



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LEANDERSON TÚLIO MARQUES LEMOS

**PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE XILOSE REDUTASE A PARTIR DO
HIDROLISADO DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*Anacardium
occidentale L.*)**

**João Pessoa – PB
2017**

LEANDERSON TÚLIO MARQUES LEMOS

**PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE XILOSE REDUTASE A PARTIR DO
HIDROLISADO DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU (*Anacardium
occidentale L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para o título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos

João Pessoa
2017

L556p Lemos, Leanderson Túlio Marques.

Produção e recuperação de xilose redutase a partir do hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) / Leanderson Túlio Marques Lemos. - João Pessoa, 2017.
75 f.: il. -

Orientador: Flávio Luiz Honorato da Silva.

Coorientadora: Sharline Florentino de Melo Santos.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Bagaço do Pedúnculo do Caju. 3. Xilose. 4. *Candida guilliermondii*. 5. Xilitol. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

Dissertação João Pessoa em 30/03/17.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
DEQ/CT/UFPB
-Orientador-



Prof.ª Dr.ª Sharline Florentino de Melo Santos
DEQ/CT/UFPB
-Co-orientadora-

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
DBIM/CCEN/UFPB
-Examinador Interno-

Prof.ª Dr.ª Flávia Cristina dos Santos Lima
IFPE
- Examinadora Externa-

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa
DEQ/CT/UFPB
- Examinador Externo-

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, que não me deixou fraquejar nessa jornada.

À minha mãe Maria Aparecida, meu pai Sérgio Túlio.

Aos meus irmãos Danilo, Wesley e Willian, por todo amor.

À minha avó Lilita, e meu Tio Paulo, anjos de Deus em minha vida.

À minha futura esposa, companheira de cada batalha, Rayssa de Freitas.

Aos meus sogros Lúcia e Beto, por todo acolhimento e apoio.

À toda minha família, pela crença nas minhas vitórias.

Aos Professores Flávio Luiz Honorato da Silva e Sharline Florentino de Melo Santos, pela orientação, repasse de conhecimentos e fundamental apoio.

Ao professor Carlos Alberto Bispo, pelo prazer em transmitir seu conhecimento, pela sua paciência e pelo bom humor, mesmo nas horas difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo aporte financeiro durante a realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA).

Aos Professores Marta Suely Madruga, Marcelo Muniz, Carlos Alberto de Almeida Gadelha e Flávia Cristina pela contribuição no aperfeiçoamento da pesquisa.

Aos anjos que Deus colocou na minha vida, Lorena Lucena, Débora Jamila, Taliana Bezerra e Íris Braz por toda ajuda na construção dessa vitória. Simplesmente fundamentais.

Aos funcionários da UFPB, Débora, Lindalva, Marcelo, Juliana e Sófacles pelo auxílio nas tarefas do cotidiano.

Aos meus grandes amigos, Djair Aritóteles, Edjane Fernandes, Wellington Silva, Matheus Felipe, Paulo Gabriel, Drielly Barbosa, Dayana Silva, Juliana Dantas, Glória de Fátima, Ana Rita e Eloyza Marques pela amizade fiel e incondicional.

Aos verdadeiros amigos que fiz no mestrado Rodrigo Dutra, Mikaelle Albuquerque, Fabrícia França, Carine Maciel, Fabíola Diniz, Jéssica Morais e Malanna Kauanne por toda fidelidade nos desafios do dia a dia.

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia, Josevan, José, Andressa, Wyllian, Bruna, Renata, Anderson, Riann, Franklin, Gustavo, Felipe e Ari pelas ideias compartilhadas e pela ótima convivência.

A Fundação André Tosselo que forneceu a levedura *Candida guilliermondii* CCT-1516, fundamental para este estudo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Obrigado, de coração!

LEMOS, Leanderson Túlio Marques, *Produção e recuperação de xilose redutase a partir do hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju (Anacardium occidentale L.)*, João Pessoa: Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, 2017. 74p. Dissertação (mestrado).

RESUMO

O grande volume de descarte dos resíduos gerados pelas agroindústrias, causa prejuízos graves ao meio ambiente. A alternativa emergente é o uso desses materiais rejeitados como fonte de energia para geração de bioprodutos. Dentro dessa problemática, uma via de reaproveitamento potencial para a utilização do bagaço do pedúnculo do caju é a produção de substâncias de alto valor por via biotecnológica. A extração de enzimas do metabolismo de leveduras, que transformam a biomassa em produtos como xilitol e etanol é uma técnica a ser otimizada. Em vista disso, a pesquisa objetivou a produção e recuperação da enzima xilose redutase a partir do licor hidrolisado do pedúnculo do caju, tendo como agente de fermentação a levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. A caracterização da composição lignocelulósica do bagaço do caju seco revelou a presença de $29,26 \pm 0,40\%$ de celulose, $17,06 \pm 0,42\%$ hemicelulose e $30,13 \pm 0,90\%$ lignina. O bagaço do pedúnculo do caju seco foi submetido à hidrólise ácida para liberação das pentoses e hexoses formadoras da matriz vegetal. O hidrolisado continha um teor de xilose de $6,25 \text{ g.L}^{-1}$, sendo a maior concentração entre os açúcares presentes. A levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516 apresentou uma velocidade máxima de crescimento de $0,08 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, no meio com licor hidrolisado. A produtividade de xilitol teve valor máximo de $0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no tempo de 36 horas de cultivo. E a conversão de xilose em xilitol apresentou um fator de $0,62 \text{ g.g}^{-1}$ com eficiência de 67,61%. A atividade de xilanases foi afetada nas primeiras 20 h de fermentação, sendo este um período de adaptação ao meio, posteriormente vindo a crescer chegando ao máximo valor de 0,408 U/mL, no tempo de 28 horas.

Palavras chave: Reaproveitamento, bagaço do pedúnculo do caju, xilose, *Candida guilliermondii*, xilitol.

LEMOS, Leanderson Túlio Marques, *Production and recovery of xylose reductase from the hydrolysate of cashew peduncle bagasse (Anacardium occidentale L.)*, João Pessoa: Post-graduation in Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, 2017. 74p. Dissertation (master's degree).

ABSTRACT

The large volume of waste disposal generated by agroindustries causes serious damage to the environment. The emerging alternative is the use of these discarded materials as a source of energy for the generation of bioproducts. Within this problem, a potential reuse route for the use of cashew fruit pulp is the production of high value substances through biotechnology. The extraction of enzymes from the metabolism of yeasts, which transform the biomass into products such as xylitol and ethanol is a technique to be optimized. The objective of this research was to produce and recover the xylose reductase enzyme from the hydrolysed liquor of the cashew peduncle, with yeast *Candida guilliermondii* CCT 1516 as a fermentation agent. The characterization of the lignocellulosic composition of the dried cashew peduncle bagasse revealed the presence of $29.26 \pm 0.40\%$ of cellulose, $17.06 \pm 0.42\%$ hemicellulose and $30.13 \pm 0.90\%$ lignin. The dry cashew peduncle bagasse was subjected to acid hydrolysis to liberate the plant matrix pentoses and hexoses. The hydrolyzate contained a xylose content of 6.25 g.L^{-1} , being the highest concentration among the sugars present. The yeast *Candida guilliermondii* CCT 1516 presented a maximum growth rate of $0.08 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, in the medium with hydrolyzed liquor. The productivity of xylitol had a maximum value of $0.43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at the 36 hour culture time. And the conversion of xylose to xylitol presented a factor of 0.62 g.g^{-1} with efficiency of 67.61%. The activity of xylanases was affected in the first 20 h of fermentation, being a period of adaptation to the medium, later growing to reach the maximum value of $0,408 \text{ U / mL}$, in the time of 28 hours.

Key words: Reutilization, cashew peduncle bagasse, xylose, *Candida guilliermondii*, xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	14
Figura 2 – Interação estrutural da biomassa lignocelulósica.	15
Figura 3 – Reação de redução da xilose a xilitol na presença de um catalisador	17
Figura 4 – Esquema de atuação da xilose redutase.	19
Figura 5 – Estrutura da xilose redutase.	20
Figura 6 – Extração em sistema aquoso bifásico.	22
Figura 7 – Etapas do projeto de pesquisa desenvolvidas neste trabalho.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio semissintético utilizado para crescimento do inóculo.....	32
Tabela 2 – Composição do meio semissintético utilizado para crescimento do inóculo.....	32
Tabela 3 – Planejamento experimental 2² com três pontos centrais para a investigar a eficiência na recuperação	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	15
3.1.1 Bagaço do pedúnculo do caju	16
3.2 XILITOL.....	17
3.2.1 Propriedades e aplicações do xilitol	17
3.2.2 Vias de produção	17
3.2.2.1 Produção química.....	18
3.2.2.2 Produção microbiológica	19
3.2.2.3 Produção enzimática	19
3.3 XILOSE REDUTASE	20
3.4 RECUPERAÇÃO DAS ENZIMAS	21
3.5 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABs).....	21
3.6 ESTADO DA ARTE	23
3.6.1 Produção de enzimas xilanases	23
3.6.2 Recuperação de xilanases com sistemas aquosos bifásicos	24
4 ABORDAGEM METODOLÓGICA	26
4.1 MATÉRIA-PRIMA	26
4.2 OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO LICOR PRÉ-HIDROLISADO ...	27
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	27
4.3.1 Umidade relativa	27
4.3.2 Cinzas	27
4.3.3 Proteínas	28
4.3.4 Determinação de proteína solúvel	28
4.3.5 Extrativos	29
4.3.6 Determinação de lignina	29
4.3.7 Determinação de holocelulose	30

4.3.8 Determinação de alfa-celulose	30
4.3.9 Determinação de hemicelulose	31
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LICORES E FERMENTADOS	31
4.5 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO	32
4.5.1 Cultivo do microrganismo	32
4.5.2 Preparo do inóculo	32
4.5.3 Cultivo com meio de hidrolisado de pedúnculo de caju	33
4.5.4 Determinação da concentração celular	34
4.6 RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA	34
4.6.1 Obtenção de concentrado celular	34
4.6.2 Preparação de sistemas de duas fases aquosas	34
4.6.3 Determinação dos parâmetros de recuperação	36
4.6.5 Avaliação da atividade enzimática	37
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
REFERÊNCIAS	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ARTIGO 1	44
5.2 ARTIGO 2	57
APÊNDICE	69
APÊNDICE A: CROMATOGRAMAS DE DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO MEIO DE CULTIVO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA <i>Candida guilliermondii</i>	70

1 INTRODUÇÃO

A redução dos impactos causados pela deposição de resíduos agroindustriais no meio ambiente motiva o desenvolvimento de novas tecnologias de reaproveitamento, a exemplo da utilização de biomassa como matéria-prima para produção de bioprodutos e de combustíveis renováveis. Medidas como esta, além de reduzirem os prejuízos ambientais, podem trazer benefícios na economia, bem como nos custos de produção de certos insumos importantes para a indústria. A utilização desses resíduos é assunto de grande interesse das agroindústrias, devido a elevada produção desses materiais, chegando ao desperdício de milhões de toneladas/ano.

O Brasil é um país de grande potencial na produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas e seus resíduos. A produção de resíduos agroindustriais é de aproximadamente 250 milhões de toneladas/ano. Geralmente a sua biomassa é composta por cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. A composição da matéria seca, com um percentual de mais de 70% de carboidratos, torna essas biomassas um substrato importante para processos fermentativos (REIS, 2017).

Com um desperdício de até 90% da sua produção, a cultura do caju apresenta um baixo nível de aproveitamento do pedúnculo. Quando o pedúnculo é industrialmente processado para a produção do suco, 40% de bagaço são produzidos e geralmente são rejeitados pelas indústrias locais. A composição média do bagaço de caju in natura é, aproximadamente, 20,56% de celulose, 10,17% de hemicelulose e 35,26% de lignina (GOMES et al., 2014).

As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses e correspondem de 10 a 40% da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos. A xilose é o segundo açúcar mais abundante, obtido a partir de biomassa lignocelulósica, e pode ser diretamente convertida em xilitol por vias biotecnológicas utilizando leveduras (MEDEIROS, 2015).

Estudos que visam à avaliação econômica de produção de xilitol através de bioprocessos, com informações sobre os seus custos em comparação com processo químico, não são encontrados facilmente na literatura. Sabe-se que as fontes de carbono renováveis, podem ser convertidas em substâncias de valor agregado, e a escolha do processo deve ser baseada em uma avaliação detalhada da sustentabilidade, disponibilidade de recursos e logística de transporte.

Dentre as alternativas biotecnológicas, a produção de xilitol por cinética enzimática apresenta um grande potencial. No entanto, o custo das enzimas comercializadas pode ser um fator negativo nesse tipo de processo, pois são exigidas para a produção de xilitol, enzimas com elevado grau de pureza, o que eleva o seu valor de produção (ALBUQUERQUE, 2015).

A produção de enzimas a partir de processos fermentativos com uso de resíduos agroindustriais como fontes de carbono, assim como técnicas de recuperação e purificação das enzimas tem sido amplamente estudada com a finalidade de diminuir os custos de produção. Através do uso de sistemas bifásico verifica-se que esta é uma técnica eficiente na separação e recuperação de diversas biomoléculas. A eficiência do processo de separação depende principalmente dos seguintes parâmetros: pH, temperatura e composição (PAL et al., 2013).

Diante do exposto, o estudo se justifica pela grande disponibilidade do bagaço do pedúnculo do caju nos estados do Nordeste e também pela necessidade de empregar uma tecnologia eficiente que assegure o aproveitamento do subproduto do caju na tentativa de minimizar os desperdícios. Além disso, permite a avaliação da eficiência de alternativas para a diminuição dos custos na produção do xilitol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção e a recuperação de xilose redutase por processo fermentativo utilizando como substrato o resíduo industrial lignocelulósico do bagaço do pedúnculo do caju.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar características físico-químicas do bagaço do pedúnculo do caju seco (composição lignocelulósica, umidade, pH, açúcares redutores, sólidos solúveis);
- Determinar as características físico-químicas dos açúcares do licor pré-hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju (xilose, arabinose, glicose) e dos inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural);
- Estudar a produção de xilitol e etanol como produtos da fermentação do licor hidrolisado do pedúnculo do caju com a levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516.
- Estudar a produção de xilose redutase por fermentação, utilizando o licor hidrolisado do pedúnculo do caju como fonte de carbono.
- Avaliar a recuperação da enzima xilose redutase, utilizando sistema aquoso bifásico.
- Calcular os parâmetros de eficiência do processo de recuperação por sistema aquoso bifásico da enzima xilose redutase.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

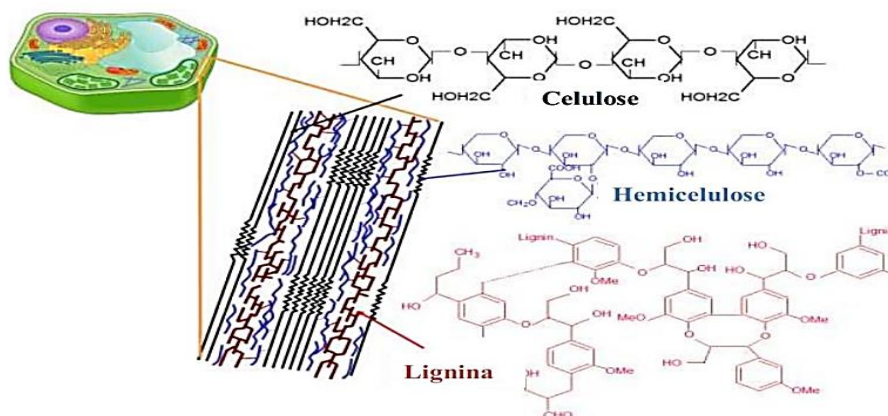
3.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os resíduos lignocelulósicos são recursos naturais renováveis com pouco reaproveitamento. A energia química armazenada mediante os processos fotossintéticos realizados pelos vegetais podem servir de fonte energética para vários fins, sendo necessário um processamento específico dessa biomassa para utilização de seu potencial (ZHANG et al., 2012).

A energia da biomassa lignocelulósica tem atraído a atenção dos pesquisadores para a produção de bioprodutos a partir dessa matéria-prima, valorizando, por exemplo os resíduos florestais, provenientes da indústria transformadora da madeira, assim como os resíduos agroindustriais. Esses materiais vegetais, depois de submetidos a um tratamento prévio, podem liberar açúcares que servem como principal fonte de carbono para a elaboração de produtos com alto valor de mercado (ULLAH et al., 2015).

A classificação dessa matéria pode ser dividida em duas classes, uma formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose, sendo mais utilizada pelas indústrias alimentícias e de bioconversão a etanol. A segunda classe é composta pelas partes estruturais do vegetal, onde se encontram os açúcares mais complexos e de difícil acesso. A parede celular de plantas é composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, além dos compostos inorgânicos (KUMAR; SINGH, 2008). Juntas, em suas respectivas proporções, celulose (35–50%), hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%), formam a estrutura da biomassa lignocelulósica dos vegetais (Figura 1).

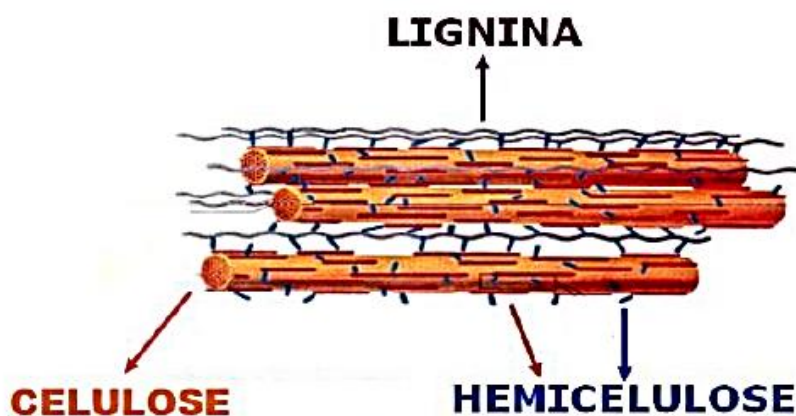
Figura 1 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Zampieri (2011).

As interações dos componentes da matriz vegetal criam uma estrutura altamente resistente (Figura 2), onde as ligações de hidrogênio unem as cadeias de celulose e estas são presas umas às outras por hemicelulose, e recobertas por lignina (SAWATDEENARUNAT et al., 2015).

Figura 2 – Interação estrutural da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Aguiar (2010).

3.1.1 Bagaço do pedúnculo do caju

Como um dos maiores produtores de caju do mundo, o Brasil apresenta uma gama de produtos industrializados dessa matéria prima. O aproveitamento do pedúnculo do caju na produção de polpa e suco gera uma massa residual considerável, sendo um material orgânico rico. Em geral esse resíduo é usado no enriquecimento de rações animais, porém apenas um percentual baixo desse material é aproveitado, se comparado com a produção total desse bagaço (SOUZA, 2016).

No Nordeste brasileiro o bagaço do caju é produzido em grande escala, consequência de uma grande produção de sucos, polpas e refrigerantes. De acordo com a Embrapa (2013), a área ocupada com a cultura do caju no Nordeste é de aproximadamente 700 mil hectares, com uma produção de cerca de 1.260.000.000 quilos de pedúnculo. Somente 10 a 20% da produção anual do pedúnculo de caju no nordeste brasileiro são beneficiados com a fabricação do suco integral (70 mil toneladas/ano), principal produto da industrialização do pedúnculo do caju (GOMES et al., 2014).

