**BIOMASSA SECA DE *Candida guilliermondii* COMO NOVO AGENTE DESTOXIFICANTE DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA SEU APROVEITAMENTO NA PRODUÇÃO DE XILITOL**

**Resumo**

Biorrefinarias visam o aproveitamento integral das biomassas vegetais, e no caso da cana-de-açúcar, destaca-se seu bagaço. Esta biomassa vegetal é constituída por polissacarídeos que podem ser convertidos em compostos comercialmente interessantes, como o xilitol, molécula com ampla aplicabilidade. Na produção biotecnológica de xilitol utilizando bagaço de cana, é necessária a solubilização de seus açúcares, através da hidrólise ácido diluído, técnica comumente empregada. Entretanto, além da obtenção dos monossacarídeos de interesse, também são liberados compostos tóxicos para as leveduras, os quais inibem seu metabolismo. Logo, torna-se necessária a destoxificação do hidrolisado, usualmente feita utilizando carvão ativado, o qual pode ser substituído pela utilização da biomassa seca de *Candida guilliermondii*, cuja parede celular possui características adsortivas. Assim, este estudo busca comparar a eficácia da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, utilizando a biomassa seca de *Candida guilliermondii* cultivada em dois meios distintos, um hidrolisado e outro semidefinido, livre de inibidores.

**Palavras-chave** Biorrefinaria; Destoxificação; Levedura seca; Reaproveitamento; Xilitol.

**ABSTRACT**

**Biorefineries aim full use of plant biomass and, in the case of sugarcane, its bagasse stands out because of its potential. This plant biomass is composed by polysaccharides that can be converted into commercially interesting compounds, such as xylitol, a molecule with wide applicability. In the biotechnological production of xylitol using sugarcane bagasse, it is necessary to solubilize its composing sugars, through dilute acid hydrolysis, the most used technique. However, beyond the monosaccharides of interest, toxic compounds are also released, inhibiting yeast metabolism. Therefore, the hydrolysate detoxification is necessary, which is usually carried using activated charcoal, that can be replaced by the use of *Candida guilliermondii* dry biomass, whose cell wall has adsorptive characteristics. This study aims to compare the effectiveness of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate detoxification using *Candida guilliermondii* dry biomass grown in two different culture media, a complex hydrolysate one, and a semidefined one, free of any inhibitors.**

**Keywords**: Biorefinery; Detoxification; Dry yeast biomass; Reuse; Xylitol.

.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de cana-de-açúcar, fortemente consolidado no Brasil, não se limita apenas à produção de açúcar e etanol, os quais são os principais destinos desse plantio, de acordo com o levantamento mais recente da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), possuindo também potencial de se estender à exploração dos subprodutos da cana, com destaque para o bagaço. Uma das maneiras de se realizar esse aproveitamento é através dos químicos de alto valor que podem ser obtidos a partir dos monossacarídeos que compõe a parede celular do bagaço, composta por celulose, hemicelulose e lignina. Dentre os compostos químicos de alto valor agregado se encontra o xilitol, o qual é comercialmente produzido por catálise química da xilose presente na hemicelulose e é amplamente pesquisado com vistas à sua produção biotecnológica. O xilitol é um açúcar-álcool que apresenta inúmeras aplicações nas mais diversas indústrias, que incluem: uso como adoçante, adequado para pacientes com diabetes, capacidade de preservação de alimentos, auxiliador na absorção de cálcio pelo corpo e ação anticariogênica (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2019).

