; LAWRENCE, Herenia P; SHAH, Prakeshkumar S. Xylitol for preventing acute otitis media in children up to 12 years of age. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, 3 ago. 2016. John Wiley & Sons, Ltd.
- BÄR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 349-79.
- BARROS, E.M. *et al.* A yeast isolated from cashew apple juice and its ability to produce first- and second-generation ethanol. **Applied biochemistry and biotechnology**. EUA, p. 2762-2776. 20 set. 2014.
- BASSLER, K. H., HEESSEN, D. Die Bildung von Leber- und Muskelglykogen aus Xylit, Sorbit und Glucose bei gesunden und alloxandiabetischen Ratten. **Klin. Wochenschr.** v. 41, p. 595-598, 1963.

BRANCO, F. R.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3241-3246, 2011.

BRIONES, Rodrigo; SERRANO, Luis; LABIDI, Jalel. Valorization of some lignocellulosic agro-industrial residues to obtain biopolyols. **Journal of chemical technology biotechnology**. EUA, p. 244-249. 10 abr. 2011.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MEDEIROS, R., GÍRIO, F. M. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: effect of supplementation. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 12, p. 1887-1891, 2007.

CGEE (2010). **Química Verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos.

CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; SHIU, J. S. Development of probiotic candies with optimal viability by using response surface methodology and sequential quadratic programming. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 6, p. 896- 902, 2008.

CHEN, X.; JIANG, Z.-H.; CHEN, S.; QIN, W. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 7, p. 834-44, 2010.

CHIANG, C.; KNIGHT, S. G. Metabolism of D-xylose by moulds. **Nature**. v. 188, p. 79–81, 1960.

CHOI, H. S.; CHOI, Y. S.; PARK, H. C. Fast pyrolysis characteristics of lignocellulosic biomass with varying reaction conditions. **Renewable Energy**, v. 42, p. 131-135, 2012.

CORREIA, Jessyca Aline da Costa *et al.* Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Process biochemistry**. Fortaleza-Ce (Brasil), p. 249-256. jul. 2013.

CORREIA, Jessyca Aline da Costa *et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource technology: bioresource technology**. Fortaleza-ce (Brasil), p. 249-259. mar. 2015.

CULBERT, S. J., WANG, Y. M., FRITSCH, H. A., CARR, D., LANTIN, E., van EYS, J. Oral xylitol in American adults. **Nutr. Res.**, v.6, p.913-922, 1986.

DASGUPTA, Diptarka *et al.* Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, v. 197, p. 9-21, jan. 2017a.

DASGUPTA, Diptarka *et al.* Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. **Microbiological Research**, v. 200, p.64-72, jul. 2017b.

DASGUPTA, Diptarka *et al.* Purification, characterization and molecular docking study of NADPH dependent xylose reductase from thermotolerant *Kluyveromyces* sp. IPE453. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p.124-133, jan. 2016.

DHAR, Kiran S.; WENDISCH, Volker F.; NAMPOOTHIRI, Kesavan Madhavan. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for xylitol production from lignocellulosic pentose sugars. **Journal Of Biotechnology**, v. 230, p.63-71, jul. 2016.

DIÉGUEZ, C. G.; SALGADO, J. M.; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, J. M. Kinetic modelling of the sequential production of lactic acid and xylitol from vine trimming wastes. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 34, n. 7, p. 869-878, 2011.

DURAIRAJ, Lakshmi *et al.* Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. **Journal Of Cystic Fibrosis**, v. 6, n. 1, p.31-34, jan. 2007.

EL-BAZ, A. F.; SHETAIA, Y. M.; ELKHOULI, R. R. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimized growth conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 68, p. 15353-15363, 2011.

EDELSTEIN, S. *et al.* Comparison of six new artificial sweetener gradation ratios with sucrose in conventional-method cupcakes resulting in best percentage substitution ratios. **J. Cult. Sci. Technol.**, v. 5, p. 61–74, 2008.

FISKER, Herdis Overgaard; NISSEN, Vibeke. Effect of gum base and bulk sweetener on release of specific compounds from fruit flavoured chewing gum. **Flavour Science - Recent Advances And Trends**, p.429-432, 2006.

FRANCESCHIN, G.; SUDIRO, M.; INGRAM, T.; SMIRNOVA, I.; BRUNNER, G.; BERTUCCO, A. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 6, p. 631-640, 2011.

GALES, M. A, NGUYEN, T. Sorbitol compared with xylitol in prevention of dental caries. **Ann. Pharmacother.**, v.34, p.98-100, 2000.

GONZÁLEZ-SISO, M.; FREIRE-PICOS, M.; RAMIL, E.; GONZÁLEZ- DOMÍNGUEZ, M.; RODRÍGUEZ, T. A.; CERDÁN, M. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 699-705, 2000.