3.2 XILITOL

3.2.1 Propriedades e aplicações do xilitol

O xilitol é um açúcar álcool composto por cinco carbonos, que apresenta um grau de doçura tão intenso quanto à sacarose, porém apresenta menor teor calórico. Em 2004 o xilitol foi identificado a partir de uma lista de mais de 300 candidatos por parte do Departamento de Energia dos EUA (DOE), como uma das 12 mais importantes substâncias químicas que podem ser produzidas a partir da biomassa. (SU et al., 2015).

Esse poliálcool possui um grupo hidroxila ligado a cada átomo de carbono na sua cadeia, com um elevado poder edulcorante. Ele foi descoberto em 1891 pelo químico Emil Fischer (alemão, 1852-1919) e sua equipe, que o obteve em forma de xarope a partir da reação de xilose com amálgama de sódio. A sua principal característica é o poder de refrescância. Tem sido vastamente citado na literatura pelas suas características organolépticas e seus benefícios à saúde, tais como: elevada solubilidade, baixas taxas de glicemia, ausência de carcinogenicidade e propriedades cariostáticas (TAKATA et al., 2014).

Pesquisas indicaram que o xilitol evita que a maioria das bactérias orais produza ácidos cariogênicos. Isso se explica pelo acúmulo do xilitol em forma de açúcar-fosfato, considerado inibidor das bactérias cariogênicas. Outra grande vantagem é que o xilitol não participa das reações de Maillard, e assim não reduz o valor nutricional das proteínas presentes. Estas características confirmam sua aplicabilidade em processos de produção de alimentos, como doces, caramelos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas e bebidas (LEE et al., 2014; MA et al., 2014).

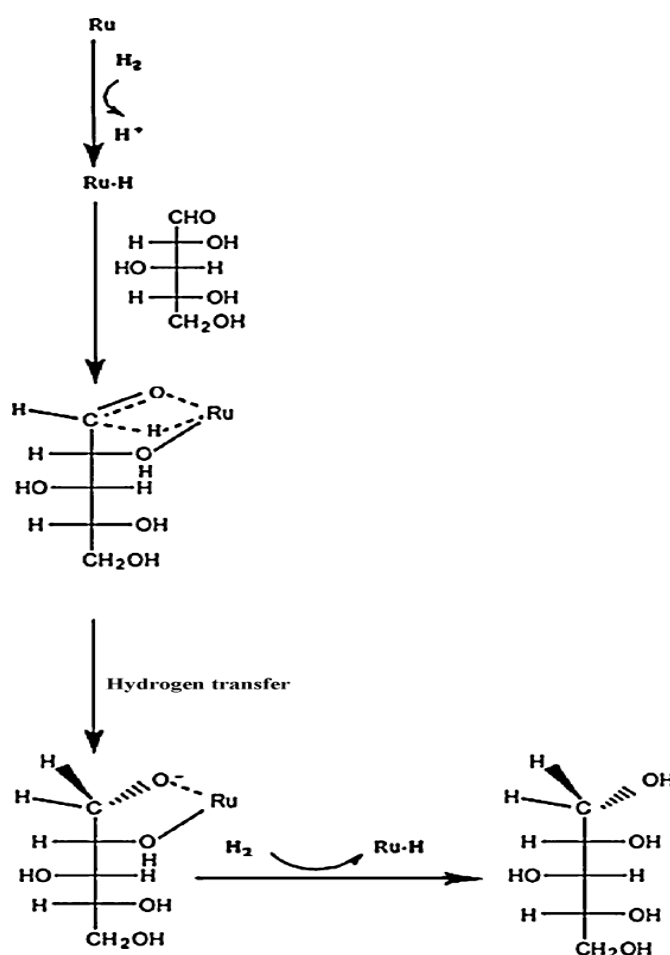
3.2.2 Vias de produção

A produção industrial de xilitol tem sido realizada por processo químico nas últimas décadas. Nessa produção, as soluções purificadas de D-xilose são submetidas ao processo de hidrogenação catalítica, em condições de alta temperatura (80 - 140 °C) e pressão (50 atm). Devido às condições operacionais e a necessidade de pureza na xilose utilizada, este processo tradicional apresenta custo elevado. Vários estudos têm buscado alternativas às rotas químicas, com especial atenção aos processos biotecnológicos, que além de buscar soluções para a reciclagem de resíduos agroindustriais, busca reduzir ainda mais os custos de processamento (ALBUQUERQUE et al., 2014).

3.2.2.1 Produção química

A produção em larga escala, para suprir a demanda comercial de xilitol, é realizada por redução química a partir da xilose (Figura 3), em condições extremas de temperatura e pressão. Grande parte da matéria-prima usada na produção por via química de xilitol são hidrolisados de madeira. Estudos comprovam que o uso de catalizadores metálicos pode favorecer a eficiência da reação, inclusive com a combinação de catalisadores na otimização do processo (JIANG et al., 2012; KIRILIN et al., 2014).

Figura 3 – Reação de redução da xilose a xilitol na presença de um catalisador metálico.



Fonte: Adaptado de YADAV et al. (2012).

Uma grande desvantagem na utilização de catalisadores é a sua desativação relativamente rápida, devido à contaminação dos sítios ativos e lixiviação de metais pesados em consequência ao acúmulo de impurezas orgânicas na superfície dessas substâncias metálicas. Com isso, taxas de conversão e de seletividade do processo ficam

comprometidas. Outro fator importante é a necessidade de remoção do total do catalisador do xilitol (produto final da redução da xilose) utilizado na indústria alimentar e em medicamentos ou cosméticos, aumentando ainda mais os custos para a purificação do produto final (YADAV et al., 2012).

3.2.2.2 Produção microbiológica

Os processos biotecnológicos de obtenção do xilitol representam uma alternativa para as desvantagens apresentadas pela via química de obtenção desse açúcar. O uso de microrganismos em fermentação controlada tem sido alvo de diversos estudos científicos. As pesquisas revelam um significativo potencial nessa via de obtenção do xilitol devido a independência da manutenção de altas temperaturas e pressões (necessárias na produção química). Além disso, tal processo, não favorece a formação de produtos indesejados, inibidores do processo e contaminantes do produto final (SU et al., 2015).

Entre os microrganismos, as leveduras demonstraram ser as melhores produtoras de xilitol, um intermediário de seu metabolismo da D-xilose. As leveduras do gênero *Candida* são as mais utilizadas nas pesquisas feitas. Existem também estudos da produção biotecnológica de xilitol a partir de fungos, além de outros microrganismos modificados geneticamente (PRATTER et al., 2015).

3.2.2.3 Produção enzimática

A via enzimática é um processo promissor e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais na produção do xilitol, uma vez que várias matérias-primas podem ser usadas na produção de xilitol por estes processos biotecnológicos (CUNHA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2015).

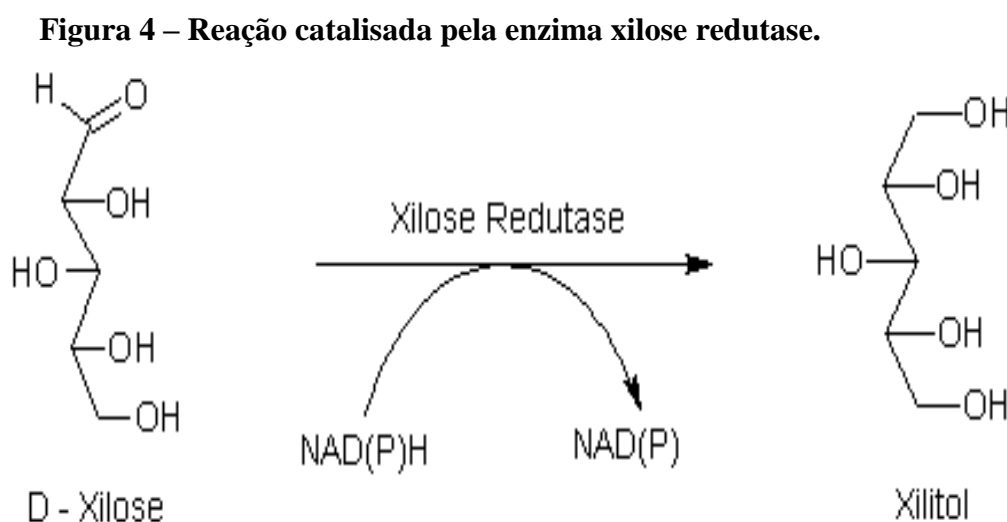
Para obtenção de xilitol, os materiais residuais mais usados são o bagaço de maçã (DALANHOL, 2014), bagaço de cana-de-açúcar (BIER, et al., 2007), bagaço do caju (ROCHA, et al., 2014), sabugo de milho (PING, et al., 2013), cascas de soja (CASSALES, 2010), palha de trigo (CANILHA, et al., 2005), palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002), cavacos de eucalipto (CANETTIERI, et al., 2002), casca de jabuticaba (SOUZA, 2013), casca de aveia (TAMANINI, et al., 2004), sorgo forrageiro (SENE, et al., 2011).

A produção enzimática do xilitol traz a união das vantagens dos métodos químico e enzimático (método sustentável, máxima eficiência, maior produtividade).

Pode ser uma alternativa ainda mais eficiente do que a produção por fermentação com o uso de microrganismos. A via enzimática possui a vantagem de diminuir as limitações de transferência de massa, que geralmente ocorrem com mais intensidade em processos fermentativos (BRANCO, 2010).

3.3 XILOSE REDUTASE

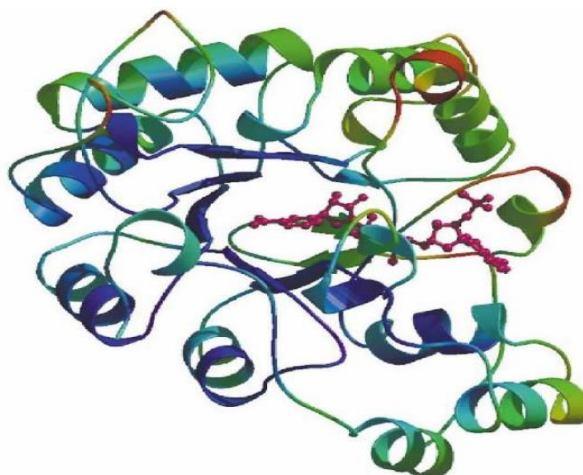
A xilose redutase (XR) é uma enzima intracelular responsável pela conversão bioquímica da xilose a xilitol, a reação que catalisa encontra-se descrita na Figura 4. A XR pertence à família das oxidoreductases do tipo aldose redutase, cuja estrutura tridimensional encontra-se representada na Figura 5. Está presente em algumas linhagens de leveduras e fungos filamentosos que são utilizadas na produção de xilitol por processo fermentativo (MILESSI et al., 2009).



Fonte: Proposto por Milessi et al. (2009).

A xilose redutase é uma enzima dependente de NADPH típico, enquanto que o xilitol desidrogenase (XDH) requer NADP^+ . Assim, a conversão de D-xilitol ocorre em dois passos, um passo de redução, seguido por um passo de oxidação. Inicialmente a D-xilose é reduzida para D-xilitol por NADPH e, subsequentemente, este metabólito é oxidado para D-xilulose por NADP^+ ; com estas duas reações consideradas limitantes na fermentação de D-xilose para produção de D-xilitol. Quanto à conformação espacial da xilose redutase, estudos recentes comprovaram que são possíveis diversos tipos de estruturas da XR, podendo ser monomérica ou dimérica (PAL et al., 2013).

Figura 5 – Estrutura da xilose redutase.



Fonte : Segundo Wilson et al. (2003).

3.4 RECUPERAÇÃO DAS ENZIMAS

Após a fermentação, as biomoléculas produzidas por microrganismos passam por um conjunto de operações unitárias para a recuperação e purificação (*downstream processing*). A importância dessa etapa se dá pela obtenção de produtos de alta pureza, representando um percentual alto no custo de produção. Com isso, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas, mais eficazes e econômicas, que alcancem altos graus de recuperação e purificação, mantendo a atividade biológica da enzima. Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de biomoléculas, tais como: precipitação, extração com solventes e filtração; estas apresentam alto poder de concentração e baixa purificação. As mais modernas como a cromatografia de afinidade, troca iônica ou gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, possibilitam a maior taxa de recuperação e purificação (BUYEL et al., 2015).

A escolha do método depende das características de cada enzima e do grau de pureza desejado. A tecnologia de purificação desses biocompostos foi desenvolvida lentamente em comparação com a tecnologia de produção, em detrimento da complexidade do sistema e a necessidade de manter a biomolécula com atividade biológica (MUTHIAH, 2011).

3.5 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABs)

Considerando o fato de que o processo de separação e purificação deve ser simples, econômico e evitar sucessivas etapas, é que a partição de biomoléculas em

sistema aquoso bifásico tem se revelado como uma alternativa bastante eficiente para estes a recuperação destes bioprodutos, além das fases serem compatíveis com a maioria das proteínas conhecidas. Vale ressaltar que quanto mais etapas forem necessárias para a purificação menor será a recuperação protéica (RODRÍGUEZ-DURÁN, et al., 2013).

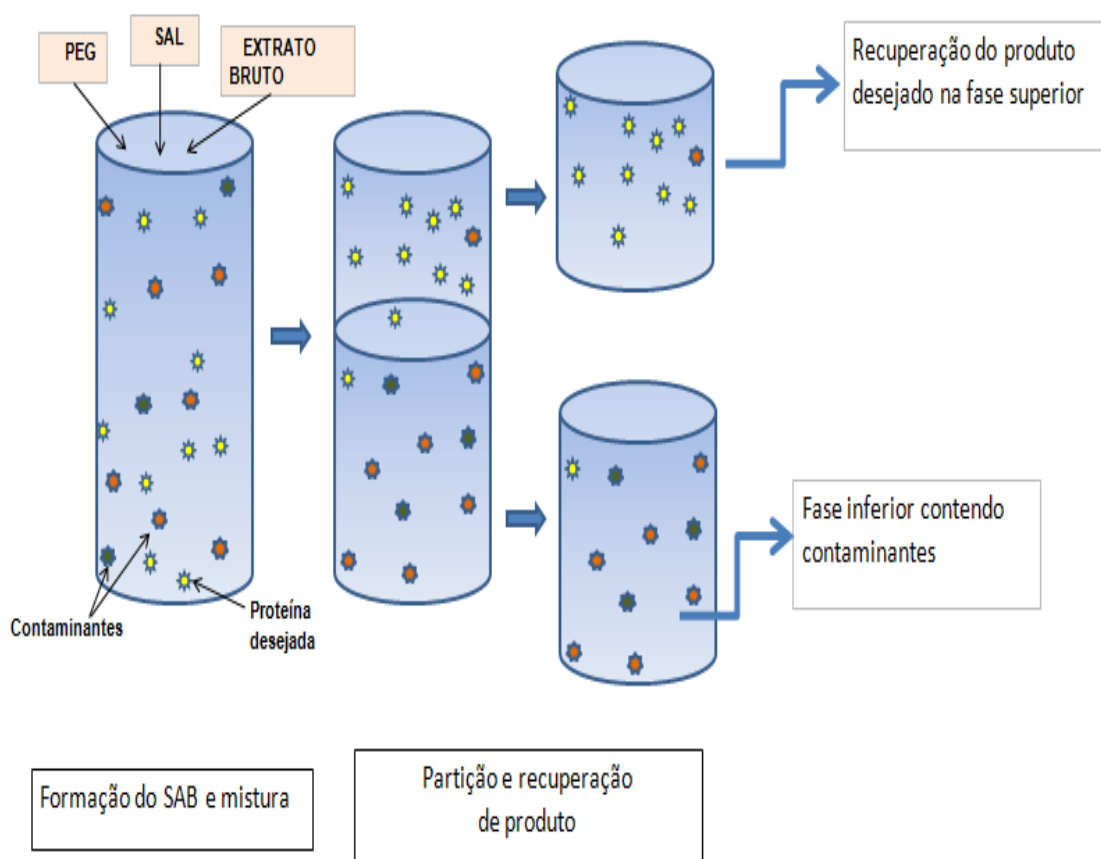
De acordo com Selvakumar et al. (2010) as vantagens deste sistema são: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes.

Os SABs são formados pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros quimicamente distintos ou um polímero e um sal. A utilização dessa técnica tem sido usada na separação e purificação de materiais biológicos tais como: proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, vírus, anticorpos e organelas celulares. É um método de extração líquido - líquido que emprega duas fases aquosas (AMID et al., 2012; RAJA et al., 2011).

Os polímeros e os sais são solúveis em água, porém são imiscíveis entre si e por isso, podem ser separados em duas fases quando se encontram em contato. As fases do sistema estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao equilíbrio entre fases. Onde, uma das fases neste sistema é rica em polímero e a outra no outro polímero ou sal. O maior constituinte destes sistemas é a água, o que proporciona para as biomoléculas um ambiente ameno, evitando assim as mudanças em suas estruturas. Outra vantagem é a manutenção das atividades biológicas. (Da SILVA, 2006).

A aplicação de SABs se inicia com a preparação do sistema e a adição da mistura a ser separada. Após homogeneização, é realizada por sedimentação, gravidade ou por centrifugação, a separação das fases. As fases são coletadas e utilizadas para recuperar os produtos de interesse separados da mistura inicial. Quando a mistura a ser particionada é um extrato fermentado bruto, ocorre a distribuição das biomoléculas e fragmentos de células entre as fases (Figura 6). Sendo adequadas as condições operacionais, a tendência é que a proteína alvo se concentre em uma das fases e os fragmentos de células e proteínas não desejadas (contaminantes) migrem para a outra fase (RAJA et al., 2011).

Figura 6 – Extração em sistema aquoso bifásico.



Fonte: Proposto por Sousa (2014).

Dentre os vários tipos de sistemas bifásicos aplicados na recuperação de enzimas, destacam-se os formados por dois polímeros de cadeia flexível. São exemplos os sistemas pelos polímeros PEG (polietileno glicol) e dextrana e os que contêm PEG e um sal inorgânico (sulfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, carbonato de sódio, entre outros). Atualmente, os sais orgânicos como os citratos, tartaratos, succinatos também estão sendo usados na formação destes sistemas com sucesso (CUNHA, 2008).

3.6 ESTADO DA ARTE

3.6.1 Produção de enzimas xilanases

O estudo de RAFIQUIL & SHAKINAH (2014) analisou a produção de xilose redutase a partir da levedura *Candida tropicalis* adaptada ao cultivo em hidrolisado de

serragem. A fonte de carbono para o crescimento de levedura, bem como para a produção de xilose redutase (XR), foi a xilose da serragem de madeira. A XR apresenta potencial de aplicação na bioprodução de vários produtos de alto valor, especialmente xilitol. A enzima isolada foi caracterizada com base na atividade enzimática, estabilidade e constantes cinéticas. A atividade de XR bruta dependente de NADPH foi de 11,16 U / mL. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,0-7,0 e temperatura de 25-40 ° C durante 24 h, mantendo sua atividade original acima de 95% após 4 meses de armazenamento a -80 °C.