Porém, há diversos processos que distanciam o xilitol do bagaço da cana, os quais podem ser realizados através de duas rotas majoritárias: a química, que ocorre sob altas condições de temperatura e pressão, seguida por etapas de concentração e purificação do xilitol formado (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. et al., 1998); e a bioquímica, a qual requer a fermentação realizada por leveduras que farão a bioconversão de xilose em xilitol. Enquanto a produção química de xilitol já é operada em escala industrial, a biotecnológica ainda se encontra em fase de estudos em busca de eficiência e rentabilidade suficientes para a sua implantação em biorrefinarias, uma vez que demonstra potencial de substituição à via química (ARRUDA et al., 2017) por não possuir gasto energético tão elevado para atingir altos níveis de temperatura e pressão (HOU-RUI, 2012). Como a xilose é uma pentose, ou seja, possui cinco carbonos em sua estrutura, surge a necessidade de utilizar no processo uma levedura que possua a capacidade de assimilação, como a espécie *Candida* *guilliermondii* FTI 20037, a qual tem sido reportada em pesquisas como eficiente na fermentação de xilose (HERNÁNDEZ-PERÉZ, 2015; ARRUDA et al., 2017). Além disso, é uma levedura capaz de consumir tanto hexoses quanto pentoses (PAPON et al., 2013), o que a torna ideal para esse bioprocesso, uma vez que o bagaço é uma fonte vegetal rica nestes monossacarídeos (ARRUDA, 2011).

Entretanto, para que a levedura seja capaz de realizar a bioconversão, é necessário despolimerizar a parede celular do bagaço da cana-de-açúcar a partir do processo de hidrólise ácido diluído, a fim de obter a xilose que tornará a fermentação possível. Porém, além da xilose, neste processo também são formados compostos tóxicos para a célula, como fenólicos, derivados da despolimerização da lignina; ácido acético, o qual surge da despolimerização da hemicelulose, assim como furfural e 5-hidroximetilfurfural, provenientes da reação de desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente (KLINKE et al., 2003). Dessa forma, a célula terá seu metabolismo inibido a menos que haja uma redução nas concentrações dessas moléculas a níveis não inibitórios. O processo de destoxificação do hidrolisado comumente empregado é o uso de carvão vegetal ativado, o qual possui alta capacidade adsortiva, e estudos demonstraram sua eficiência na remoção de tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (MARTON et al., 2006). Porém, uma barreira para a aplicação industrial do carvão pode ocorrer em função do seu alto custo de regeneração (EL GAMAL et al., 2018).

Considerando que células microbianas também são capazes de adsorver compostos, o que ocorre por meio de interações eletrostáticas entre os tóxicos e os grupos funcionais (carboxilas, hidroxilas, amidas, etc) da parede celular microbiana (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; PIOTROWSKA; MASEK, 2015). A figura 1 ilustra os principais componentes presentes na parede celular de leveduras.

**Figura 1 –** Organização estrutural dos compostos presentes na parede celular de fungos.



**Fonte:** Adaptado de Fesel e Zuccaro (2016).

Tendo em vista que leveduras são utilizadas em diferentes bioprocessos, assim como na bioprodução de xilitol, seria interessante o aproveitamento de sua biomassa celular como agente destoxificante de hidrolisados hemicelulósicos, o que traria economias no processo de bioprodução de xilitol, gerando um ciclo produtivo, além de oferecerem impacto ambiental mínimo e pouca necessidade de processamento quando comparadas ao carvão (AHMARUZZAMAN, 2008).

Além disso, também é conhecido que a parede celular microbiana possui natureza dinâmica, sofrendo modificações em sua estrutura baseadas no meio em que as células estão cultivadas (KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999). Dessa forma, alterações na estrutura da parede podem influenciar na capacidade de destoxificação da biomassa celular seca. Assim, o presente estudo busca comparar e analisar os resultados da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço feito por biomassas secas de *Candida guilliermondii* cultivadas em meios diferentes como no meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono e no próprio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana rico em xilose.