GRANSTROM, T.B., IZUMORI, K., LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Appl. Microb. Biotechnol**, v. 74, p. 277–281, 2007.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, Andrés Felipe; ARRUDA, Priscila Vaz de; FELIPE, Maria das Graças de Almeida. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 2, p.489-496, abr. 2016.

HORITSU, H., YAHASHI, Y., TAKAMIZAWA, K., KAWAI, K., SUZUKI, T., WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Biotechnol. Bioeng.** v. 40, p. 1085–1091, 1992.

IKEUCHI, T., AZUMA, M., KATO, J., OOSHIMA, H., 1999. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. **Biomass Bioenergy** v. 16, p. 333–339, 1999.

IRMAK, Sibel *et al.* Xylitol production from lignocellulosics: Are corn biomass residues good candidates? **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 11, p.220-223, jul. 2017.

ISLAM, M. S. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 5, p. 505-511, 2011.

IZUMORI, K.; TUZAKI, K. Production of xylitol from d-xylulose by *Mycobacterium smegmatis*. **J. Ferment. Technol.** v. 66, p. 33–36, 1988.

JEFFRIES, TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, EUA, p. 320-326, maio 2006.

JIA, HONGHUA *et al.* Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p.676-683, out. 2016.

KANDELMAN, D. Sugar, alternative sweeteners and meal frequency in relation to caries prevention: new perspectives. **Brit. J. Nutr.**, v.77, p.S121-S128, 1997.

KANG, T.Z., MOHAMMAD, S.H., MURAD, A.M.A., ILLIAS, R.M., JAHIM, J.M. Fermentative production of xylitol: a first trial on xylose bifurcation. **Ind. J. Sci. Technol.** v. 9, p. 1–5, 2016.

KESHWANI, Deepak Radhakrishin. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. **University microfilms international (UMI)**, Raleigh (Carolina do Norte), p. 644-52, maio 2009.

KIM, T.B., LEE, Y.J., KIM, P., KIM, C.S., OH, D.K. Increased xylitol production rate during long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. **Biotechnol. Lett.** v. 26, p. 623–627, 2004.

KO, C. H.; CHIANG, P. N.; CHIU, P. C.; LIU, C. C.; YANG, C. L.; SHIAU, I. L. Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes. **Chemical Technology**, v. 83, p. 534-540, 2008.

KÖNIG, K.G. Diet and oral health. **Int. Dent. J.**, v.50, p.162- 174, 2000.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009a.

KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M.; ADHIKARI, D. K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 36, p.1483-1489, 2009b.

KUMDAM, H.B., MURTHY, S.N., GUMMADI, S.N. A statistical approach to optimize xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. **Food Nutr. Sci.** v. 3, p. 1027–1036, 2012.

KURIYAMA, H.; KOBAYASHI, M.: Effect of oxygen supply on yeast growth and metabolism in continuous fermentation. **I. Ferment. Bioeng.**, v. 75, p. 364-367, 1993.

LATIF, Farooq; RAJOKA, Mohammad Ibrahim. Production of ethanol and xylitol from corn by yeasts. **Bioresource technology**, p. 57-63. mar. 2001.

LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência hoje**, v. 33, n. 95, p. 66-69, 2003.

LÓPEZ-LINARES, Juan Carlos *et al.* Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 247, p.736-743, jan. 2018.

MADIGAN, Michael T. *et al* (Ed.). **Brock biology of microorganisms**. 14^a. ed. Pearson Education, 2015. 1041 p.

MAGUIRE, A., RUGG-GUN, A.J. Xylitol and caries prevention—is it a magic bullet? **Br. Dent. J.**, v. 194, p. 429–436, 2003.

MÄKINEN, K.k.. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v. 54, n. 4, p.603-613, abr. 2000.

MANZ, U., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol - it's properties and use as a sugar substitute in foods. In: F. R. A. **SYMPOSIUM ON SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS**, 10., London, 1973.

MARECZKY, Z., FEHÉR, A., FEHÉR, C., BARTA, Z., RÉCZEY, K. Effects of pH and aeration conditions on xylitol production by *Candida* and *Hansenula yeasts*. **Period. Polytech. Chem. Eng.** v. 60, p. 54–59, 2015.

MARTÍNEZ. M. L.; SÁNCHEZA, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 160- 166, 2012.

MATEO, S.; ROBERTO, I. C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A. J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196-203, 2013.

MATTILA, P. T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA, M. L. E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54, n. 4, p. 548-51, 2005.

MELAJA, A. J.; HAMÄLÄINEN, L. Process for making Xylitol. U.S. Patent n. 4.008.285. 18 jun. 1975, publ. 15/ 02/1977.