SILVA et al. (2015) avaliaram a purificação e a caracterização de xilanasas provenientes de *Trichoderma inhamatum*. Os autores comprovaram a estabilidade das enzimas com a variação de pH e temperatura. As xilanasas estudadas se mostraram estáveis numa vasta gama de pH, entretanto as condições ótimas para sua atividade foram de 50 °C e pH 5,0. A técnica aplicada na purificação das enzimas foi a cromatografia, sendo as enzimas obtidas em fator máximo de purificação de 5,3 vezes em relação ao extrato enzimático bruto.

3.6.2 Recuperação de xilanasas com sistemas aquosos bifásicos

LOUREIRO et al. (2017) estudaram a recuperação da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* em sistemas aquosos bifásicos. Os autores avaliaram a estrutura e a atividade total das xilanasas em diferentes sistemas compostos de PEG e sal submetidos a variações de temperatura. O objetivo foi estudar como a estrutura natural da enzima é afetada para entender o comportamento de partição da xilanase no SAB utilizado. Como resultado, verificaram que a presença de PEG de diferentes massas molares alterou ligeiramente a estrutura nativa da xilanase, embora a sua atividade catalítica não tenha sido afetada. Todos os polímeros testados protegeram a estrutura e a atividade catalítica da xilanase contra as variações de temperatura, apenas o experimento com PEG1000 apresentou uma degradação da enzima na temperatura de 70 °C. Assim, constataram que o aumento da massa molar do PEG induz uma diminuição na solubilidade da proteína na fase onde se encontra. Com isso, o efeito de volume excluído também impulsiona a divisão de xilanasas entre as duas fases.

RAHIMPOUR et al. (2016) analisaram a metodologia de superfície de resposta e modelagem de um sistema aquoso de duas fases (fosfato/PEG) na purificação de xilanase recombinante altamente termoestável e alcalina. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para desenvolver modelos preditivos de simulação e otimização

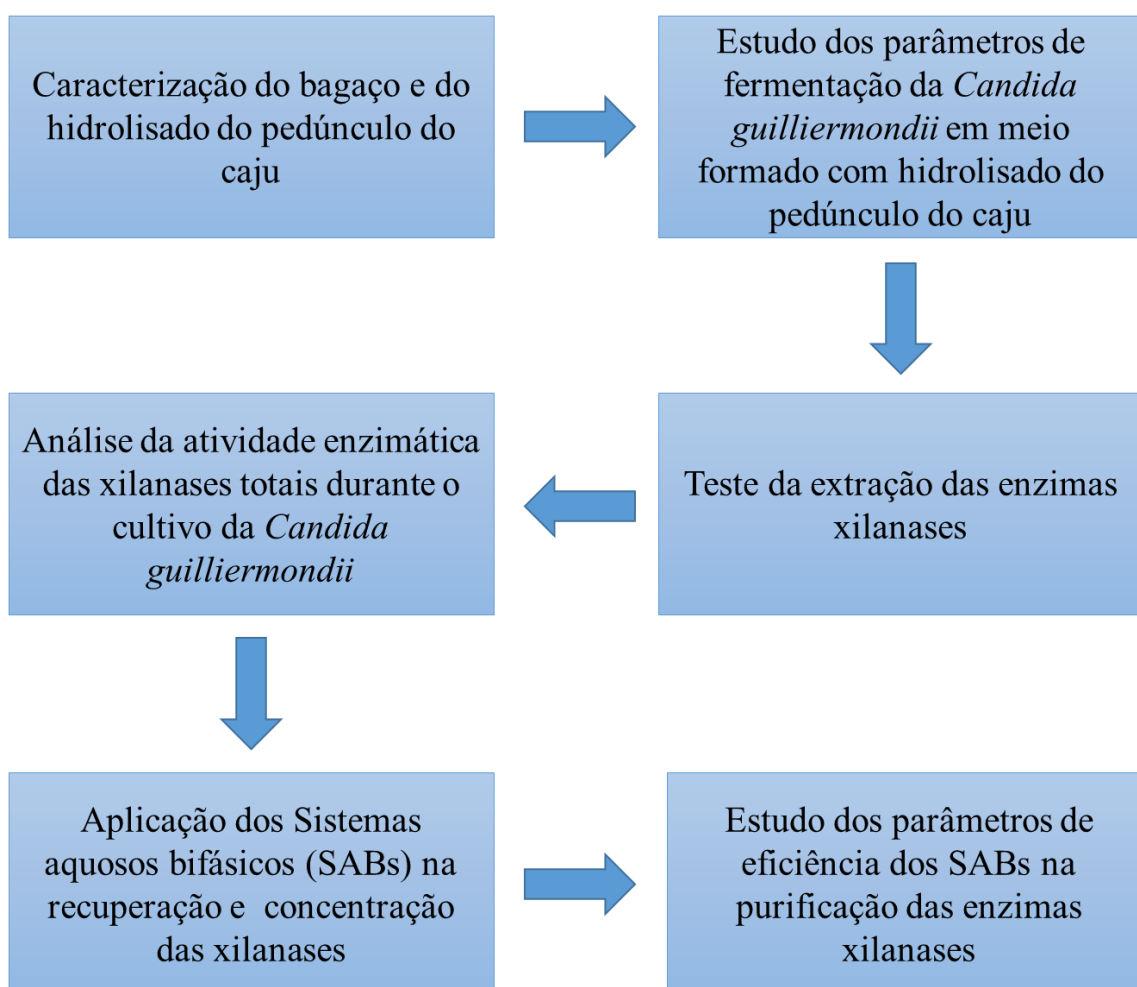
do processo de purificação. Os efeitos do pH, peso molecular de PEG e concentrações de fosfato foram estudados utilizando um desenho composto central de experiências. Foram feitas duas etapas de purificação; a melhor purificação da primeira etapa foi obtida utilizando 6% de PEG 6000, 20% de fosfato e pH 6. Já para a segunda etapa, extração ótima foi obtida em 10% de fosfato, 10% de NaCl e pH 10. Após as separações de fase nos dois estágios, cerca de 78% da atividade enzimática original foi recuperada e a atividade específica da enzima purificada foi aumentada em um fator de 6,7 vezes.

A extração por SABs da xilanase de origem fúngica, em sistema PEG/fosfato, com otimização pela abordagem Box-Behnken, foi estudada por GARAI & KUMAR (2013). A pesquisa produziu a xilanase alcalina em fermentação submersa por *Aspergillus candidus* foi usado para a composição do sistema de duas fases aquosas, o PEG de massa molar 4000 e o Fosfato de sódio. Foi adotado um design de Box-Behnken para otimizar fatores críticos como peso molecular de PEG, concentração de PEG e concentração de sal de fosfato e para aumentar a purificação de xilanase. O fator de purificação enzimática máximo foi encontrado na presença de baixo peso molecular de PEG (4000), concentração intermediária de PEG (8,66% p / p) e alta concentração de sal (22,4% p / p). Sob condições otimizadas, o fator de purificação foi aumentado em três vezes, o coeficiente de partição foi 8,41 e o rendimento enzimático na fase superior foi de 88,10%.

4 ABORDAGEM METODOLÓGICA

Os ensaios experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Bioengenharia, Laboratório de Química de Alimentos e Laboratório de Flavor da Universidade Federal da Paraíba (UFPB); sendo desenvolvidas as seguintes etapas (Figura 7): obtenção da matéria-prima e do licor hidrolisado, caracterização do licor, produção da enzima xilose redutase, recuperação da enzima xilose redutase.

Figura 7 – Etapas do projeto de pesquisa.



4.1 MATÉRIA-PRIMA

O bagaço do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale L.*) e o licor pré-hidrolisado deste resíduo foram as matérias-primas utilizadas na pesquisa. O bagaço do pedúnculo do caju foi adquirido na indústria de produção de polpa de fruta IDEAL, localizada em João Pessoa – PB. As etapas de preparação da matéria prima seguiram os procedimentos descritos por Medeiros et al. (2016).

4.2 OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO LICOR PRÉ-HIDROLISADO

O licor hidrolisado utilizado nesta pesquisa foi proveniente das melhores condições de hidrólise determinadas conforme Medeiros et al. (2016), que analisaram as melhores condições de hidrólise ácida variando a temperatura, a concentração de ácido e a proporção entre o bagaço e solução ácida.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para caracterização do bagaço de pedúnculo do caju seco foram realizadas análises de composição lignocelulósica, através de determinações das concentrações de celulose, lignina e hemicelulose. As análises físico-químicas consistiram da determinação do teor sólidos solúveis (°Brix), pH, umidade e açúcares redutores (BRASIL, 2008).

4.3.1 Umidade relativa

O teor de umidade do bagaço de pedúnculo de caju foi medido com o uso de secagem direta a 105 °C. Inicialmente se pesou 3 gramas do bagaço em cápsula previamente seca e tarada. A análise foi feita em triplicata, sendo as amostras inseridas na estufa para secagem direta até obtenção de peso constante. Atingido o peso constante, as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente, em seguida pesadas. (BRASIL, 2008). A umidade foi determinada com base na seguinte fórmula:

$$Umidade(\%) = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (1)$$

4.3.2 Cinzas

Para determinação da concentração de cinzas, foram utilizados cadinhos de porcelana vazios e de peso determinado após 24h de secagem em estufa a 105 °C. A massa de 2 gramas da amostra foi pesada nos cadinhos, em seguida as mesmas foram levadas para serem carbonizadas em chapa aquecedora (na capela) até que não fosse produzida mais fumaça. Após esse processo as amostras foram levadas para incineração na mufla à temperatura de 550 °C até a obtenção de cinzas brancas ou de cor clara. A

pesagem desse material foi feita após o resfriamento no dessecador até temperatura ambiente (BRASIL, 2008). O percentual de cinzas foi obtido pela fórmula:

$$\text{Cinzas(\%)} = \frac{\text{peso final da amostra}}{\text{peso inicial da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

4.3.3 Proteínas

A determinação do teor de proteína total foi realizada com base no método de Kjeldahl, que relaciona o teor de nitrogênio total com o teor de proteína no material analisado. Para relacionar o resultado do teor de nitrogênio total obtido com o teor de proteína foi utilizado fator de correção 6,25 (BRASIL, 2008).

4.3.4 Determinação de proteína solúvel

A determinação do teor de proteínas solúveis em cada fase foi feita utilizando o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado com 0,05g de Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolvido em 50 mL de álcool etílico a 95%. Foi adicionado 50 mL de ácido fosfórico P.A. Após homogeneização, foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL, o qual foi aferido com água destilada e deixado overnight sob agitação constante. Após este período foi transferido para um vidro escuro protegido com papel alumínio e armazenado na geladeira.

Foi feita uma curva de calibração utilizando-se albumina sérica bovina (BSA da MERCK) como padrão, na concentração inicial de 0,1 g/mL. Para a leitura, 0,5 mL de cada amostra foi adicionada a 5,0 mL do reagente de Bradford. Após 15 minutos de repouso à temperatura ambiente, foi medida a absorbância das amostras em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Foi preparado o branco com uma solução de albumina a 0,1 mg/L e feita as respectivas diluições. Após as leituras, foi construída a curva de calibração, plotando-se a absorbância X concentração. A inclinação da reta foi usada no cálculo da concentração de proteínas das amostras das fases. A concentração de proteínas foi determinada pela Equação 3.

$$C = Abs \times F \times d \quad (3)$$

Onde: C = concentração de proteínas solúveis na fase, em mg/mL; Abs = absorbância das amostras em 595 nm; F = coeficiente angular da curva de calibração; d = diluição da amostra.

4.3.5 Extrativos

Para determinar o teor de extrativos, foram pesados 5 gramas do bagaço do caju seco e transferidos para um cartucho de papel de filtro. Em seguida esse cartucho foi colocado em um aparelho extrator de Soxhlet. Para extração dos materiais gordurosos da amostra, foi usada uma solução formada por uma mistura dos solventes ciclohexano e etanol na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram mantidas em aquecimento durante aproximadamente 6 horas, usando uma temperatura que garantisse que a mistura de solventes passasse por pelo menos 24 refluxos nesse período. Foi necessário o conhecimento do peso do balão que continha a solução solvente, para isto o mesmo foi previamente aquecido por 1 hora em estufa a 105 °C, resfriado em dessecador por 30 min e posteriormente pesado.

Após a extração, foram retirados os cartuchos dos tubos, e o solvente foi recuperado até um pequeno volume, evaporado com cuidado para não queimar a gordura. Posteriormente, o balão com o resíduo foi colocado em estufa a 105 °C até atingir peso constante. O balão foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. A amostra seca e desengordurada foi acondicionada para as análises lignocelulósicas (MORAIS, et al., 2010).

4.3.6 Determinação de lignina

Foi pesado 2 g da amostra moída, livre de extrativos e de umidade. Em seguida, essa massa foi macerada juntamente com 17 mL de ácido sulfúrico 72%, resfriado previamente em geladeira em torno de 10 °C. Esse procedimento foi feito no almofariz de porcelana com o auxílio de um pistilo, por 15 minutos. Após esse período a amostra foi deixada em repouso durante 24 horas.

Transcorrido o tempo de 24 horas para digestão, foram acrescentados 306 mL de água destilada ao almofariz visando diluir a concentração do ácido sulfúrico para 4%. O material em seguida foi filtrado com o auxílio de vácuo, em sistema montado com um kitassato de 2000 mL acoplado ao filtro de buchner e papel filtro previamente seco e pesado. Foi importante garantir que a massa retida no papel de filtro fosse enxaguada com água destilada até que o pH ficasse próximo a neutralidade. A seguir, o papel foi transportado para estufa a 105 °C, até obtenção de peso constante (MORAIS, et al., 2010). A fórmula usada para obtenção do percentual de lignina da amostra foi a seguinte:

$$\%Lignina = \left(\frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra})}{2g} \right) \times 100 \quad (4)$$

4.3.7 Determinação de holocelulose

Em um erlenmeyer de 1000 mL foram adicionados 3 gramas do bagaço do pedúnculo do caju seco e livre de extrativos e 120 mL de água destilada. Ao erlenmeyer, foram acrescentados 2,5 gramas de clorito de sódio (NaClO₂) e 1 mL de ácido acético glacial. A mistura ficou sob agitação com massa magnética durante todo o procedimento, que foi realizado na capela com exaustor, onde foi montado um banho-maria de forma a manter a temperatura em 70 °C. Foi usado um erlenmeyer de 25 mL para fechar o erlenmeyer de 1000. Após 1 hora, foram adicionados novamente 2,5 gramas de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético e garantida a manutenção da temperatura de 70 °C por mais 1 hora. Foi feita então, pela terceira vez, a adição de 2,5 gramas de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético. Passadas 3 horas, os erlenmeyers foram levados ao banho de gelo coberto além da altura do conteúdo. As amostras foram mantidas no banho de gelo por 30 minutos. Com o resfriamento completo, foram levadas ao sistema de filtração a vácuo, onde cada amostra foi lavada com água destilada até atingir pH neutro. O papel com o material retido foi transportado para estufa a 105 °C até estabilização do peso (MORAIS, et al., 2010). A percentagem de holocelulose foi calculada pela fórmula:

$$Holocelulose (\%) = \frac{(\text{massa holocelulose} \div \text{massa amostra})}{(1 - 0,0725) \times (1 - 0,0951)} \times 100 \quad (5)$$

4.3.8 Determinação de alfa-celulose

Inicialmente foi pesado 1 grama do material seco retido da análise de holocelulose e disposto em almofariz, à temperatura ambiente. Foram adicionados 15 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 17,5%, aguardou-se 2 minutos de contato entre a solução e a celulose, e então, procedeu-se a maceração do material por 8 minutos. Ao término desse tempo, foram adicionados 40 mL de água destilada. O conteúdo foi transferido do almofariz para o funil de buchner com papel de filtro sob agitação constante para evitar a perda do precipitado. O almofariz foi lavado com mais água destilada e transferido para o funil; em seguida, o material foi filtrado com o auxílio de bomba a vácuo com o intuito de agilizar o processo. A princípio foi utilizado

o papel de filtro quantitativo seco em estufa a 105 °C e guardado em dessecador por 30 minutos, depois o papel foi pesado em balança analítica (MORAIS, et al., 2010). A percentagem de alfacelulose foi obtida pela seguinte equação:

$$\text{Alfacelulose (\%)} = \frac{(\text{massa alfacelulose} \div \text{massa amostra})}{(1 - 0,0798) \times (1 - 0,1489) \times (1 - 0,0951)} \times 100 \quad (6)$$

4.3.9 Determinação de hemicelulose

A determinação do teor de hemicelulose foi feita por subtração dos valores expressos ao término do cálculo de holocelulose e alfa-celulose (MORAIS, et al., 2010), conforme descrito na Equação abaixo:

$$\text{Hemicelulose (\%)} = (\% \text{Holocelulose} - \% \text{Alfacelulose}) \quad (7)$$

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LICORES E FERMENTADOS

Para a caracterização dos licores usados na pesquisa, assim como a caracterização dos cultivos fermentativos (consumos dos substratos e formação dos produtos da fermentação), utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

Com isso a determinação dos teores de açúcares no licor e nos cultivos fermentativos (xilose, glicose e arabinose, entre outros), dos inibidores da fermentação (ácido acético, 5-Hidroximetilfurfural e furfural) provindos do aquecimento ao qual o licor foi submetido, assim como dos produtos gerados da fermentação, foram feitos com o uso de um cromatógrafo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da marca VARIAN. Esse equipamento continha a ele acoplado um detector de índice de refração (Varian 356 – LC) e uma coluna Hi-Plex H (8 µm 300mm x 7.7 mm. UV-284nm).

As amostras (20 µL) foram investigadas por injeção numa fase móvel de água ultrapura, sob fluxo de 0,6 mL/min a temperatura de 65°C, com tempo de análise de 1 hora. Os cromatogramas gerados das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e inibidores analisados, sendo a quantificação feita com base na área do composto em uma curva de calibração específica para cada composto.

Na preparação das amostras, as mesmas foram diluídas na proporção de 1:10 com água ultrapura e homogeneizadas. Em seguida foram filtradas em filtro “Sep-Pack” C18 (Millipore) e ainda por membrana de acetato celulose do tipo CHROMAFIL com

poros de 0,45 μm (Waters associates – Millipore), seguidamente da filtração em membrana com poros de 0,22 μm . O pH de todas as amostras injetadas, medido em pHmetro modelo Tec-3MP (Tecnal, Campinas, SP, Brasil), estava na faixa determinada pela fabricante como segura para aplicação em coluna Hi-plex H.

4.5 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO

4.5.1 Cultivo do microrganismo

A levedura utilizada na pesquisa foi a *Candida guilliermondii* CCT 1516, obtida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosselo – FAT localizada em Campinas. A levedura foi mantida liofilizada a temperatura de 28 °C até o momento da reativação.

Para a reativação das células foi adicionado 0,2 mL de água destilada esterilizada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na ampola com a levedura liofilizada, em ambiente estéril. Em seguida, foi realizada uma suspensão das células, deixando reidratar por aproximadamente 10 e 15 minutos. Após este período, todo o conteúdo foi transferido da ampola para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL do meio de cultura líquido Yeast-Malte Extract e incubado a 28 °C, por 10 dias. A partir da cultura em caldo, foi realizado um repique em placa de Petri contendo meio de cultura YMA (Yeast-Malte Extract Agar) e incubado a 28 °C durante 48 h. Após a multiplicação, as placas de Petri contendo os microrganismos foram armazenadas em refrigeração a uma temperatura de 2 a 8 °C.