1. OBJETIVO

Estabelecer uma estratégia alternativa ao uso de carvão ativado para destoxificação de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por biomassa seca de *Candida* *guilliermondii* para utilização deste na bioconversão de xilose em xilitol.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

**3.1. Obtenção das biomassas secas de *Candida guilliermondii* FTI 20037**

* + 1. **Preparo do inóculo**

Para o inóculo, será empregada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, previamente armazenada em ágar extrato de malte a 4°C. Esta levedura será cultivada em meio constituído por 30 g/L de xilose, 20 g/L de solução de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de (NH4)2SO4 e 0,1 g/L de CaCl2·2H2O. Este meio será primeiramente autoclavado e assim o cultivo do inóculo ocorrerá em shaker a 200 rpm, sob 30°C durante 24h. Em seguida, as células obtidas serão separadas por centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos (JOFRE, 2019).

* + 1. **Preparo dos meios fermentativos**

Serão empregados dois diferentes meios para a obtenção da biomassa de *Candida guilliermondii* FTI 20037:

I. Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço

Este meio será obtido a partir da hidrólise ácida do bagaço da cana-de-açúcar, a qual será realizada sob as seguintes condições: concentração de 1% de H2SO4, relação matéria seca: solução ácida de 1:10 (m/v), 121°C durante 20 minutos em reator de aço inox com capacidade máxima de 80L. O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (HHB) será submetido à adsorção por carvão ativado nas seguintes condições: o pH inicial do hidrolisado será elevado para 7,0 com adição de CaO e reduzido para 2,5 com H3PO4, o hidrolisado será então submetido à adsorção em carvão vegetal ativado em pó da marca Synth (1,0% m/v), mantendo-se a mistura sob agitação de 100 rpm a 60°C por 30 minutos. A cada alteração de pH e adição de carvão o precipitado formado será removido por centrifugação (MARTON et al., 2006). Após autoclavagem a 0,5 atm por 20 minutos o hidrolisado será suplementado com solução de extrato de farelo de arroz (20g/L), (NH4)2SO4 (2g/L) e CaCl2·2H2O (0,1g/L) (JOFRE, 2019).

II. Meio Semi-Definido

Este meio será preparado a partir da seguinte composição: soluções de glicose, xilose e arabinose, cujas concentrações serão determinadas com base no hidrolisado hemicelulósico de bagaço sendo o meio suplementado com os mesmos nutrientes empregados no hidrolisado.

* + 1. **Preparo da biomassa seca de levedura**

Após o preparo dos meios, serão inoculadas células isoladas de *Candida guilliermondii* em cada um deles e assim o processo fermentativo ocorrerá durante 72 horas, a 30°C, sob rotação de 200 rpm conforme ocorrido no preparo do inóculo.

Os meios fermentativos obtidos após 72h com as biomassas de levedura serão autoclavados a 1 atm, 120°C por 15 minutos, para inviabilização das células de *C. guilliermondii* FTI 20037. Posteriormente as biomassas serão separadas dos meios por centrifugação (Ls-3 Plus Celm) e o sobrenadante será descartado. Estas biomassas serão lavadas 3x com água destilada e em seguida submetidas a desidratação em estufa (60°C) até atingir massa constante. Após a secagem das biomassas, as mesmas serão trituradas com auxílio de gral e pistilo e peneiradas (35 Mesh).

**3.2. Testes de destoxificação do Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com as diferentes biomassas obtidas**

**3.2.1. Preparo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (HHB) a ser destoxificado**

Será reservada uma fração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço não destoxificado, que foi realizado na etapa 3.1.1. Em seguida, com o objetivo de elevar a concentração de xilose a aproximadamente 60 g/L, o HHB não destoxificado será concentrado a um fator de concentração correspondente a 3 (FC=3), em concentrador à vácuo, a 65±5°C, segundo a metodologia estabelecida por Rodrigues et al. (2003).

* + 1. **Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (HHB)**

O pH do HHB, preparado na etapa anterior (Item 3.2.1), será elevado para 7,0 com óxido de cálcio (CaO), e reduzido a 2,0 com ácido fosfórico (H3PO4). Em cada etapa, o hidrolisado foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos para retirada dos precipitados formados. Em frascos *Erlenmeyer* separados contendo HHB, serão adicionadas 5% (m/v) das biomassas secas de *Candida guilliermondii* obtidas pela fermentação em meio semi-definido e também da biomassa seca obtida pela fermentação no hidrolisado hemicelulósico de bagaço. Estes frascos serão agitados a 100 rpm, durante 5 horas, sob 30°C (JOFRE, F.M., 2019).