MICHEL, Ângela Cristina Schirmer. **Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MISRA, Swati; RAGHUWANSHI, Shailendra; SAXENA, R.k.. Evaluation of corn cob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p.1596-1601, fev. 2013.

MITIĆ-ĆULAFIĆ, D. S.; PAVLOVIĆ, M.; OSTOJIĆ, S.; KNEZEVIĆ- VUKCEVIĆ. Antimicrobial effect of natural food preservatives in fresh basil-based pesto spreads. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2013.

MIURA, M.; WATANABE, I.; SHIMOTORI, Y.; AOYAMA, M.; KOJIMA, Y.; KATO, Y. Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Wood Science Technology**, v. 47, n. 3, p. 515-522, 2013.

MONEDERO, V.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; YEBRA, M. J. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1003-1015, 2010.

MOTHIBE, J. V.; PATEL, M.. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p.128-134, set. 2017.

MUELLER, Michael; WILKINS, Mark R.; BANAT, Ibrahim M.. Production of Xylitol by the Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB Strains. **Journal Of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 01, n. 02, 2011.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.

NEERU, C., CHANDRAJIT, B., VIDYASAGAR, J. Biological production of xylitol from corn husk and switchgrass by *Pichia stiptis*. **Res. J. Chem. Sci.** v. 3, p. 58–64, 2013.

NELSON, David L.; COX, Michael M. (Ed.). **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Sarvier, 2010. 1273 p.

NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7514-7521, 2008.

PARK, S.M., SANG, B.I., PARK, D.W., PARK, D.H. Electrochemical reduction of xylose to xylitol by whole cells or crude enzyme of *Candida peltata*. **J. Microbiol.** v. 43, p. 451–455, 2005.

PAL, SUKSHAM *et al.* Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 147, p.449-455, nov. 2013.

PAUL, S. *et al.* Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource technology**, EUA, p. 449-55, nov. 2013

PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confection. **Food Technology**, Chicago, v.10, p.98 – 106, 1988.

PEREIRA, A. F. F.; SILVA, T. C.; CALDANA M. L.; MACHADO, M. A. A. M.; BUZALAF, M. A. R. Revisão de literatura: utilização do xilitol para a prevenção de otite média aguda. **International Archives Otorhinolaryngology**, v. 13, n. 1, p. 87-92, 2009.

PÉREZ, J. *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology**. Eua, p. 53-63. jun. 2002.

PINHO, Livia Xerez. **Aproveitamento do resíduo do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) para alimentação humana**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-ce, 2009.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Biochemical properties of xylose reductase prepared from adapted strains of *Candida tropicalis*. **Applied biochemistry and biotechnology**. Kuantan (Malásia), p. 387-399. 10 out. 2014

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, M. M. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. **Chemical Engineering Research and Design**, v.90, n. 9, p. 1307-1312, 2012.

RAFIQUL, I.S.M., SAKINAH, A.M.M. Processes for the production of xylitol—a review. **Food Rev. Int.** v. 29, p. 127–156, 2013.

RANGASWAMY, S.; AGBLEVOR, F.A. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 60, p. 88–93, 2002.

RAO, Linga Venkateswar *et al.* Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p.299-310, abr. 2016.

RAO, R.S., BHADRA, B., SHIVAJI, S. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of colleopteran insects. **Curr. Microbiol.** v. 55, p. 441–446, 2007.

RITTER, A. V; PREISSER, J. S.; CHUNG, Y.; BADER, J. D.; SHUGARS, D. A., AMAECHI, B.T., MAKHIJA, S. K.; FUNKHOUSER, K. A, Vollmer, W.M.. Risk indicators for the presence and extent of root caries among caries-active adults enrolled in the Xylitol for Adult Caries Trial (X-ACT). **Clinical oral investigations**, v.16, p. 1647-1657, 2012.

ROCHA, M. V. P. **Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) por fermentação submersa**. Maria Valdevez Ponte Rocha – Natal, RN: 162p. 2010. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Departamento de Engenharia Química, 2010.

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**. Fortaleza-ce (Brasil), p. 1099-107. ago. 2011

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Enzymatic Hydrolysis and fermentation pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted acid for bioethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**. Fortaleza-Ce (Brasil), p. 104-114. maio 2009.

ROCHA, Maria Valderez Ponte *et al.* Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p.234-243, maio 2014.

RODRIGUES, M. R. C. *et al.* Respostas reprodutivas e metabólicas de ovelhas alimentadas com bagaço de caju desidratado, durante o pós-parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n.1, p.171-179, 2011.

RODRIGUES, Tigressa Helena Soares *et al.* Ethanol Production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. **Applied biochemistry and biotechnology**. Fortaleza-Ce (Brasil), p. 929-943. jul. 2011.

RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; PINTO, Gustavo; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. Effects of inoculum concentration, temperature, and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. Fortaleza-ce (Brasil), p. 571-576. out. 2008.

RODRIGUES, Tigressa Helena Soares. **Estudo comparativo da produção de etanol por processos de shf (fermentação e hidrólise separadas) e ssf (fermentação e hidrólise simultâneas) de bagaço de caju (*Anacardium occidentale L.*)**. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (ufc), Fortaleza, 2014.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N. HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology**, v. 90, p. 1573-1586, 2011.

ROVNER, A. J.; NANSEL, T. R.; GELLAR, L. The effect of low-glycemic diet vs a standard diet on blood glucose levels and macronutrient intake in children with type 1 diabetes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, p. 303-307, 2009.

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

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1382-91, 2004.

SAMPAIO, F.C., DA SILVEIRA, W.B., CHAVES-ALVES, V.M., PASSOS, F.M.L., COELHO, J.L.C. Screening of filamentous fungi for production of xylitol from xylose. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, p. 325–328, 2003.

SAMPAIO, F.C., TORRE, P., PASSOS, F.M., PEREGO, P., PASSOS, F.J., CONVERTI, A. Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. **Biotechnol. Prog.** v. 6, p. 1641–1650, 2004.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 542-548, 2008.

SANTOS, R. P. *et al.*, Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1432-1437, 2007.

SERPA, Juliana de França. **Produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju.** 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SILVA, A. F. *et al* (Ed.). **D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization.** Berlin: Springer-verlag, 2012. 325 p.

SILVA, A. F.; SUZUKI, E. Y.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. G.; SILVA, S. S.; RAPOSO, N. R. B. In Vitro inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by xylitol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n. 2, p. 235-241, 2011.

STAMBUK, Boris U. *et al.* Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of science of industrial research.** Nova Deli (Índia), p. 918-926. nov. 2008.

SU, B., WU, M., LIN, J., YANG, L. Metabolic engineering strategies for improved xylitol production from hemicellulosic sugars. **Biotechnol. Lett.** v. 35, p. 1781–1789, 2013.

SUZUKI, S.; SUGIYAMA, M.; MIHARA, Y.; HASHIGUCHI, K.; YOKOZEKI, K. Novel enzymatic method for the production of xylitol from d-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.66, p.2614–2620, 2002.

TADA, K.; KANNO, T.; HORIUCHI, J. Enhanced production of bioxylitol from corn cobs by *Candida magnolia*, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 10008-10014, 2012.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.

TOCHAMPA, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; VANICHSRIRATANA, W.; SRINOPHAKUN, P.; BAKKER, H. H. C.; CHISTI, Y. A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 28, p. 175-183, 2005.

UITTAMO, J. *et al.* Xylitol inhibits carcinogenic acetaldehyde production by *Candida* species. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 8, p. 2038-2041, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitária. **Guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2013.

VALLEJOS, María Evangelina *et al.* Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops And Products**, v. 91, p.161-169, nov. 2016.

WEI, J.; YUAN, Q.; WANG, T.; WANG, L. Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corn cob hydrolysates. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 4, n. 1, 57-64, 2010.

WEST, T. P. Xylitol production by *Candida* species grown on a grass hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 913- 916, 2009.

WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 346-350, 2008.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **J. Ferment. Bioeng.** v. 86, p. 1–14, 1998.

WINKELHAUSENA, E.; MALINOVSKAA, R. J.; VELICKOVAA, E.; KUZMANOVAA, S. Sensory and microbiological quality of a baked product containing xylitol as an alternative sweetener. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n.3, p. 639-649, 2007.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**, v. 72, n. 4, p.414-417, 2003.

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Adv. Food Res.**, v.25, p.159-180, 1979.

YOKOYAMA, S.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **J. Ferment. Bioeng.** v. 79, p. 217–223, 1995.

YOSHITAKE, J.; ISHIZAKI, H.; SHIMAMURA, M.; IMAI, T. Xylitol production by an *Enterobacter* species. **Agric. Biol. Chem.** v. 37, p. 2261–2267, 1973.

ZACHARIS, C., DONELL, K., KEARSLEY, M. Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. **Wiley-Blackwell Publishing**, Oxford, UK, pp. 347–382, 2012.

ZHANG, J. *et al.* Xylitol production from D- xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. **Bioresource technology**, v.105, p. 134-41, 2012.

ZHUANG, J.; LIN, L.; YONG, S.; PANG, C. Detoxification of wheat strew formic acid hydrolysis and xylitol production. **Advanced Materials Research**, v. 383- 390, p. 5453-5457, 2011.

ZOU, Y. Z.; KAI, Q. I.; CHEN, X.; MIAO, X. L.; ZHONG, J. J. Favorable effect of very low initial $k(L)a$ value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p.149-52, 2010.