4.5.2 Preparo do inóculo

Em todos os experimentos foram usadas células da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516, foram transferidas em condições assépticas com o auxílio de uma alça de platina, das placas de Petri para tubos contendo 3 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa suspensão foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo semissintético (FELIPE, et al., 1997; CHAUD, et al., 2010), como expresso na Tabela 1.

Os erlenmeyer contendo 50 mL do meio semissintético (pH 5,5), juntamente com a suspensão da levedura foram incubados a 30 °C em agitador rotativo tipo shaker (LOGEN SCIENTIFIC) a 200 rpm durante 24 horas.

Após esse período as células foram separadas por centrifugação a 2000 x g por 30 min e ressuspensas em água destilada esterilizada. A partir desta suspensão foi calculado o volume da mesma para a inoculação de concentração celular inicial desejada para ser empregada como inóculo. O cálculo realizado para inocular no meio de cultivo uma concentração inicial de 1g/L.

Tabela 1 - Composição do meio semissintético utilizado para crescimento do inóculo.

	Composição (g/L)
Xilose	30,0
Sulfato de amônio	3,0
Cloreto de Cálcio	0,1
Extrato de farelo de arroz	20,0

Para a preparação do extrato farelo de arroz foram pesados 200 g de farelo e diluídos em 1 L de água destilada, em seguida a solução foi autoclavada durante 15 min a 111 °C – 0,5 atm com posterior centrifugação por 15 min em condições assépticas a 2000 x g (Excelsa II Centrifuge – 206 BL - FANEM). O sobrenadante foi usado como solução de extrato de farelo de arroz (DALANHOL, 2014).

4.5.3 Cultivo com meio de hidrolisado de pedúnculo de caju

Os cultivos feitos com o hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju foram realizados em erlenmeyer de 1000 mL. O meio de cultura foi preparado com suplementos que atendessem as necessidades nutricionais da levedura *C. guilliermondii* (Tabela 2). Em comparação com os cultivos semissintéticos a xilose comercial adicionada foi substituída pelo licor hidrolisado. Os cultivos foram feitos com o volume de 600 mL de meio, sendo coletados para análises diversas, o volume máximo de 20% do total. Após esterilização o meio foi inoculado com 3g/L de células, preparadas no pré-inóculo. O processo fermentativo foi realizado na mesa agitadora tipo Shaker, com temperatura controlada de 30 °C e agitação de 200 rpm, sempre em duplicata. As amostras foram retiradas nos intervalos planejados inicialmente de 4 em 4 horas com término de 72 horas (LIMA, 2013).

Tabela 2 - Composição do meio semissintético utilizado para crescimento do inóculo.

	Composição (g/L)
Sulfato de amônio	3,0
Cloreto de Cálcio	0,1
Extrato de farelo de arroz	20,0

4.5.4 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi obtida através de elaboração de uma curva baseada no dados de massa seca de células coletadas durante o cultivo. Nos tempos planejados para coleta das amostras do cultivo, foram retiradas duas alíquotas de 2 mL de cada replicata do cultivo, em eppendorf. Inicialmente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga MINISPIN) por 10 min. Foi feito o descarte do sobrenadante e uma lavagem com água destilada. Em seguida os eppendorfs foram levados para estufa a 105 °C por 24 h.

4.6 RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA

4.6.1 Obtenção de concentrado celular

Após a fermentação, as células de *Candida guilliermondii* CCT 1516 foram coletadas e centrifugadas para o rompimento celular. A metodologia de rompimento realizada foi adaptada da descrição feita por Branco (2011). Fez-se uma suspensão celular com tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) de concentração de 15 g.L⁻¹. Colocou-se em tubo tipo *falcon* (15 ml) um volume de 3 mL de esferas de vidro mais 3 mL da suspensão celular. Em banho de gelo as amostras foram resfriadas e em seguida levadas à agitação em vórtice. A agitação foi feita por 1 minuto seguido do mesmo tempo de resfriamento, sendo repetido esse procedimento seguidamente por 5 vezes. Uma posterior centrifugação refrigerada a 10000g por 15 minutos foi responsável por separar os fragmentos celulares. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em temperatura de congelamento, sendo este o extrato enzimático bruto.

4.6.2 Preparação de sistemas de duas fases aquosas

Para o estudo da recuperação das xilanases por meio de SABs, foram testados sistemas formados por Polietilenoglicol de massa molar 1500 (PEG 1500), que

apresenta de acordo com a literatura, resultados relevantes para a recuperação das enzimas xilanases, e tampão fosfato de potássio à temperatura ambiente (25 °C).

Para melhorar a dissolução, os polímeros foram colocados em estufa a 50 °C e os sais à 105 °C, até peso constante. Em tubos de centrífuga de graduação 15 mL foi realizada a preparação dos sistemas aquosos bifásicos. As massas de fosfato de potássio, PEG 1500, mais o extrato enzimático fermentado do bagaço do pedúnculo do caju somou um total de 10 g.

A solução tampão fosfato de potássio de pH 6,5 foi constituída de uma mistura de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 na razão de 1087 (p/p). Os valores das massas usadas em todos os ensaios foram baseados no planejamento experimental contida na Tabela 3.

Os sistemas foram agitados de forma suave e centrifugados, sempre evitando o mínimo de perturbação. Os tubos foram mantidos em repouso por 24 horas à temperatura média de 25 °C. No recolhimento das fases foram feitas análises de caracterização dos sistemas, determinando-se os valores de volume, densidade, massa, atividade de xilanases e teor de proteínas solúveis.

Para o cálculo do volume das fases, o volume total foi anotado assim como o volume da interface entre as fases. Com a diferença entre o volume total e o volume inferior foi obtido o valor do volume da fase superior do sistema aquoso bifásico. A Equação 8 determina a razão entre os volumes das fases superior e inferior.

$$RF = \frac{Vfs}{Vfi} \quad (8)$$

Onde: Vfs: volume da fase superior; Vfi: volume da fase inferior.

Com o auxílio de uma seringa com agulha, a fase superior de cada sistema foi coletada, sendo deixado pequeno volume sobre a interface para evitar coleta da fase inferior. A coleta da fase inferior foi realizada de forma similar, porém a seringa foi inserida no líquido inferior com o êmbolo levemente puxado de modo que houvesse um pouco de ar dentro seringa. Antes da sucção do volume desejado, o ar presente foi expulso vagarosamente dentro do líquido. Uma pequena bolha de ar foi mantida na agulha e expelida na fase inferior antes da coleta.

A densidade das fases foi determinada com a massa do volume de cada fase, obtida em balança analítica e calculada segundo a Equação 9.

$$\rho = m.V \quad (9)$$

Onde: m = massa da alíquota tomada da fase (g); V = volume da alíquota tomada da fase (mL).

4.6.3 Determinação dos parâmetros de recuperação

O coeficiente de partição (K_p) das proteínas foi calculado pela razão entre a concentração de proteína total na fase superior e na fase inferior (Equação 10). E o coeficiente de partição (K_e) da XR é a relação entre a atividade enzimática nas fases superior e inferior (Equação 11).

$$K_p = \frac{C_s}{C_i} \quad (10)$$

$$K_e = \frac{A_s}{A_i} \quad (11)$$

Onde: C_s e C_i : concentrações de proteína total em mg/mL nas fases superior e inferior, respectivamente; A_s e A_i : atividades enzimáticas nas fases superior e inferior, respectivamente.

O processo de recuperação foi avaliado através dos cálculos de atividade enzimática específica (AS) em U/mg (Equação 12), Fator de purificação (FP) (Equação 13), Recuperação de enzimas na fase superior (RS) (Equação 14), Recuperação de enzimas na fase inferior (RI) (Equação 15) e Fator de concentração (FC) (Equação 16).

$$AS = A/C \quad (12)$$

Onde: A = atividade enzimática; C = concentração de proteínas.

$$FP = AS_{\text{fase}}/AS_{\text{extrato}} \quad (13)$$

Onde: AS_{fase} = atividade enzimática na fase em estudo; AS_{extrato} = atividade enzimática específica do extrato após a operação de extração enzimática.

$$FC_{\text{fase}} = A_{\text{fase}} / A_{\text{extrato}} \quad (14)$$

Onde: A_{fase} = atividade enzimática na fase em estudo; A_{extrato} = atividade enzimática no extrato.

$$R_S(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_I}{V_S} \times \frac{1}{K}\right)} \quad (15)$$

$$R_I(\%) = \frac{100}{1 + K \cdot \frac{V_I}{V_S}} \quad (16)$$

Onde: V_I e V_S = volumes das fases superior e inferior; K = coeficiente de partição de atividade enzimática.

4.6.5 Avaliação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática de xilanase total foi adicionado 1,9ml de solução de xilana 1% (pH 5,5) e 0,1ml de amostra (extrato enzimático) em tudo de ensaio. Os tubos foram mantidos a 50 °C por 10 minutos em banho com controle de temperatura para aceleração da reação enzimática. Após esse período a reação foi interrompida com banho de gelo.

Desta solução, 0,5 mL foi coletado e adicionado 1 mL do reagente DNS, em seguida foi feito o aquecimento em banho de água fervente (100 °C) por 5 minutos. Após esse tempo reação foi interrompida imediatamente com banho de gelo. Diluiu-se com 2mL de água destilada e foi então lida a absorbância em espectrofotômetro a 545nm, contra um branco reacional (sem os processos de aquecimento). A curva padrão foi feita a partir de xilose nas concentrações entre 0,2 e 1,0 g.L⁻¹.

Foi respeitada a definição que uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de xilose por minuto, a 50 °C e pH 5,5. As atividades foram calculadas de acordo com a Equação 17.

$$U / ml = \frac{ART (mg / ml) \times V_T (ml)}{T_H (\text{min}) \times V_E (ml) \times 0,15013} \quad (17)$$

Onde ART = Concentração de açúcar redutor; V_T = volume total do reator; T_H = tempo de hidrólise; V_E = volume de enzima e 0,15013mg (1 μ mol de xilose).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos estudos de produção e recuperação de xilanase total, a partir do uso dos sistemas aquosos bifásicos foi utilizada a metodologia de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta.

Visando a redução da quantidade de experimentos a serem realizados e uma melhor avaliação dos resultados obtidos, foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios (Tabela 3), sendo estes realizados de forma aleatória para avaliar a influência e das concentrações do PEG 1500 (X_1) e do fosfato de potássio (X_2) sobre os parâmetros de coeficiente de partição na fase superior (Y_1), coeficiente de partição na fase inferior (Y_2), fator de purificação na fase superior (Y_3), fator de purificação na fase inferior (Y_4), recuperação na fase superior (Y_5), recuperação na fase inferior (Y_6).

Tabela 3 – Planejamento experimental 2^2 com três pontos centrais para a investigar a eficiência do SAB na recuperação de xilanases.

Ensaio	PEG 1500 (g)	Fosfato de potássio (g)	Extrato enzimático (g)
1	1,6 (-1)	1 (-1)	7,4
2	2,4 (1)	1 (-1)	6,6
3	1,6 (-1)	1,3 (1)	7,1
4	2,4 (1)	1,3 (1)	6,3
5	2 (0)	1,15 (0)	6,85
6	2 (0)	1,15 (0)	6,85
7	2 (0)	1,15 (0)	6,85

Utilizou-se uma regressão linear para determinar os efeitos principais das variáveis e suas interações assim como dados relativos à Análise de variância (ANOVA) e gerar também as superfícies-resposta do fator de purificação e recuperação das enzimas xilanases.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. L.; SILVA JUNIOR, I. J.; MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**. v. 49, p. 1779–1789. 2014.
- ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; MARQUES JUNIOR, J. E.; SILVA JUNIOR, I. J.; ROCHA, M. V. P. Produção de xilitol a partir do bagaço de caju por *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**. v. 255, p. 33-40. 2015.
- AMID, M.; SHUHAIMI, M.; SARKER, M. Z. I.; MANAP, M. Y. A. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v.132, p. 1382–1386, 2012.
- BIER, M. C. J. et al.; Crescimento e consumo de xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**, Joaçaba. v.7, p.119-130, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** n.72, p.248-254, 1976.
- BRANCO, R. F. Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção. **Universidade Federa de São Paulo: Escola de engenharia de Lorena**. Lorena, São Paulo. 2010.
- BUYEL, J. F.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 902–913, 2015.
- CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Obtaining biotechnological xylitol from eucalyptus chips. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 3, p.323-331, 2002.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A.; Strategies for inoculum preparation prior to xylitol bioproduction from wheat straw hydrolysate. **Brazilian Journal of food technology**. 5° SIPAL, 2005.
- CASSALES, A. R. Otimização da hidrólise da casca de soja (*glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- CUNHA, E. V.C. Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + PEG 8000 + sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica. Dissertação (Mestrado em engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 2008.
- CUNHA, M. A. A; SILVA, S. S; CARVALHO, W; SANTOS, J. C. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de

Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 26, n. 1, p. 61-70, jan./mar. 2005.

DA SILVA, L. H. M.; Sistemas aquosos bifásicos; Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v.29, n.6, p. 1345-1351, 2006.

DALANHOL, K. C. F. Avaliação do desempenho das leveduras *Candida Guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. Dissertação (mestrado). 71 p. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 2014.

EMBRAPA. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fr3sbpu402wyiv80084arlaeog5af.html> acesso em agosto de 2015. Autor : Raimundo Marcelino da Silva Neto.

GARAI, D.; KUMAR, V. Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanase in peg/phosphate system: optimization by box-behnken design approach. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, abr. 2013. v. 2, n. 2, p. 125–131. 2013.

GOMES, S. D. L; ALBUQUERQUE, T. L; JUNIOR, J. E. M; GONÇALVES, L. R. B; ROCHA, M. V. P. Produção de xilitol e etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de caju. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. v.1, p. 683-688. 2014.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1500-1503, 2009.

JIANG, T.; ZHANG, Q.; WANG, T.-J.; ZHANG, Q.; MA, L.-L. High yield of pentane production by aqueous-phase reforming of xylitol over Ni/HZSM-5 and Ni/MCM22 catalysts. 2012.

KIRILIN, A. V.; TOKAREV, A. V.; MANYAR, H.; et al. Aqueous phase reforming of xylitol over Pt-Re bimetallic catalyst: Effect of the Re addition. **Catalysis Today**, v. 223, p. 97–107, 2014.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.35, p.377-391, 2008.

LEE H.-J., KIM S.C., KIM J., DO A., HAN S.Y., LEE B.D., LEE H.H., LEE M.C., LEE S.H., OH T., PARK S., HONG S.-H. Synergistic inhibition of Streptococcal biofilm by ribose and xylitol. **Archives of Oral Biology**, Volume 60, Issue 2, 15 November 2014, Pages 304-312

LIMA, F.C. S.; SILVA, F.L.H.; GOMES, J.P. **Produção de xilitol utilizando licor da pré-hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo do caju**. Tese (Doutorado) 130p, Universidade Federal de Campina Grande, 2013.

LOUREIRO, D. B. *et al.* Partitioning of xylanase from *thermomyces lanuginosus* in peg/nacit aqueous two-phase systems: structural and functional approach. **Protein expression and purification**, jan. 2017. v. 129, p. 25–30. 2017.

MA P., T. LI, W. WU, D. SHI, F. DUAN, H. BAI, DONG W., CHEN M. Poli Novel (xilitol sebacate) / hidroxiapatita bio-nanocompósitos via síntese de uma etapa. **Degradação de Polímeros e Estabilidade**, Volume 110, páginas 50-55, 2014.

MATEO, S; PUENTES, J. G; MOYA, A. J; Sánchez, S. Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. **Bioresource Technology**. v. 190, p. 1-6. 2015.

MEDEIROS, Lorena Lucena de. Ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado do pedúnculo do caju. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, 2015

MORAIS, J.P.S.; ROSA, M.F.; MARCONCINI, J.M. **Procedimentos para análise lignocelulósicas**. 1ª ed. 54p. Embrapa Algodão – Campina Grande, 2010.

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.

MUTHIAH. P. Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based bifasic system, 2011.

PADILHA, I. Q. M., Diversidade Bacteriana dos Solos da Mata Atlântica., e Caracterização de Celulase e Xilanase de Interesse Biotecnológico (Tese) Doutorado – João Pessoa, 2014.

PAL, S.; CHOUDHARY, V.; KUMAR, A.; *et al.* Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource technology**, v. 147, p. 449–55, 2013.

PING, Y. LING, H.-Z. SONG, G. GE, J-P. XYLITOL Production from non-detoxified corncob hemicellulose acid Hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, China v. 75, p. 86 – 91, 2013.

PRATTER, S. M.; EIXELBERGER, T.; NIDETZKY, B. Systematic strain construction and process development: Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Candida tenuis* xylose reductase in wild-type or mutant form. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 732–738, 2015.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Production of xylose reductase from adapted *Candida tropicalis* grown in sawdust hydrolysate. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, out. v. 3, n. 4, p. 227–235. 2014.

RAJA, S; MURTY, V. R. THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V. RAMESH, V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. **Science and Technology**, v.1, n.1, p. 7 -16, 2011.

RAHIMPOUR, F.; HATTI-KAUL, R.; MAMO, G. Response surface methodology and artificial neural network modelling of an aqueous two-phase system for purification of a recombinant alkaline active xylanase. **Process biochemistry**, mar. v. 51, n. 3, p. 452–462. 2016.

REIS, C. L. B. et al. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**. v. 224, p. 694–701. 2017.

ROCHA, M. V. P. RODRIGUES, T.H.S. ALBUQUERQUE, T.L. GONÇALVES, L.R.B. MACEDO, G.R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, 234–243, 2014.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V; SPELZINI, D.; BOERIS, V.; AGUILAR, C. N.; PICÓ, G. A. Partition in aqueous two-phase system: its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 101, p. 392–7, 2013.

SAWATDEENARUNAT, C. SURENDRA, K.C. TAKARA, D. OECHSNER, H. KHANAL, S.K. Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 178–186, February 2015.

SELVAKUMAR, P.; LING, Y.C.; WALKER, S.; LYDIATTI, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**,. Seppur. 2010.08.022, 2010.

SENE, L.; ARRUDA, P.V.; OLIVEIRA, S.M.M.; FELIPE, M.G.A., Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42. p. 1141 – 1146. 2011.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *trichoderma inhamatum*. **Electronic journal of biotechnology**, jul. v. 18, n. 4, p. 307–313. 2015.

SNYDER, S. M.; COLE, K. D.; SZIAG, D. C. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25°C. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 37, n. 2, p. 268–274, 1992.

SOUSA, C. A. B. Produção e recuperação de celulases produzidas por *trichoderma reesei* Icb 48 na fermentação semissólida da palma forrageira. Tese de doutorado. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

SOUZA, J. A. **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico da casca de jabuticaba para a obtenção de xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação (Mestrado) pelo

Programa em Ciências Moleculares. 45p. Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis – GO, 2013.

SOUZA, T. C. Uso de bagaço de caju como suporte para a imobilização de lipase do tipo B de *Candida antarctica*: aplicação na síntese de R-indanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

STATISTICA. Data analysis software system. version 7.0. Tulsa, OK, USA. StatSoft, Inc. (2004)

SU, B; WU, M; ZHANG, Z; LIN, J; YANG, L. Efficient production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate using engineered *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**. v. 31, p. 112–122. 2015.