**3.3. Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados a partir das biomassas de levedura**

 Posterior às destoxificações do HHB, as biomassas secas serão retiradas por centrifugação, em seguida, serão acrescidos 1 g/L de células vivas de *Candida guilliermondii* obtidas conforme o preparo do inóculo. Os hidrolisados destoxificados serão suplementados com os mesmos nutrientes empregados no cultivo do inóculo, exceto a xilose. As condições de fermentação serão as mesmas do preparo do inóculo, exceto o tempo que será maior (72 horas). O desempenho fermentativo será avaliado a partir de análises do pH, concentração celular, consumo dos açúcares e formação dos produtos xilitol, glicerol, etanol e ácido acético.

**3.4. Métodos analíticos**

**3.4.1. Concentração e viabilidade celular**

A concentração celular será determinada mediante turbidimetria correlacionando a concentração em massa seca das células com a absorbância a 600nm, a partir de uma curva padrão construída com células obtidas em meio semidefinido (ARRUDA, 2011), e a viabilidade celular mediante visualização de lâminas preparadas a fresco com azul de metileno (0,01 % m/v).

**3.4.2 Quantificação de substratos e produtos**

A concentração de açúcares (xilose, glicose, arabinose), glicerol, xilitol, etanol e ácido acético serão determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ARRUDA, 2011). Será usado um cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão), com um detector de índice de refração, coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H, mantida a 45 oC, com H2SO4 0,01 N como eluente, e fluxo de 0,6 mL min-1. A concentração de sacarose e frutose será determinada também por CLAE, usando o mesmo cromatógrafo com detector de índice de refração, porém com uma coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX- 87P, mantida a 60 oC, com água deionizada como eluente, e fluxo de 0,4 mL min-1. As amostras serão previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pak” C18 (Millipore).

1. **RESULTADOS ESPERADOS**

Estabelecer condição de preparo de biomassa seca da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 para a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e sua utilização na produção biotecnológica de xilitol.

**REFERÊNCIAS**

AHMARUZZAMAN, M. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *In: Advances in Colloid and Interface Science,* v. 143, n. 1–2, p. 48–67, 2008.

ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011

ARRUDA, P. V. et al. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037.*In: Journal of Industrial and Engineering Chemistry,* v. 47, p. 297–302, 2017.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2018/19**. Primeiro levantamento. Brasília. 2018. 66p.

EL GAMAL, Maisa et al. Bio-regeneration of activated carbon: a comprehensive review. *In:* *Separation and Purification Technology*, v. 197, p. 345-359, 2018.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.F. et al. Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. *In: Critical Reviews in Biotechnology*, v.39, n. 7, p. 924-943, 2019.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. **Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular**. 2015. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

HOU-RUI, Z. Key drivers influencing the large-scale production of xylitol. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed). *D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization*. Berlin. Springer-Verlag, 2012, p. 267-290.

JOFRE, F. M. **Aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol.** 2019. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *In:* *Biochimica et Biophysica Acta* - General Subjects, v. 1426, n. 2, p. 373–383, 1999.

KLINKE, H. et al. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *In:* *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 6, p. 738-747, 2003.

MARTON, J. M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. *In: Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n. 1, p. 9–21, 2006.

MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *In: Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 549–558, 2009.

PAPON, N. et al. Candida guilliermondii: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *In: Current Genetics*, v. 59, n. 3, p. 73–90, 2013

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

PIOTROWSKA, M.; MASEK, A. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin A decontamination. *In:* *Toxins*, v. 7, n. 4, p. 1151–1162, 2015.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. *In:* *Process Biochemistry*, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.