TAKATA, E; TSURUOKA, T; TSUTSUMI, K; TSUTSUMI, Y; TABATA. Production of xylitol and tetrahydrofurfuryl alcohol from xylan in napier grass by a hydrothermal process with phosphorus oxoacids followed by aqueous phase hydrogenation. **Bioresource Technology**. v. 167, p.74-80. 2014.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A. S.; FELIPE, M. G. A.; CANETTIERI, E.V.; CÂNDIDO, E.J.; HAULY, M. C.O. Avaliação da casca de aveia para produção de xilitol biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 26, no. 2, p. 117-125, Maringá, 2004.

ULLAH, K.; KUMAR SHARMA, V.; DHINGRA, S.; et al. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 682–698, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115006164>>. Acesso em: 29/7/2015.

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

YADAV, M.; MISHRA, D. K.; HWANG, J.-S. Catalytic hydrogenation of xylose to xylitol using ruthenium catalyst on NiO modified TiO₂ support. **Applied Catalysis A: General**, v. 425-426, p. 110–116, 2012.

ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum***. Caxias do Sul. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

ZHANG, J. GENG, A. YAO, C. LU, Y. LI, Q. 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, fev. 2012.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1

PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DO HIDROLISADO DO PEDÚNCULO DO CAJU UTILIZANDO A LEVEDURA *Candida guilliermondii*

RESUMO

O descarte de resíduos do processamento de materiais vegetais é a causa de desperdício econômico e de imensos prejuízos ambientais. Com potencial energético para a produção de combustíveis e outros produtos de alto valor, como o xilitol, essa biomassa tem sido alvo de inúmeras pesquisas de reaproveitamento. O bagaço do pedúnculo do caju é uma fonte de biomassa abundante no Nordeste do Brasil. Motivado por este fato, a pesquisa teve como objetivo avaliar a produção de xilitol pelo metabolismo da *Candida guilliermondii* CCT 1516 usando o bagaço do caju como fonte de carbono. A hemicelulose presente em 17,06 % do pedúnculo do caju confirmou essa biomassa como boa fonte de carbono para a produção de xilitol. O processo de hidrólise ácida foi bem-sucedido, gerando um licor com o teor de xilose de 6,25 g.L⁻¹, maior que os demais açúcares presentes no meio. A produtividade de xilitol teve volume máximo de 0,43 g.L⁻¹.h⁻¹ no tempo de 36 horas de cultivo. E a conversão de xilose em xilitol apresentou um fator de 0,62 g.g⁻¹ com eficiência de 67,61%. A atividade de xilanases foi afetada nas primeiras 20 hs de fermentação, sendo este um período de adaptação ao meio, posteriormente vindo a crescer e chegando ao máximo valor de 0,408 U/mL, no tempo de 28 horas.

Palavras chave: Reaproveitamento, bagaço do pedúnculo do caju, xilose, *Candida guilliermondii*, xilitol.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande produção de recursos renováveis, os produtos agrícolas e seus resíduos são gerados em larga escala. Dentre os resíduos principais pode-se citar o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo, a casca de aveia e o bagaço do pedúnculo do caju. Aproximadamente 250 milhões de toneladas/ano são produzidos de resíduos agroindustriais no país (Mesquita, 2013).

A biomassa residual é composta por cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. O potencial como substrato para processos fermentativos se deve à composição da matéria seca, que apresenta um percentual de mais de 70% de carboidratos e torna essas biomassas importantes para o uso nas vias biotecnológicas de obtenção de produtos com valor agregado (Reis et al. 2017).

A cultura do caju apresenta um baixo nível de aproveitamento do pedúnculo, com apenas 10% da sua produção destinada ao beneficiamento. A produção industrial do suco com o uso do pedúnculo gera 40% de bagaço que são produzidos e geralmente são rejeitados pelas indústrias locais. Com isso é desperdiçado um material rico, com composição média de aproximadamente 20,56 % de celulose, 10,17 % de hemicelulose e 35,26 % de lignina (Gomes et al., 2014).

Dos substratos importantes, presentes na matéria lignocelulósica, a xilose é o segundo açúcar mais abundante. Esse monossacarídeo é liberado com uso de um pré-tratamento da biomassa residual e pode ser diretamente convertido em xilitol por vias biotecnológicas utilizando leveduras, principalmente do gênero *Candida* (Medeiros, 2015).

A produção de xilitol por via enzimática apresenta um grande potencial industrial e é objetivo de diversos estudos. Dentre as alternativas biotecnológicas é a mais promissora técnica de produção. No entanto, o custo das enzimas comercializadas pode ser um fator negativo nesse tipo de processo, pois são exigidas para a produção de xilitol, enzimas com elevado grau de pureza, o que aumenta o valor de produção (Albuquerque et al., 2014).

A possibilidade de produção das enzimas xilanases a partir de processos fermentativos, com uso de resíduos agroindustriais como fontes de carbono surge como uma possibilidade de diminuição dos custos na obtenção dessas enzimas, e a consequente economia na produção por via enzimática do xilitol. Porém, para que seja viável o uso das enzimas é necessário uma purificação das mesmas após a produção biotecnológica. Por se tratar de processos caros, as técnicas de recuperação e purificação das enzimas têm sido amplamente estudadas com a finalidade de reduzir ao máximo os custos de produção (Branco et al., 2011).

Diante disso, o estudo busca aproveitar a grande disponibilidade do bagaço do pedúnculo do caju nos estados da região nordeste do Brasil para atender a necessidade de empregar uma tecnologia eficiente que assegure o aproveitamento do subproduto do caju na tentativa de minimizar os desperdícios. Além de realizar a avaliação da

eficiência de alternativas para a diminuição dos custos na produção do xilitol, usando a levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516 na produção de xilitol a partir do licor de bagaço do caju como substrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da matéria-prima

O bagaço do pedúnculo do caju foi adquirido na indústria de produção de polpa de fruta IDEAL, localizada em João Pessoa – PB. As etapas usadas na preparação da matéria prima foram aquelas descritas por Medeiros et al. (2016).

2.2 Obtenção do licor hidrolisado

O licor hidrolisado utilizado nesta pesquisa foi proveniente das melhores condições de hidrólise determinada conforme Medeiros et al. (2016), que determinaram as melhores condições de hidrólise ácida variando a temperatura, a concentração de ácido e a proporção entre o bagaço e solução ácida.

2.2 Caracterização do bagaço do pedúnculo do caju

As análises de determinação de umidade e cinzas foram realizadas como descritas por Brasil (2008). E as análises de caracterização lignocelulósicas (teor de extrativos, lignina, celulose, hemicelulose e holocelulose) forem realizadas de acordo com a metodologia descrita por TAPPI (2011).

2.3 Caracterização dos hidrolisados e dos cultivos da fermentação

As determinações dos teores de açúcares (xilose, glicose e arabinose, entre outros), no licor e nos cultivos fermentativos, dos inibidores da fermentação (ácido acético, 5-Hidroximetilfurfural e furfural) provindos do aquecimento ao qual o licor foi submetido, assim como dos produtos gerados na fermentação, foram feitas com o uso de um cromatógrafo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da marca VARIAN. O equipamento era acoplado a um detector de índice de refração (Varian 356 – LC) e uma coluna Hi-Plex H (8 μ m 300mm x 7.7 mm. UV-284nm). A temperatura de análise foi 65°C, em fase móvel de água ultrapura com fluxo de 0,6 mL/min. A injeção feita teve volume de 20 μ L da amostra com tempo de análise de 1 hora. Os cromatogramas das amostras foram comparados com aqueles de padrões dos açúcares e

inibidores analisados, sendo a quantificação feita com base na área determinada em uma curva de calibração de cada composto.

As amostras aplicadas foram previamente diluídas na proporção de 1:10 com água ultrapura e homogeneizadas. Em seguida foram filtradas em filtro tipo CHROMAFIL com poros de 0,45 μm (Waters associates – Millipore), seguidamente da filtração em membrana com poros de 0,22 μm .

2.4 Preparo do inóculo

Os experimentos foram realizados com o uso de células da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. As células foram transferidas em condições assépticas com o auxílio de uma alça de platina, das placas de Petri para tubos contendo 3 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa suspensão foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo semissintético YM (Yeast-Malte Extract). Os erlenmeyer contendo 50 mL do meio (pH 5,5), juntamente com a suspensão da levedura, foram incubados a 30 °C em agitador rotativos tipo Shaker (LOGEN SCIENTIFIC) a 200 rpm durante 24 horas.

Após esse período, as células foram separadas por centrifugação a 2000 x g por 30 min e ressuspensas em água destilada esterilizada. A partir desta suspensão foi calculado o volume de concentração celular inicial desejada para ser empregada como inóculo. O cálculo realizado para inocular no meio de cultivo uma concentração inicial de 1g/L.

2.5 Cultivo com meio de hidrolisado de pedúnculo de caju

Para os cultivos feitos com o hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju, o meio de cultura foi preparado com suplementos que atendessem as necessidades nutricionais da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. Em comparação com os cultivos semissintéticos YMA (Yeast-Malte Extract Agar), a xilose comercial adicionada foi substituída pelo licor hidrolisado. Após esterilização, o meio foi inoculado com 1 g/L de células, preparadas no pré-inóculo. O processo fermentativo foi realizado em mesa agitadora tipo Shaker (LOGEN SCIENTIFIC), com temperatura mantida a 30 °C e agitação de 200 rpm.

2.6 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi obtida através da massa seca de células coletadas durante o cultivo. Para isso, foram retiradas alíquotas de 2 mL de cada replicata do cultivo e colocadas em tubos de eppendorf. Inicialmente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga MINISPIN) por 10 min. Foi feito o descarte do sobrenadante, e uma lavagem com água destilada. Em seguida as amostras foram secas em estufa a 105 °C por 24 h.

2.7 Parâmetros fermentativos

Foram determinadas a velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{\max}), que é o coeficiente angular da reta $\ln x$ versus o tempo (fase exponencial de crescimento), e a taxa de geração celular (Tg). Também foram determinados o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{\text{xilitol/xilose}}$), produtividade volumétrica de xilitol e etanol (Q_P), eficiência de conversão de xilose em xilitol (η), velocidade volumétrica de consumo de xilose (r_x) e velocidade volumétrica de consumo de glicose (r_e).

2.8 Obtenção do extrato enzimático

Após a fermentação, as células de *Candida guilliermondii* CCT 1516 foram coletadas e centrifugadas para o rompimento celular. A metodologia de rompimento realizada foi adaptada daquela descrita por Branco (2011). Dessa forma, foi feita uma suspensão celular de concentração de 15 g.L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. Na sequência, foi acondicionado em tubo tipo *falcon* (15 ml) um volume de 3 mL de esferas de vidro mais 3 mL da suspensão celular. Em banho de gelo as amostras foram resfriadas e em seguida levadas à agitação em vórtice. A agitação foi feita por 1 minuto seguido do mesmo tempo de resfriamento, sendo repetido esse procedimento seguidamente por 5 vezes. Uma posterior centrifugação refrigerada a 10000g por 15 minutos foi responsável por separar os fragmentos celulares. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em temperatura de congelamento, sendo este o extrato enzimático.

2.9 Determinação da atividade enzimática de xilanases

Para a determinação da atividade enzimática foi adicionado 1,9ml de solução de xilana 1% (pH 5,5) e 0,1ml de amostra (extrato enzimático) em tudo de ensaio. Os tubos foram mantidos a 50 °C por 10 minutos em banho com controle de temperatura para aceleração da reação enzimática. Após esse período, a reação foi interrompida com

banho de gelo. Desta solução, 0,5 mL foi coletado e adicionado 1 mL do reagente DNS, e em seguida, foi feito o aquecimento em banho de água fervente (100 °C) por 5 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida imediatamente com banho de gelo. Diluiu-se com 2mL de água destilada e foi então lida a absorbância em espectrofotômetro a 545nm, contra um branco reacional (sem os processos de aquecimento). A curva padrão foi construída com xilose em concentrações variando entre 0,2 e 1,0 g.L⁻¹.

Foi respeitada a definição que uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de xilose por minuto, a 50 °C e pH 5,5. As atividades foram calculadas de acordo com a Equação 1.

$$U/ml = \frac{ART(mg/ml) \times V_T(ml)}{T_H(\text{min}) \times V_E(ml) \times 0,15013} \quad (1)$$

Onde ART = Concentração de açúcar redutor; V_T= volume total do reator; T_H = tempo de hidrólise; V_E = volume de enzima e 0,15013mg (1 µmol de xilose).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização lignocelulósica do bagaço do pedúnculo do caju seco apresentou uma composição de 14,13% de extrativos, 29,26% de celulose, 17,06% de hemicelulose e 30,13% de lignina (Tabela 1). Na literatura existem trabalhos com valores semelhantes na composição dessa biomassa. O bagaço analisado na pesquisa de Lima et al. (2015) apresentou um valor um pouco superior de extrativos (18,54%) e consistia em 25,60% de celulose, 15,10% de hemicelulose e 23,70% de lignina. Já Medeiros et. al (2016), obtiveram uma caracterização do bagaço do caju com percentuais de 9,51 % de extrativos, 21,45 % de celulose, 10,96 % de hemicelulose e 35,39 % de lignina.

Tabela 1 – Caracterização do bagaço do pedúnculo do caju.

Composição	Teor (%)
Umidade	12,47 ± 0,16
Cinzas	1,72 ± 0,01
Extrativos	14,13 ± 0,33
Celulose	29,26 ± 0,40
Hemicelulose	17,06 ± 0,42
Lignina	30,13 ± 0,90

Comparado com os percentuais obtidos pelo presente trabalho, Albuquerque et al. (2014) obtiveram valores inferiores de extrativos (6,41 %) e de celulose (17,73 %), e valores mais elevados de lignina (33,41 %) e hemicelulose (19,22 %). Tendo os autores afirmado, que a diferença nos teores comparados pode ser justificada pela variação nas condições de cultivo do fruto como clima, irrigação, nutrientes do solo. Esses fatores podem ser responsáveis por alterar a composição da biomassa em cada região de cultivo.

Visando comprovar que a ampla faixa de valores na composição lignocelulósica do bagaço do caju é dependente das características individuais dos pseudofrutos de cada região e época do ano, Reis et al. (2017) obtiveram valores de 18,16 % para celulose, 12,83 % para hemicelulose e 43,28 % a para lignina.

A xilose, açúcar que motivou a realização da presente pesquisa, é encontrada principalmente na parte hemicelulósica da biomassa. Em comparação com outras biomassas residuais, o bagaço de caju apresenta valor percentual um pouco superior à casca de arroz (12,0 %) analisada por Nichols et al. (2014) e valor percentual baixo em relação ao farelo de trigo (26,34 %) estudado por Annamalai & Sivakumar (2016).

Feito o processo de hidrólise, foi conseguida a liberação dos açúcares, antes ligados entre si, principalmente na cadeia hemicelulósica. Na Tabela 2 é possível visualizar que o licor hidrolisado apresenta maior teor de xilose em relação aos demais açúcares presentes.

Tabela 2 – Caracterização do hidrolisado do bagaço do caju.

Composição	Teor (g.L⁻¹)
Celobiose	1,68 ± 0,07
Glicose	2,33 ± 0,04
Xilose	6,25 ± 0,21
Arabinose	4,49 ± 0,14
Ácido acético	1,21 ± 0,08
Hidroximetilfurfural (HMF)	0,30 ± 0,05
Furfural	0,17 ± 0,01

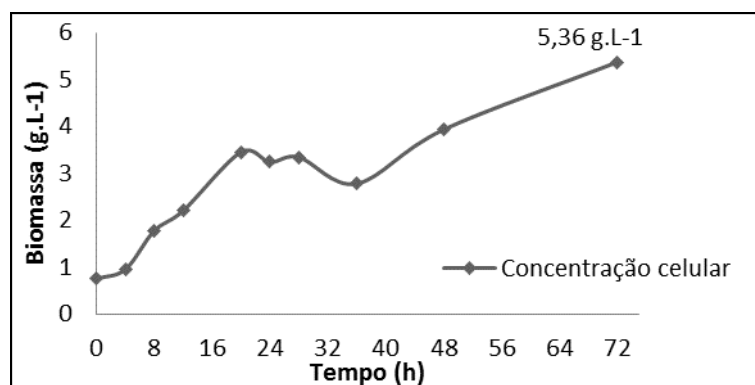
Os dados da caracterização do licor condizem com as pesquisas feitas por Medeiros (2015). que encontrou teores de açúcares, em gramas por litro, de 2,18, 5,43 e 3,81 para glicose, xilose e arabinose, respectivamente. No entanto, Lima et al. (2012)

encontraram concentrações superiores de arabinose ($7,64 \text{ g.L}^{-1}$) em relação à glicose ($1,76 \text{ g.L}^{-1}$) e à xilose ($5,46 \text{ g.L}^{-1}$).

Com a finalidade de observar a produção de xilitol, relacionado com a atividade enzimática das xilanases provenientes da *Candida guilliermondii*, o meio foi enriquecido com xilose. Com a adição, a concentração de xilose inicial no cultivo realizado foi de 31 g.L^{-1} .

A concentração celular inicial foi de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, que segundo Milesi et al. (2009) é a concentração mais favorável para a obtenção das enzimas xilanases. Após o período de cultivo, a concentração máxima de células observada foi $5,36 \text{ g.L}^{-1}$ com uma taxa de geração (Tg) de 8,74 e uma velocidade máxima de crescimento de $0,08 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Tabela 3). O tempo de cultivo de 72 horas (Figura 1) respeitou as considerações de Fonseca & Faria (2012), que relataram que o consumo de xilose é total nesse intervalo, tanto nas fermentações dos hidrolisados, quanto nos cultivos sintéticos.

Figura 1 – Cinética de crescimento das células de *Candida guilliermondii* durante a fermentação do hidrolisado do caju.



Os parâmetros de crescimento celular foram calculados com base nos dados obtidos nas primeiras 20 horas de cultivo, visto que o crescimento exponencial das células ocorreu nesse período. No intervalo de tempo entre 20 e 36 horas foi observado um decréscimo na concentração celular, seguido de uma nova fase de aumento do número de células até o término da fermentação.

O estudo da caracterização do cultivo ao longo do tempo demonstrou um consumo médio de xilose de 0,63 gramas por litro a cada hora de fermentação, sendo esta velocidade similar à relatada por Dalanhol (2014), que relatou consumo médio de xilose de $0,70 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Todavia, quando comparado o consumo de glicose ($0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), diferenças relevantes foram encontradas, uma vez que o mesmo autor evidenciou um valor muito superior ao encontrado neste experimento. Uma provável explicação para

tais diferenças baseia-se nas concentrações iniciais desse açúcar, uma vez que a glicose presente no licor de bagaço de maçã analisado por Dalanhol estava numa concentração de 20 g.L^{-1} , consideravelmente maior que a concentração inicial presente no hidrolisado do bagaço de pedúnculo de caju.

O baixo teor de glicose permitiu que o início no consumo da xilose presente fosse mais rápido. De acordo com Fonseca & Faria (2012), a presença de glicose inibe o consumo de xilose. Apesar de ocorrer o consumo concomitante de ambos açúcares, há uma preferência pela hexose em relação à pentose.

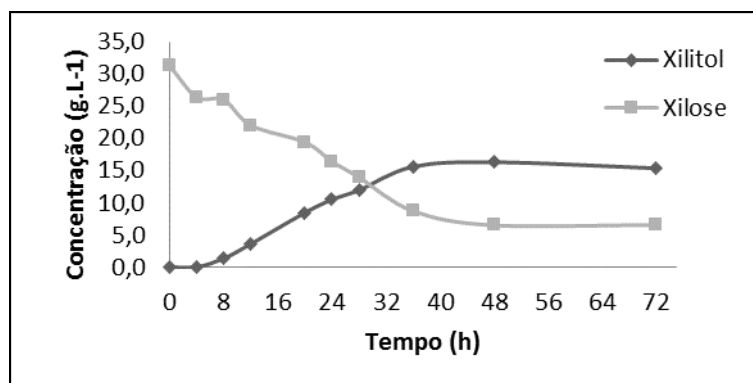
A Tabela 3 expõe também os parâmetros relacionados à conversão da xilose em xilitol. Nesta, constata-se, que o fator de conversão de xilose em xilitol encontrado foi de $0,62 \text{ g.g}^{-1}$, valor similar aqueles reportados por Mussato & Roberto (2002) e Dalanhol (2014), com $0,72 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,73 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 3 – Parâmetros da fermentação com o hidrolisado do caju.

Parâmetros fermentativos	Valor
Taxa de geração (Tg)	8,74
Velocidade máxima de crescimento (μ)	$0,08 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{\text{xilitol/xilose}}$)	$0,62 \text{ g.g}^{-1}$
Produtividade volumétrica máxima de xilitol (Q_{Px})	$0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Produtividade volumétrica máxima de etanol (Q_{Pe})	$0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Eficiência de conversão de xilose em xilitol (η_x)	67,61 %
Velocidade volumétrica de consumo de xilose (r_x)	$0,63 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Velocidade volumétrica de consumo de glicose (r_c).	$0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$

Na Figura 2 é possível observar o comportamento da conversão da xilose em xilitol, que alcançou uma concentração final de $15,35 \text{ g.L}^{-1}$ no tempo de 72 horas. Porém, quando considerado o açúcar xilitol, verifica-se que a concentração final de $16,29 \text{ g.L}^{-1}$ foi alcançada no tempo de 48h de cultivo.

Figura 2 – Consumo de xilose versus produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado do caju.



Conforme já descrito em diversos trabalhos, pode ocorrer a degradação do xilitol a partir das 48 horas de cultivo. A explicação para tal diminuição no teor do produto formado é justamente a escassez de substrato, pois após a conversão total das fontes de energia presentes no meio, a levedura passa a consumir os compostos produzidos, neste caso, o xilitol (SILVA et al. 2007).

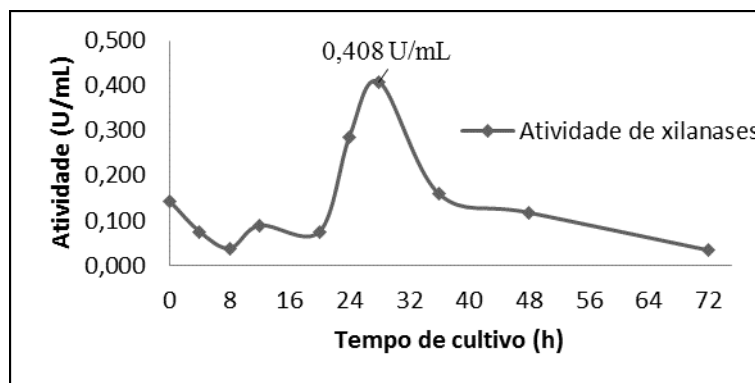
De acordo com Canilha et al. (2010), o etanol, produto também formado pelo metabolismo da levedura, de forma semelhante, sofre com esse consumo em condições extremas. Por este motivo, conjuntamente com a pesquisa de Bier (2007), o atual trabalho corrobora com a constatação relatada por Fonseca & Faria (2012), que descartam tempos acima de 72 horas para a produção de xilitol por leveduras.

A produção de xilitol pelo metabolismo da *Candida guilliermondii* depende da atividade (catálise) das enzimas xilanases (xilose redutase e xilitol desidrogenase), que atuam transformando a xilose no produto intermediário xilitol e posteriormente em etanol como produto final (Yadav et al., 2012). Por esse motivo, foi observado o aumento da concentração de etanol mesmo após não haver mais glicose a ser consumida.

A atividade das xilanases apresentou uma variação inicial, com decréscimo nas primeiras horas (Figura 3). Isso pode ter ocorrido por que o inóculo foi realizado após um pré-inóculo de 24 horas em meio sintético. O que ocasionou a obtenção de uma concentração de enzimas relevante já no tempo 0 (zero) da fermentação. Essa carga enzimática passou por um período de adaptação ao meio antes de voltar a crescer (que ocorreu após 20 horas de cultivo). As xilanases apresentaram atividade máxima no tempo de 28 horas com valor de 0,408 Unidade por mL, sendo este valor similar ao de

Oliveira Júnior (2014), que obteve uma atividade de 0,417 U/mL na produção de xilanases a partir do pedúnculo do caju.

Figura 3 – Atividade de xilanases durante a fermentação do hidrolisado do baço do pedúnculo do caju.



Relacionando a atividade de xilanases com o consumo da xilose, constata-se que o maior consumo desse substrato foi obtido justamente após o tempo de fermentação de 28 hs, onde a atividade enzimática foi máxima, correspondendo ao período onde a produtividade volumétrica máxima de xilitol (Q_{Px}) foi obtida.

4 CONCLUSÃO

O percentual de hemicelulose presente no pedúnculo do caju (17,06 %) habilita essa biomassa a ser utilizada como fonte de carbono na produção de xilitol a partir do metabolismo da *Candida guilliermondii* CCT 1516.

O processo de hidrólise ácida resultou na liberação dos açúcares de interesse para a pesquisa. Em especial, a liberação dos monossacarídeos presentes na parte hemicelulósica da biomassa.

Os parâmetros da fermentação comprovaram a capacidade da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516 em produzir xilitol a partir do hidrolisado do bagaço do pedúnculo de caju. Merece destaque o valor do fator de conversão de xilose em xilitol ($0,62 \text{ g.g}^{-1}$) e a confirmação de que o tempo de cultivo não deve exceder as 72 horas na produção de xilitol, sendo 36 horas o tempo ótimo para produção de xilitol pelo metabolismo da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516.

A máxima atividade enzimática foi observada no tempo de 28 horas, mesmo tempo que ocorreu o maior consumo de xilose e maior taxa de produção de xilitol.

AGRADECIMENTOS

Os pesquisadores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto e bolsas de mestrado institucionais, e a Fundação André Toselo (FAT), por ter gentilmente fornecido a levedura *Candida guilliermondii* CCT-1516, indispensável para este estudo.

REFERÊNCIAS

Albuquerque, T. L., Gomes, S. D. L., Marques Junior, J. E., Silva Junior, I. J., Rocha, M. V. P. (2014). Produção de xilitol a partir do bagaço de caju por *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catalysis Today*, 255, 33-40.

Annamalai, N., Sivakumar, N. (2016). Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *Journal of biotechnology*, 237, 13–17.

Bier, M. C. J., Maranhão, L. T., Azevedo, J. A. M., Silva Junior, L. S. (2007). Crescimento e consumo de xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. *Evidência, Joaçaba*, 07, 119-130.

Branco, R. F., Santos, J. C., Silva, S. S. (2011). A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: xylitol enzymatic production. *Biomass and bioenergy*, [S.l.], [s.n.].

BRASIL. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia. *Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, São Paulo.

Canilha, L., Carvalho, W., Felipe, M. G. A., Almeida E Silva, J. B., Giuliatti, M. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biotechnology*, 161, 84-92.

Fonseca, C. R., Faria L. F. F. (2012). Obtenção de etanol e xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico destoxificado. *Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Búzios, Rio de Janeiro.

Gomes, S. D. L., Albuquerque, T. L., Junior, J. E. M., Gonçalves, L. R. B., Rocha, M. V. P. (2014). Produção de xilitol e etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de caju. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 01, 683-688.

Lima, F. C. S., Silva, F. L. H., Gomes, J. P., Silva Neto, J. M. (2012). Chemical Composition of the Cashew Apple Bagasse and Potential Use for Ethanol Production. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 02, 519-523.

Lima, E. E. Silva, F. L. H., Oliveira, L. S. C., Silva, A. S., Silva Neto, J. M. (2015). Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço de pedúnculos do caju. *Revista Caatinga*, 28, 26 – 35.

Medeiros, L. L. (2015) *Ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado do pedúnculo do caju*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Medeiros, L. L., Silva, F. L. H., Lima, F. C. S., Lima, C. S. S., Muniz, M. B., Santos, S. F. M. (2016). Optimization of acid treatment of cashew peduncle for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 577-582.

Mesquita, R. G. A. (2013). *Inclusão de materiais lignocelulósicos na Produção de compostos plásticos*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Milessi, T. S. S., Moraes, A. S. L., Branco, R. F., Silva, S. S. (2009). Avaliação da concentração inicial de células de *Candida guilliermondii* na produção de xilose redutase a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, Uberlândia, Minas Gerais.

Mussato, S. I., Roberto, I. C. (2002). Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 28, 34-39.

Nichols, N. N., Hector, R. E., Saha, B. C., Frazer, S. E., Kennedy, G. J. (2014). Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to ethanol using conventional and engineered microbes. *Biomass and bioenergy*, 67, 79–88.

Oliveira Júnior, S. D. (2014). *Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Reis, C. L. B., Silva, L. M. A., Rodrigues, T. H. S., Félix, A. K. N., Santiago-Aguiar, R. S. de, Canuto, K. M., Rocha, M. V. P. (2017). Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 224, 694–701.

Silva, D. D. V., Mancilha, I. M., Silva, S. S., Felipe, M. G. A. (2007). Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 207.

Souza, T. C. (2016). *Uso de bagaço de caju como suporte para a imobilização de lipase do tipo B de Candida antarctica: aplicação na síntese de R-indanol*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

TAPPI. Technical Association of the Pulp and Paper Industry (2011). Official Test Methods (OM), Provisional Test Methods (PM) and Useful Test Methods (UM). *Atlanta: One Dunwoody Park*.

Yadav, M., Mishra, D. K., Hwang, J. S. (2012). Catalytic hydrogenation of xylose to xylitol using ruthenium catalyst on NiO modified TiO₂ support. *Applied Catalysis A: General*, 425, 110–116.

5.2 ARTIGO 2

CONCENTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE XILANASES DE *Candida guilliermondii* EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

RESUMO

A necessidade da produção de combustíveis renováveis e bioprodutos é cada vez maior. Essa tem sido a via mais usada no reaproveitamento da biomassa descartada na fabricação de diversos produtos de origem vegetal. Sua prática reduz os prejuízos ambientais e valoriza o material descartado. O xilitol é um bioproduto que se destaca como uma das 12 mais importantes substâncias químicas que podem ser produzidas a partir da biomassa. A produção biotecnológica de xilitol com uso de leveduras tem mostrado resultados promissores em relação a eficiência de processo. Diante disso, a pesquisa teve como objetivo avaliar a concentração e a recuperação de xilanases de *Candida guilliermondii* CCT 1516 em sistemas de duas fases aquosas. Como resultado, constatou-se que o tempo de 28hs de fermentação da levedura *Candida guilliermondii* no meio de cultivo formado pelo hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju é ideal foi considerado como ideal para obtenção da máxima atividade enzimática das xilanases. O sistema aquoso bifásico PEG/Tampão Fosfato de Potássio foi eficiente na partição das proteínas e das enzimas xilanases. Purificação de 7 vezes em relação ao extrato enzimático bruto, foi obtida na fase superior do sistema. Os sistemas aquosos ainda foram eficientes na recuperação das xilanases totais, apresentando valores altos em todos os ensaios. Por fim, o ensaio 2 que continha maior massa de PEG 1500 e menor massa de sal fosfato, apresentou a melhor separação entre as enzimas e as proteínas totais, o melhor fator de purificação (7,05) e a melhor recuperação das xilanases do sistema (97,26 %).

Palavras chave: via enzimática, *Candida guilliermondii*, sistema aquoso bifásico, xilanases.

INTRODUÇÃO

A produção de combustíveis renováveis e bioprodutos tem sido cada vez usada no reaproveitamento da biomassa descartada na fabricação de diversos produtos de

origem vegetal. Essa alternativa reduz os prejuízos ambientais e valoriza o material de descarte (SOUZA, 2016).

Um material com potencial para fins de produção biotecnológica é o bagaço do caju (*Anacardium Occidentale L.*). Com um desperdício de até 90% da sua produção, a cultura do caju apresenta um baixo nível de aproveitamento do pedúnculo. A composição média do bagaço de caju in natura é de 20,56 % de celulose, 10,17 % de hemicelulose e 35,26 % de lignina. A xilose, presente principalmente na parte hemicelulósica, é o principal substrato usado na obtenção do xilitol (GOMES et al. 2014; REIS et al. 2017). Por sua vez, o xilitol é um bioproduto que se destaca entre as 12 mais importantes substâncias químicas que podem ser produzidas a partir da biomassa. O grau de doçura deste açúcar é tão intenso quanto o da sacarose, porém o teor calórico é menor (SU et al., 2015).

A demanda comercial de xilitol é suprida com a produção por via química, onde é realizada uma redução química, em condições extremas de temperatura e pressão, da xilose presente na parte hemicelulósica dos materiais vegetais. Uma desvantagem dessa via de produção é a necessidade de remoção total do catalisador unido ao xilitol, aumentando ainda mais os custos para a purificação do produto final (YADAV et al., 2012; KIRILIN et al., 2014).

A produção biotecnológica de xilitol com uso de leveduras tem mostrado resultados promissores. O metabolismo da levedura *Candida guilliermondii* transforma a xilose em xilitol como produto intermediário na síntese do etanol. A obtenção por via fermentativa do xilitol depende das condições ótimas de nutrição e cultivo do microrganismo (BRANCO et al., 2011).

A via enzimática de produção pode apresentar uma eficiência relevante. Esse método consiste em usar a enzima xilose redutase no substrato formado por licor hidrolisado rico em xilose. A enzima xilose redutase é responsável pela formação do xilitol a partir da xilose. As condições fermentativas controlam o acúmulo do xilitol, sendo maior quanto menor for a ação da enzima xilitol desidrogenase, responsável pela transformação do xilitol em Etanol (PAL et al., 2013).

Para que as enzimas possam apresentar eficiência na produção é necessária a garantia de uma pureza desses catalizadores da reação. As enzimas comerciais com alto grau de pureza são produtos com alto valor de mercado. Com isso, os métodos de purificação de baixo custo estão em pauta nas pesquisas de produção desses biocompostos (SUKPIPAT et al., 2017).

Dentre as técnicas testadas, a extração do tipo líquido - líquido com sistemas aquosos bifásicos (SAB), apresentou baixo custo e uma eficiência de recuperação considerável. O SAB é formado pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros quimicamente distintos ou um polímero e um sal. Nas condições operacionais adequadas, a tendência é que a parte proteica interaja mais com uma das fases e os demais fragmentos, considerados indesejados migrem para a outra fase (KOGANTI; JU, 2013).

Diante disso, o estudo busca testar a eficiência da técnica de sistemas aquosos bifásicos na concentração e recuperação da enzima xilose redutase, produzida pelo metabolismo da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516, cultivada em licor hidrolisado de bagaço do pedúnculo do caju.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

As etapas de preparação do bagaço do pedúnculo do caju para hidrólise ácida foram realizadas por Medeiros et al. (2016). O licor hidrolisado foi proveniente das melhores condições de hidrólise determinada pelo mesmo autor, que analisou as melhores condições de hidrólise ácida variando a temperatura, a concentração de ácido e a proporção entre o bagaço e solução ácida.

Caracterização dos hidrolisados e dos cultivos da fermentação

A determinação dos teores de açúcares (xilose, glicose e arabinose, entre outros) foi feita com o uso de um cromatógrafo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da marca VARIAN. O equipamento era acoplado a um detector de índice de refração (Varian 356 – LC) e uma coluna Hi-Plex H (8 µm 300mm x 7.7 mm. UV-284nm). A temperatura de análise foi 65°C, a fase móvel foi água ultra pura com fluxo de 0,6 mL/min. A injeção feita teve volume de 20 µL da amostra com tempo de análise de 1 hora. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e inibidores analisados, sendo a quantificação feita com base na área do composto em uma curva de calibração de cada composto.

Cultivo com meio de hidrolisado de pedúnculo de caju

Os experimentos foram realizados com o uso de células da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. As células foram transferidas em condições assépticas com o

auxílio de uma alça de platina, das placas de Petri para tubos contendo 3 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa suspensão foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo semissintético YM (Yeast-Malte Extract). Os erlenmeyer contendo 50 mL do meio (pH 5,5), juntamente com a suspensão da levedura foram incubados a 30 °C em agitador rotativos tipo Shaker (LOGEN SCIENTIFIC) a 200 rpm durante 24 horas.

Após esse período as células foram separadas por centrifugação a 2000 x g por 30 min e ressuspensas em água destilada esterilizada. A partir desta suspensão foi calculado o volume da mesma para a inoculação de concentração celular inicial desejada para ser empregada como inóculo. O cálculo realizado para inocular no meio de cultivo uma concentração inicial de 1g/L.

O cultivo foi feito com o hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju, suplementado com sulfato de amônia (3 g/L), cloreto de cálcio (0,1 g/L), extrato de farelo de arroz (20 g/L), para atender as necessidades nutricionais da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. O processo fermentativo foi realizado na mesa agitadora tipo Shaker (LOGEN SCIENTIFIC), com temperatura controlada de 30 °C e agitação de 200 rpm. O cultivo foi interrompido após 28 horas de inoculação.

Obtenção do extrato enzimático

Após as 28 horas de cultivo, as células de *Candida guilliermondii* CCT 1516 foram coletadas e centrifugadas para o rompimento celular. A metodologia de rompimento realizada foi adaptada da descrição feita por Branco (2011). Fez-se uma suspensão celular com tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) de concentração de 15 g.L⁻¹. Colocou-se em tubo tipo *falcon* (15 ml) um volume de 3 mL de esferas de vidro mais 3 mL da suspensão celular. Em banho de gelo as amostras foram resfriadas e em seguida levadas à agitação em vórtice. A agitação foi feita por 1 minuto seguido do mesmo tempo de resfriamento, sendo repetido esse procedimento seguidamente por 5 vezes. Uma posterior centrifugação refrigerada a 10000g por 15 minutos foi responsável por separar os fragmentos celulares. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em temperatura de congelamento, sendo este o extrato enzimático.

Determinação da atividade enzimática de xilanases

Para a determinação da atividade enzimática foi adicionado 1,9ml de solução de xilana 1% (pH 5,5) e 0,1ml de amostra (extrato enzimático) em tudo de ensaio. Os tubos

foram mantidos a 50 °C por 10 minutos em banho com controle de temperatura para aceleração da reação enzimática. Após esse período a reação foi interrompida com banho de gelo.

Desta solução, 0,5 mL foi coletado e adicionado 1 mL do reagente DNS, em seguida foi feito o aquecimento em banho de água fervente (100 °C) por 5 minutos. Após esse tempo reação foi interrompida imediatamente com banho de gelo. Diluiu-se com 2mL de água destilada e foi então lida a absorbância em espectrofotômetro a 545nm, contra um branco reacional (sem os processos de aquecimento).

A curva padrão foi feita a partir de xilose nas concentrações entre 0,2 e 1,0 g.L⁻¹. Foi respeitada a definição que uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de xilose por minuto, a 50 °C e pH 5,5.

Preparação dos sistemas aquosos bifásicos

Para o estudo da recuperação das xilanases por meio de SABs, foram testados sistemas formados por Polietilenoglicol de massa molar 1500 (PEG 1500), que apresenta de acordo com a literatura, resultados relevantes para a recuperação das enzimas xilanases, e tampão fosfato de potássio à temperatura ambiente (25 °C).

Para melhorar a dissolução, os polímeros foram colocados em estufa a 50 °C e os sais à 105 °C, até peso constante. Em tubos de centrifuga de graduação 15 mL foi realizada a preparação dos sistemas aquosos bifásicos. As massas de fosfato de potássio, PEG 1500, mais o extrato enzimático fermentado do bagaço do pedúnculo do caju somou um total de 10 g.

A solução tampão fosfato de potássio de pH 6,5 foi constituída de uma mistura de K₂HPO₄ e KH₂PO₄ na razão de 1087 (p/p). Os valores das massas usadas em todos os ensaios foram baseados no planejamento fatorial 2² com três repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. Os experimentos foram realizados de forma aleatória para avaliar a influência e das concentrações do PEG 1500 (X₁) e do fosfato de potássio (X₂) sobre os parâmetros K_p - coeficiente de partição das proteínas (Y₁), K_e - coeficiente de partição das xilanases (Y₂), F_p PEG - fator de purificação na fase superior (Y₃), F_p sal - fator de purificação na fase inferior (Y₄), Y PEG - recuperação na fase superior (Y₅), Y sal - recuperação na fase inferior (Y₆).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

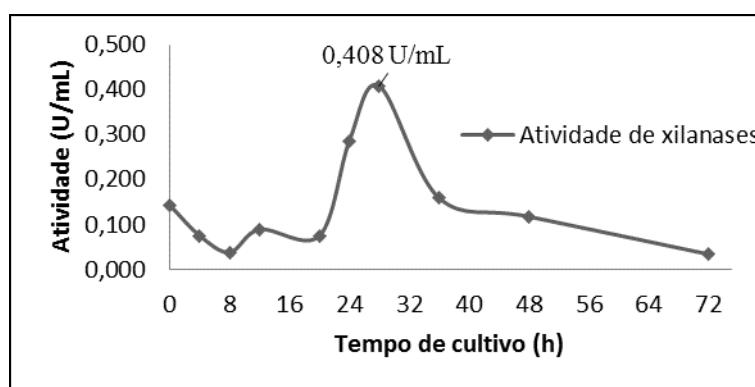
O meio de cultivo formado pelo licor hidrolisado do pedúnculo do caju, suplementado com nutrientes favoráveis à levedura *Candida guilliermondii* (Tabela 1), foi inoculado com 1 g/L de células. De acordo com Milessi et al. (2009), essa concentração de células favorece a produção das enzimas xilanases.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo utilizado para crescimento da *Candida guilliermondii*.

	Composição (g/L)
Xilose	31,0
Sulfato de amônio	3,0
Cloreto de Cálcio	0,1
Extrato de farelo de arroz	20,0

O estudo da atividade das xilanases durante o cultivo apresentou uma fase instável das enzimas nas primeiras horas, visto que o inóculo continha uma carga enzimática proveniente de uma pré inoculação de 24h em meio semissintético. É possível perceber na Figura 1 que após 20 horas foi percebida uma estabilidade nos valores de atividade enzimática. As xilanases apresentaram atividade máxima no tempo de 28 horas com valor de 0,408 Unidade por mL, de forma similar Oliveira Júnior (2014) obteve uma atividade de 0,417 U/mL na produção de xilanases a partir do pedúnculo do caju.

Figura 1– Atividade de xilanases durante a fermentação do hidrolisado do caju.



Com o conhecimento do tempo de cultivo necessário para a obtenção do extrato enzimático com a maior atividade de xilanases, foi realizado um novo cultivo da levedura, nas mesmas condições anteriores. Atingido o tempo 28 horas de cultivo foi

feita a extração das enzimas e o extrato bruto foi usado na técnica de extração líquido-líquido de SABs.

Usando o planejamento 2^2 proposto, os resultados para os coeficientes de partição das proteínas e de partição das enzimas xilanases totais foram expressos na Tabela 2, juntamente com os desvios baseados na propagação matemática de erros, visto que os parâmetros calculados relacionam em forma de razões, valores médios.

Tabela 2 – Resultados dos coeficientes de partição das proteínas e de partição das enzimas xilanases para o planejamento 2^2 com três pontos centrais.

Ensaio	X₁ - PEG 1500 (g)	X₂ - Fosfato de potássio (g)	Y₁ – Coeficiente de partição das proteínas (Kp)	Y₂ – Coeficiente de partição das xilanases (Ke)
1	1,6 (-1)	1 (-1)	0,76 ± 0,01	3,12 ± 0,16
2	2,4 (1)	1 (-1)	0,08 ± 0,00	14,75 ± 1,08
3	1,6 (-1)	1,3 (1)	0,17 ± 0,00	2,39 ± 0,06
4	2,4 (1)	1,3 (1)	0,20 ± 0,00	6,94 ± 1,06
5	2 (0)	1,15 (0)	0,36 ± 0,01	7,29 ± 1,01
6	2 (0)	1,15 (0)	0,35 ± 0,01	10,60 ± 1,32
7	2 (0)	1,15 (0)	0,36 ± 0,00	8,40 ± 0,34

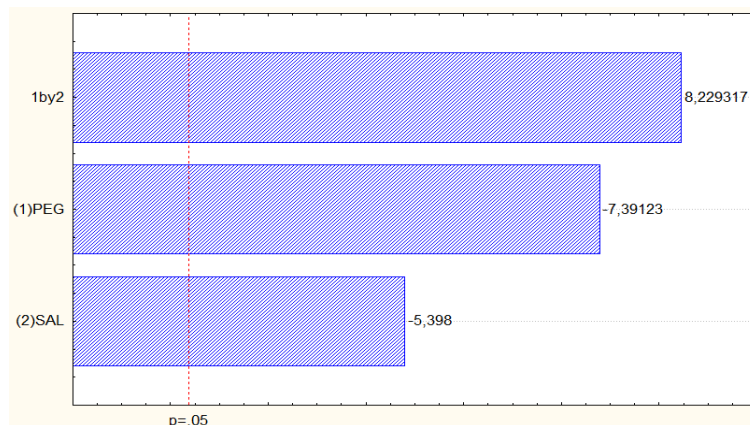
Os valores do coeficiente de partição de proteínas, mostrados na Tabela 2 revelou que as proteínas interagiram preferencialmente para a fase rica em fosfato. O valor mais expressivo foi observado no primeiro ensaio, onde eram mínimos, para o planejamento, os valores de PEG e fosfato. Para esse parâmetro, valores mais elevados de Kp indicam falta de seletividade na purificação das enzimas xilanases, pois o maior teor de proteínas totais presentes nessa fase aponta uma pequena separação entre a enzima e os interferentes presentes no sistema. O menor coeficiente obtido foi no segundo ensaio onde a composição aponta o maior valor de PEG 1500.

Para melhor avaliação dos dados experimentais, foi realizado o tratamento estatístico dos valores do coeficiente de partição das proteínas (Kp). O diagrama de Pareto (Figura 2) mostra que todos os parâmetros são estatisticamente significativos para a partição das proteínas no sistema aquoso bifásico.

O digrama de Pareto indica que o aumento da concentração de sal fosfato reduz os valores de Kp, assim como ocorre com o aumento da concentração de PEG, porém o efeito da variação do polímero é ainda maior sobre a diminuição do coeficiente de

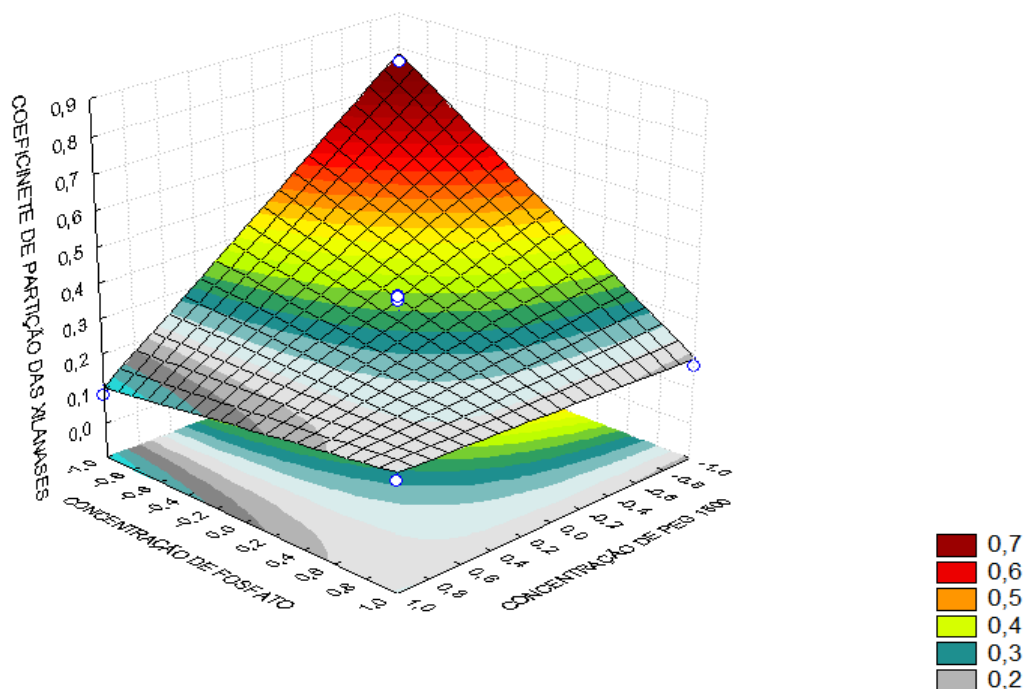
partição das proteínas. O diagrama ainda apresenta que o efeito da interação dos dois fatores é positivo.

Figura 2 – Digrama de Pareto mostrando a influência das variáveis concentração de PEG 1500 e concentração de fosfato coeficiente de partição das proteínas totais no sistema aquoso bifásico.



A superfície de resposta (Figura 3) indica que as menores concentrações de PEG 1500 e fosfato no sistema, apresentam maiores teores de proteínas totais na fase superior. Ainda é possível observar que a combinação da maior concentração de PEG e a menor de fosfato ocasiona o menor valor de K_p na superfície, algo desejável em relação a purificação das xilanases.

Figura 3 – Superfície de resposta para o coeficiente de partição das proteínas, em função das concentrações de fosfato e PEG 1500.



O ensaio 2, com maior teor de polímero e menor de sal, apresentou um valor bem superior de coeficiente de partição das xilanases. Isso indica que as enzimas xilanases presentes no sistema apresentaram maior afinidade com a fase superior do SAB. Esse fato corroborou com o comportamento da superfície de resposta na Figura 2. O segundo ensaio apresenta o nível máximo de PEG 1500 e mínimo de sal Fosfato, o que aumenta o teor de xilanases na fase superior e diminui a concentração de proteínas nessa mesma fase.

O valor do coeficiente de partição das xilanases registrado por Garai & Kumar (2013) foi de 5,16 no ensaio com a melhor condição de partição das enzimas. Valor semelhante foi obtido por Rahimpour et al. (2016) em sua pesquisa, onde o coeficiente de partição de xilanases na sua melhor condição de purificação foi de 5,43. Esses valores são inferiores ao encontrado nessa pesquisa, que apresenta o maior coeficiente K_e igual a 14,75.

O fator de purificação na fase superior do sistema aquoso bifásico indicou melhor purificação na condição de máximo de PEG 1500 (+1) e menor de fosfato (-1). Comparando os ensaios 1 e 2, já que ambos continham a mesma concentração de fosfato, o fator de purificação foi aproximadamente 7 vezes maior a favor do sistema que continha uma massa maior polímero PEG 1500 (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados dos fatores de purificação, nas fases superior e inferior dos sistemas aquosos bifásicos para o planejamento 2^2 com três pontos centrais.

Ensaio	X₁ - PEG 1500 (g)	X₂ - Fosfato de potássio (g)	Y₃ – Fator de purificação da fase superior	Y₄ – Fator de purificação da fase inferior
1	1,6 (-1)	1 (-1)	1,03 ± 0,03	0,25 ± 0,09
2	2,4 (1)	1 (-1)	7,05 ± 0,15	0,04 ± 0,12
3	1,6 (-1)	1,3 (1)	4,02 ± 0,07	0,28 ± 0,04
4	2,4 (1)	1,3 (1)	3,21 ± 0,06	0,09 ± 0,27
5	2 (0)	1,15 (0)	1,59 ± 0,05	0,08 ± 0,25
6	2 (0)	1,15 (0)	1,63 ± 0,07	0,05 ± 0,22
7	2 (0)	1,15 (0)	1,56 ± 0,04	0,10 ± 0,11

O fator de purificação de $7,05 \pm 0,15$ foi superior ao encontrado por Garai & Kumar (2013), que em sua pesquisa obtiveram um fator de 2,40 para a fase polimérica

do sistema. Já Malhotra et al. (2016) conseguiram um fator de purificação de 1,35 para xilanases isoladas de bactérias, submetidas ao sistema PEG/fosfato.

O Fator de purificação na fase inferior, razão entre as atividades específicas das enzimas presentes fase salina e do extrato enzimático bruto, apresentou valores baixos em todos os ensaios, visto que as atividades específicas das fases inferiores dos sistemas foram muito baixas. Isso explicita a maior interação das enzimas xilanases com a fase polimérica, sendo mínima a atividade dessas enzimas na fase sal dos sistemas aquosos bifásicos.

Considerando toda concentração de enzimas xilanases presentes nos sistemas aquosos bifásicos foram calculadas as recuperações das xilanases nas fases superior e inferior. Os dados de recuperação estão contidos na Tabela 4 e totalizam, somados 100 % em cada ensaio.

Tabela 4 – Resultados de recuperação das xilanases, nas fases superior e inferior dos sistemas aquosos bifásicos para o planejamento 2² com três pontos centrais.

Ensaio	X₁ - PEG 1500 (g)	X₂ - Fosfato de potássio (g)	Y₅ – Recuperação na fase superior (%)	Y₆ – Recuperação na fase inferior (%)
1	1,6 (-1)	1 (-1)	89,28 ± 0,00	10,72 ± 0,00
2	2,4 (1)	1 (-1)	97,26 ± 0,00	2,74 ± 0,00
3	1,6 (-1)	1,3 (1)	72,44 ± 0,00	27,56 ± 0,00
4	2,4 (1)	1,3 (1)	92,45 ± 0,00	7,55 ± 0,00
5	2 (0)	1,15 (0)	92,48 ± 0,00	7,52 ± 0,00
6	2 (0)	1,15 (0)	94,75 ± 0,00	5,25 ± 0,00
7	2 (0)	1,15 (0)	90,15 ± 0,00	9,85 ± 0,00

A recuperação das xilanases na fase superior, rica em polímero, foi maior do que a fase salina em todos os ensaios, sendo esse mais um fator de indicação da interação preferencial dessas enzimas. O segundo ensaio apresentou uma recuperação de 97,26 %, percentual similar ao encontrado por Malhotra et al. (2016). Esses autores recuperaram 98,13 % das xilanases presentes em todo sistema.

CONCLUSÃO

O tempo de 28h de fermentação da levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516 no meio de cultivo formado pelo hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju foi ideal para obtenção da máxima atividade enzimática das xilanases.

O sistema aquoso bifásico PEG 1500/fosfato foi eficiente na partição das proteínas e das enzimas xilanases, sendo capaz de separar de forma considerável as enzimas do teor de proteínas totais.

O fator de purificação obtido na fase superior do sistema foi relativamente alto se comparado com aqueles relatados em outros trabalhos, chegando a purificação de 7 vezes em relação ao extrato enzimático bruto.

Os sistemas aquosos montados ainda foram eficientes na recuperação das xilanases totais, presentes no sistema, apresentando valores altos em todos os ensaios.

O ensaio 2, que continha maior massa de PEG 1500 e menor massa de sal fosfato, apresentou a melhor separação entre as enzimas e as proteínas totais, através dos coeficientes K_p e K_e . Esse sistema ainda foi o que indicou o melhor fator de purificação (7,05) e a melhor recuperação das xilanases do sistema (97,26 %).

AGRADECIMENTOS

Os pesquisadores são gratos à CAPES, devido ao financiamento do projeto vinculado a esta pesquisa como também as bolsas de mestrado fornecidas por esta instituição. E à Fundação André Toselo (FAT) que forneceu a levedura *Candida guilliermondii* CCT-1516, indispensável para este estudo.

REFERÊNCIAS

BRANCO, R. F; SANTOS, J. C; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: xylitol enzymatic production. **Biomass and bioenergy**, [S.l.], [s.n.]. 2011

GARAI, D.; KUMAR, V. Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanase in peg/phosphate system: optimization by box-behnken design approach. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, abr. v. 2, n. 2, p. 125–131. 2013.

GOMES, S. D. L; ALBUQUERQUE, T. L; JUNIOR, J. E. M; GONÇALVES, L. R. B; ROCHA, M. V. P. Produção de xilitol e etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de caju. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. v.1, p. 683-688. 2014.

KIRILIN, A. V.; TOKAREV, A. V.; MANYAR, H.; et al. Aqueous phase reforming of xylitol over Pt-Re bimetallic catalyst: Effect of the Re addition. **Catalysis Today**, v. 223, p. 97–107, 2014.

KOGANTI, S.; JU, L.-K. Debaryomyces hansenii fermentation for arabitol production. **Biochemical engineering journal**. v. 79, p. 112–119, 2013.

MALHOTRA, G; JESHREENA, R; CHAPADGAONKAR S. S. Aqueous two phase purification of xylanase obtained from a bacterial isolate. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. 7(4): (B) 305 – 308. 2016.

MEDEIROS, L. L., SILVA, F. L. H., LIMA, F. C. S., LIMA, C. S. S., MUNIZ, M. B., SANTOS, S. F. M. Optimization of acid treatment of cashew peduncle for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Transactions**, 49, 577-582. 2016.

MILESSI, T. S. S., MORAES, A. S. L., BRANCO, R. F., SILVA, S. S. Avaliação da concentração inicial de células de *Candida guilliermondii* na produção de xilose redutase a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Uberlândia, Minas Gerais. 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2014

RAHIMPOUR, F.; HATTI-KAUL, R.; MAMO, G. Response surface methodology and artificial neural network modelling of an aqueous two-phase system for purification of a recombinant alkaline active xylanase. **Process biochemistry**, mar. 2016. v. 51, n. 3, p. 452–462. 2016.

REIS, C. L. B. et al. Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**. v. 224, p. 694–701. 2017.

SOUZA, T. C. Uso de bagaço de caju como suporte para a imobilização de lipase do tipo B de *Candida antarctica*: aplicação na síntese de R-indanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

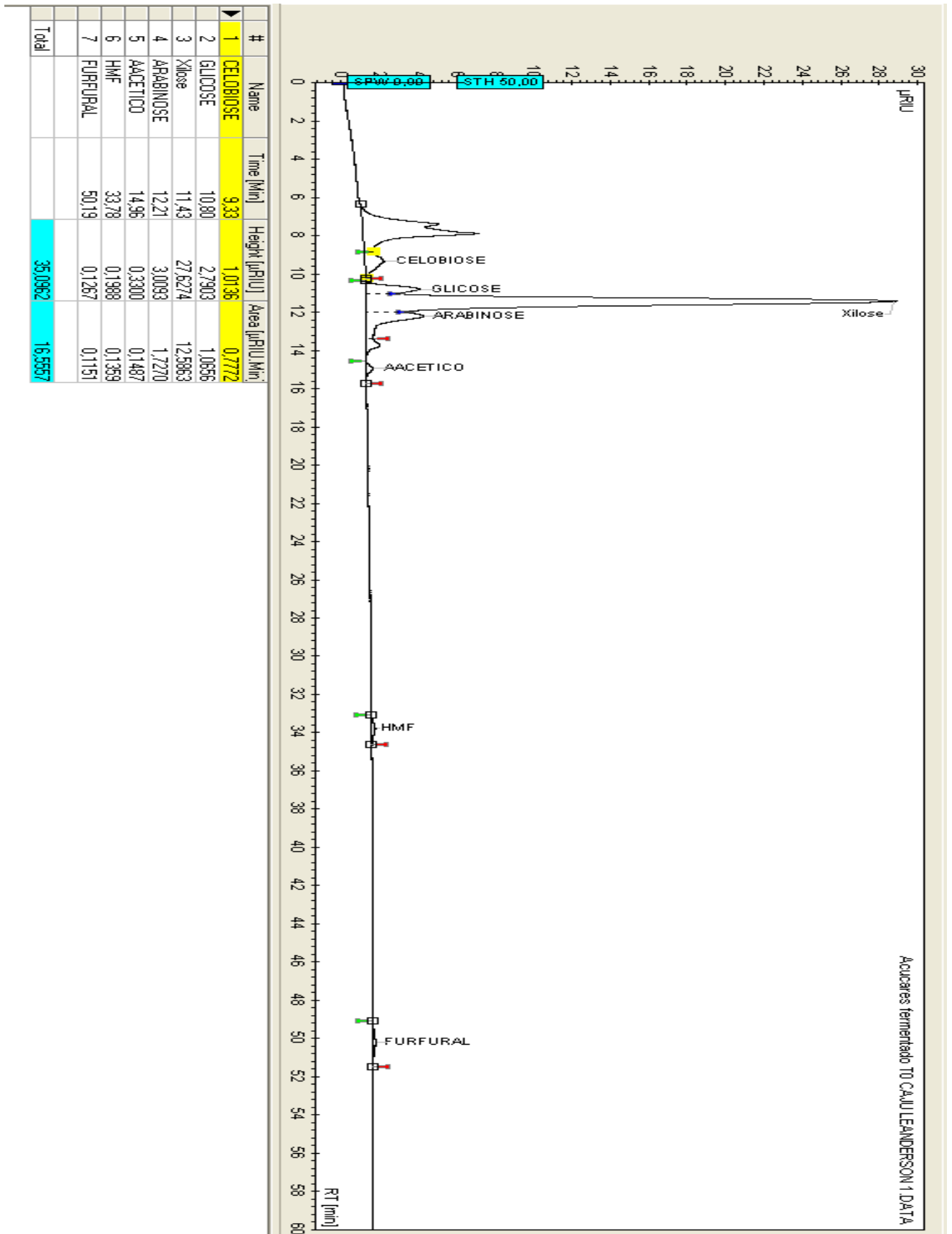
SU, B; WU, M; ZHANG, Z; LIN, J; YANG, L. Efficient production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate using engineered *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**. v. 31, p. 112–122. 2015.

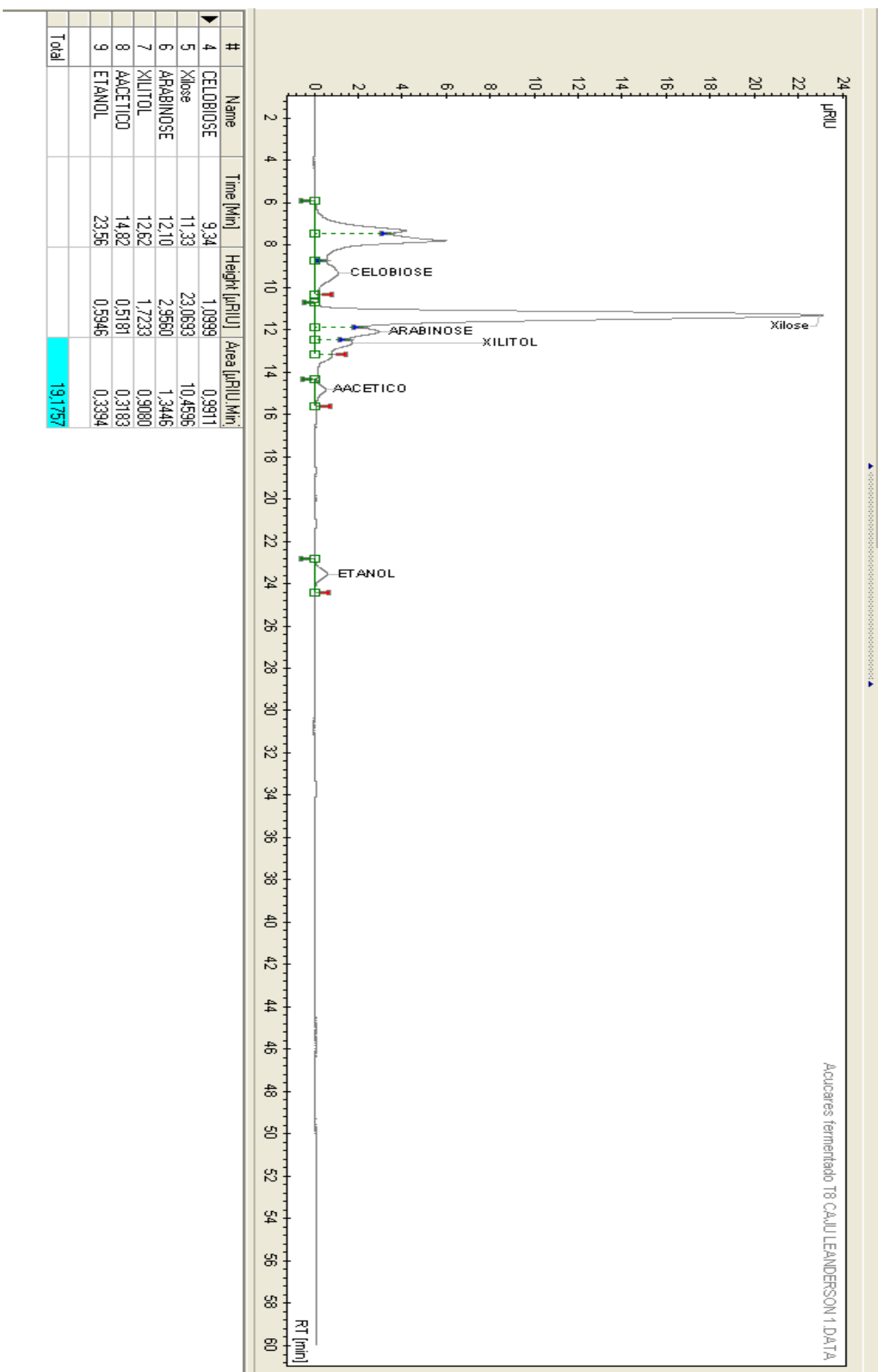
SUKPIPAT, W. et al. Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with l-arabitol dehydrogenase. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 123, p. 20–27, 2017.

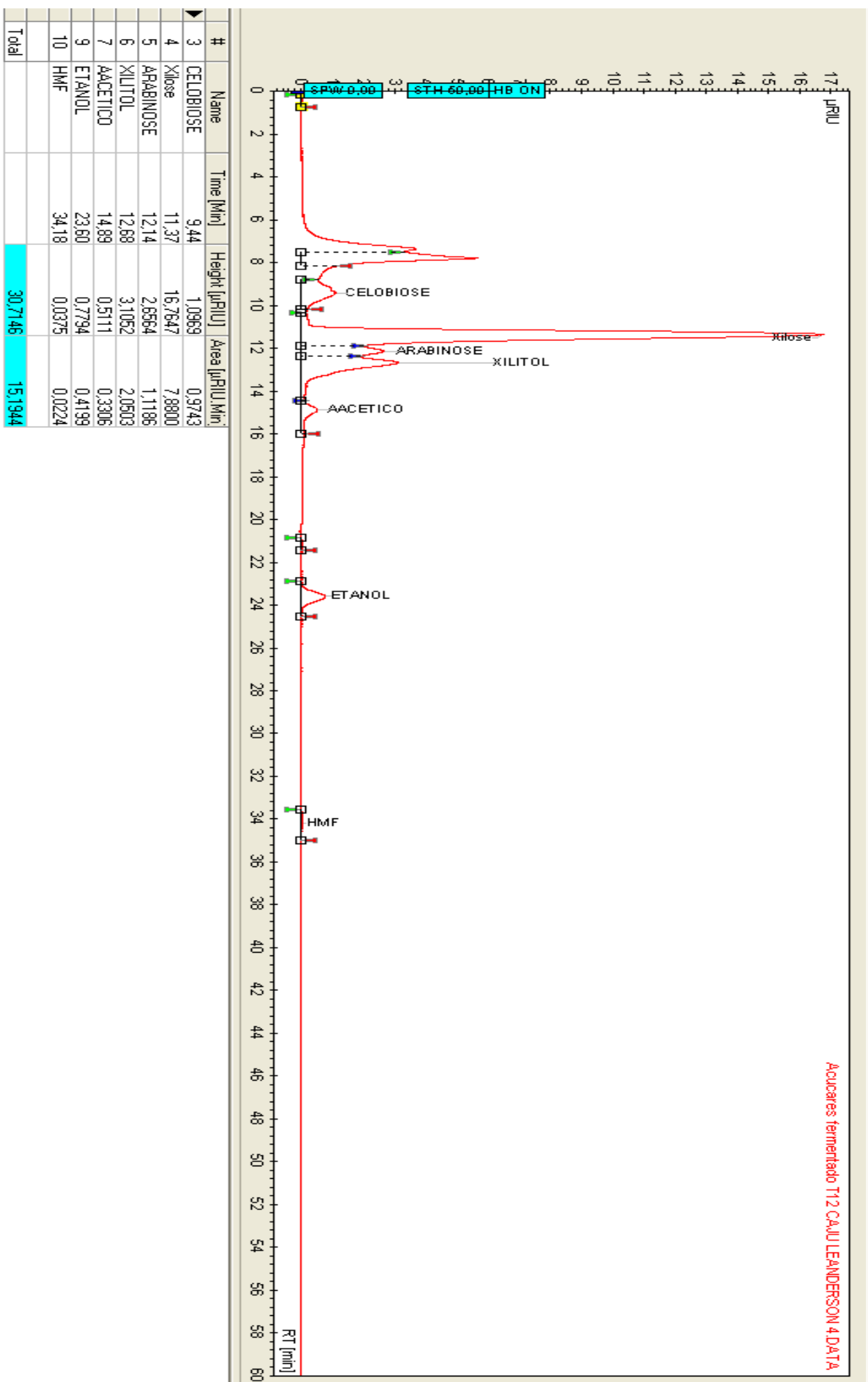
YADAV, M.; MISHRA, D. K.; HWANG, J.-S. Catalytic hydrogenation of xylose to xylitol using ruthenium catalyst on NiO modified TiO₂ support. **Applied Catalysis A: General**, v. 425-426, p. 110–116, 2012.

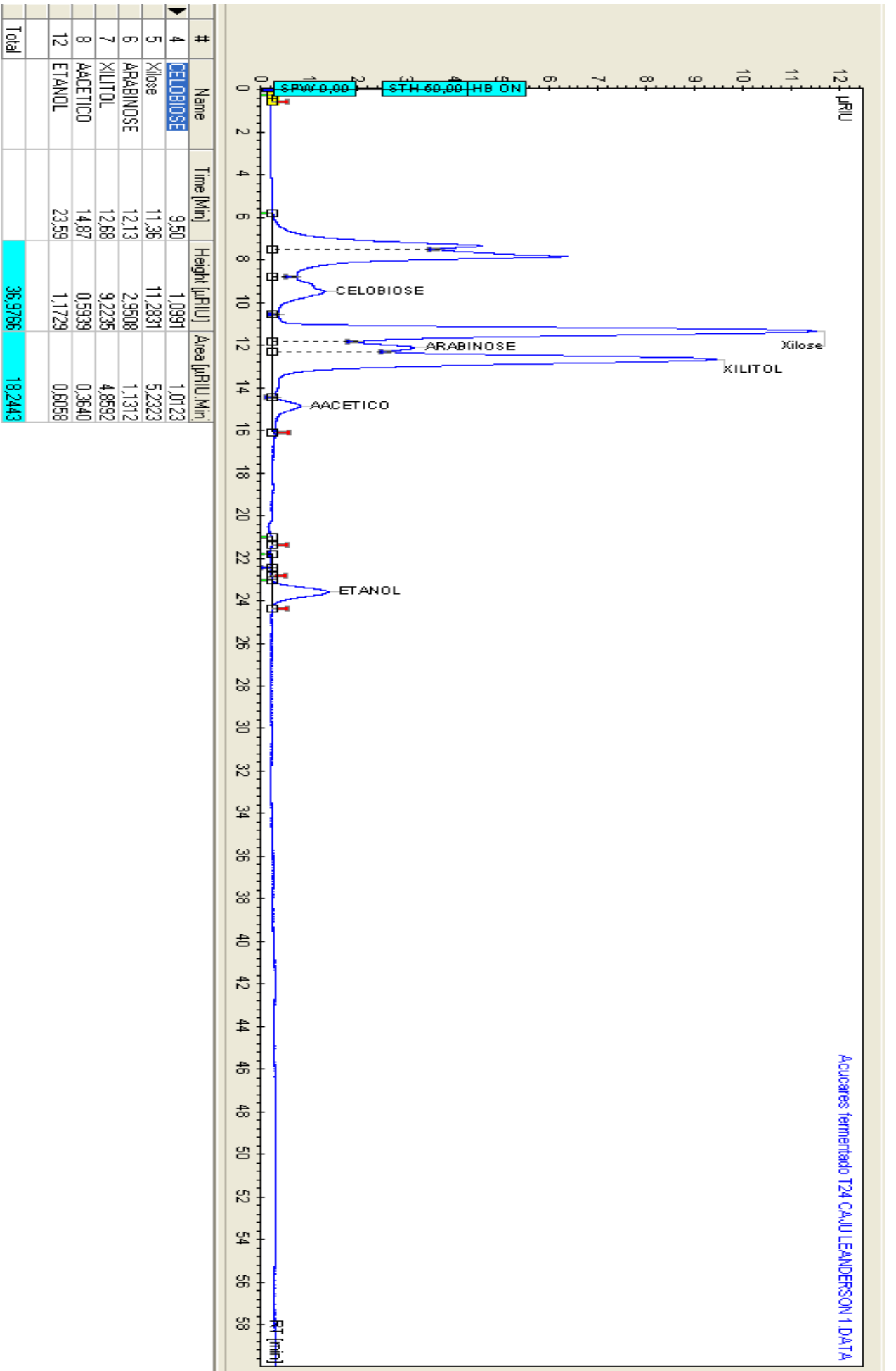
APÊNDICE

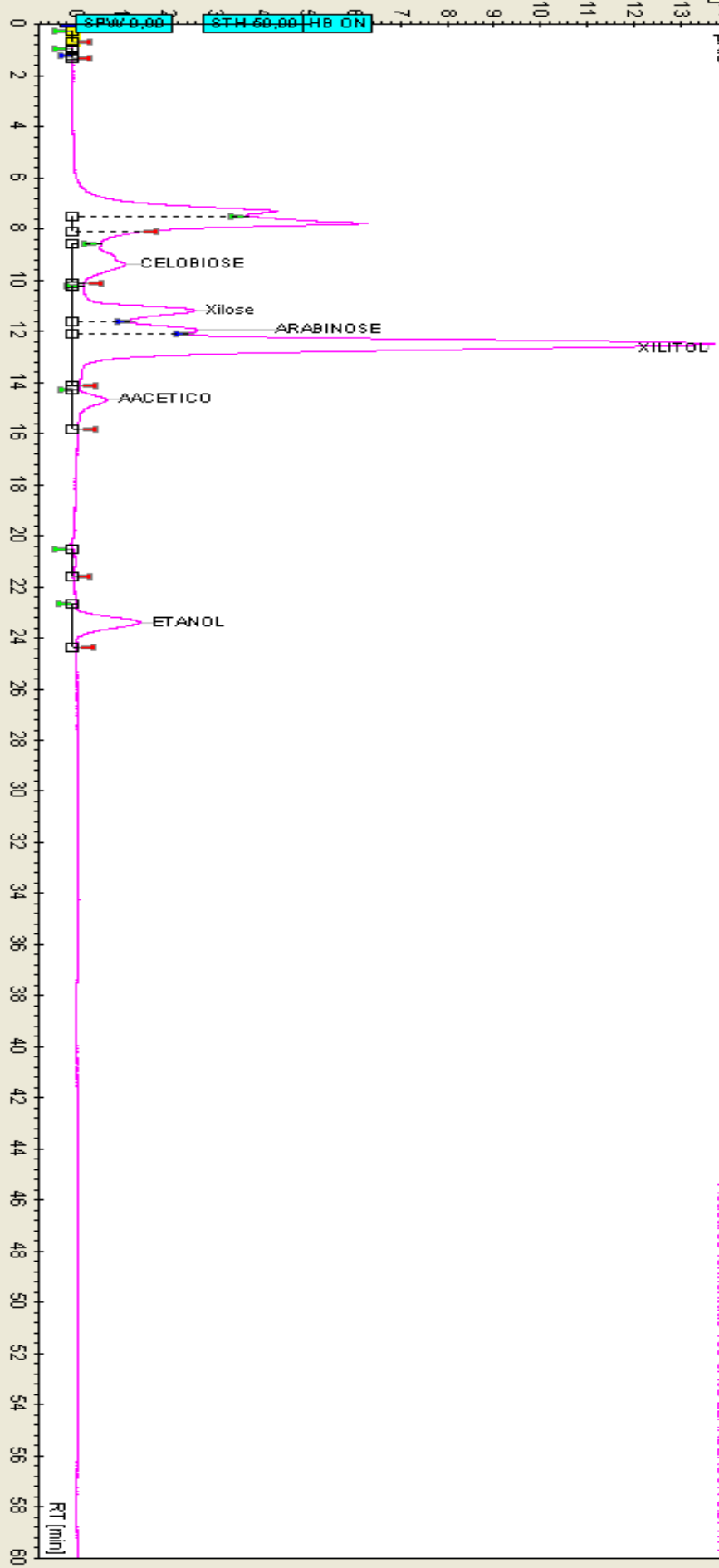
APÊNDICE A: CROMATOGRAMAS DE DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO MEIO DE CULTIVO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA *Candida guilliermondii*.











#	Name	Time [Min]	Height [AU]	Area [AU.Min]
5	CELOBIOSE	9.40	1.1335	1.1035
6	Xilose	11.20	2.6338	1.4676
7	ARABINOSE	11.97	2.6913	1.0634
8	XILITOL	12.51	13.7678	7.0983
9	AACETICO	14.69	0.7191	0.4699
11	ETANOL	23.40	1.4481	0.8363
Total			28.8921	14.6435

