

FÁBIO COELHO SAMPAIO

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA A CONVERSÃO
DE XILOSE EM XILITOL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

FÁBIO COELHO SAMPAIO

**SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS PARA A CONVERSÃO
DE XILOSE EM XILITOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 02 de agosto de 2001.

Prof^a Flávia Maria L. Passos
(Conselheira)

Dr^a Virgínia Maria Chaves-Alves
(Conselheira)

Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti

Prof^a Maria das Graças A. Felipe

Prof. Jorge Luiz C. Coelho
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais, Juasci e Maria Santa.

Aos

meus irmãos, Flávio, Rodrigo e Andresa.

Aos meus avós, Nair e Genésio.

AGRADECIMENTO

A Deus, por tantos benefícios que me tem concedido. Pelo sustento material e espiritual nos momentos difíceis. Por seu infinito amor e misericórdia.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq e CAPES, pela bolsa de estudo.

Ao Professor Jorge Luiz C. Coelho, pela compreensão e orientação durante a realização deste trabalho.

À professora Flávia Maria L. Passos e à Dr^a. Virgínia Maria Chaves-Alves, pelas sugestões, pelos ensinamentos e críticas valiosas. E aos demais professores, pelos conhecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, que contribuíram na execução deste trabalho, especialmente Nilcéia, Laura, Aparecida, Arlindo, Danilo, Evandro, Antônio, Paulo e Cesário.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos Ann, Cássia, Leonardo, Cláudia, Gislene, Evandro, Lízia, Ana Paula, Pilar Ximena, Juliana Vivan, André Querido, Greice, Gilzeane, Alex, Liliane, Teresa, Otávio, Pollyanna,

Fábia, Wendel, Cláudio, Elizama, Marcelo, Sônia e Leonardo, pela amizade e convivência agradável.

Aos colegas dos laboratórios do Departamento de Microbiologia, pelo apoio e companheirismo.

À Universidade Federal de Ouro Preto, especialmente aos professores e técnicos do curso Farmácia e Análises Clínicas, pelos conhecimentos e pelo carinho.

A todos os professores e funcionários da Escola Estadual Clélia Bernardes, Sericita – MG, pelos primeiros ensinamentos.

Aos meus pais e irmãos queridos, que foram meu estímulo durante a caminhada.

Aos meus avós, Nair e Genésio, pelo grande amor.

Aos meus tios e primos, que muito me ajudaram, em especial Maria, Sara, Virgínia, Santa, Auxiliadora, Pedro, Marcos, José Custódio, Andréia, Ana Cláudia e Betânia.

Aos irmãos amados de Mariana, Ouro Preto, Sericita, Viçosa e São Miguel do Anta, pela comunhão e orações.

Ao Getúlio, Rogério, Rômulo, Lucas, Jorge, Samuel e Pedro, pela amizade.

A todos os amigos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FÁBIO COELHO SAMPAIO, filho de Juasci Sampaio e Maria Santa Coelho Sampaio, nasceu no Rio de Janeiro - RJ, em 9 de setembro de 1974.

Em agosto de 1994, iniciou o curso de Farmácia e Análises Clínicas pela Universidade Federal de Ouro Preto, MG, vindo a graduar-se em agosto de 1999, quando também, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Resíduos Lignocelulósicos	3
2.2. Xilitol.....	5
2.2.1. Propriedades Físico-Químicas	5
2.2.2. Ocorrência	5
2.2.3. Metabolismo.....	6
2.2.4. Xilitol como Adoçante	6
2.2.5. As Características na Prevenção de Cáries Dentárias	7
2.2.6. Uso Clínico do Xilitol.....	8
2.2.7. Outros Usos Potenciais	8
2.2.8. Segurança e Toxicidade	9
2.2.9. Mercado de Consumo e Produção	9
2.3. Produção de Xilitol	10
2.3.1. Produção por Via Química	10

2.3.2. Produção por Via Biotecnológica	11
2.3.2.1. Microrganismos Utilizados	11
2.3.2.2. Aspectos Bioquímicos	12
2.3.2.3. Fatores de Regulação da Biossíntese de Xilitol	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Microrganismos	19
3.2. Triagem de Leveduras para Produção de Xilitol a partir de D-xilose	20
3.2.1. Manutenção das Culturas.....	20
3.2.2. Produção do Inóculo	20
3.2.3. Triagem	21
3.3. Triagem de Fungos Filamentosos para Produção de Xilitol a partir de D-xilose	21
3.3.1. Manutenção das Culturas e Produção do Inóculo	21
3.3.2. Obtenção e Padronização da Suspensão de Esporos.....	21
3.3.3. Triagem	22
3.4. Determinação da Concentração de D-xilose e Xilitol	22
3.5. Determinação dos Parâmetros da Bioconversão.....	23
3.6. Efeito das Condições Reguladoras da Bioconversão de D-xilose a Xilitol	23
3.6.1. Microrganismo	23
3.6.2. Inóculo	24
3.6.2.1. Manutenção e Produção.....	24
3.6.2.2. Determinação da Relação Massa Celular Seca versus Densidade Óptica.....	24
3.6.3. Medida de Crescimento	25
3.6.4. Determinação da Concentração de D-xilose e Xilitol	25
3.6.5. Parâmetros da Bioconversão	25
3.6.6. Delineamento Experimental.....	25
3.6.7. Efeito da Concentração de D-xilose	25

3.6.8. Efeito da Concentração de Células do Inóculo Inicial.....	26
3.6.9. Efeito da Aeração por Controle da Agitação.....	26
3.6.10. Efeito da Concentração de Extrato de Levedura	26
3.7. Caracterização Fisiológica e Bioquímica da Levedura 1.70	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Triagem de Microrganismos para Produção de Xilitol a partir de D-xilose	28
4.2. Definição das Condições Reguladoras da Bioconversão de D-xilose a Xilitol	34
4.2.1. Concentração de D-xilose.....	34
4.2.2. Concentração de Células do Inóculo Inicial.....	38
4.2.3. Nível de Aeração da Cultura	41
4.2.4. Concentração do Extrato de Levedura	44
4.3. Caracterização Fisiológica e Bioquímica da Levedura 1.70.....	47
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE	65
APÊNDICE A	66
APÊNDICE B	67

RESUMO

SAMPAIO, Fábio Coelho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001.

Seleção de microrganismos para a conversão de xilose em xilitol.

Orientador: Jorge Luiz Cavalcante Coelho. Conselheiros: Flávia Maria Lopes Passos e Virgínia Maria Chaves-Alves.

Foram avaliadas duzentos e cinquenta e duas leveduras isoladas do ambiente da indústria de laticínios, dezoito leveduras isoladas de frutos de café e onze fungos filamentosos da micoteca do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, para obtenção de xilitol a partir de D-xilose. Esses microrganismos foram cultivados em meio mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura, a 30°C e 100 rpm. Dezenove leveduras, que apresentaram produtividade volumétrica (Q_p) entre 0,06 e 0,12 g L⁻¹ h⁻¹ e rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,14 a 0,57 g g⁻¹, foram selecionadas. Os fungos filamentosos apresentaram baixa produção de xilitol variando de 0,14 a 0,52 g L⁻¹, e produtividade volumétrica (Q_p) de 0,002 a 0,006 g L⁻¹ h⁻¹. As leveduras selecionadas foram avaliadas numa segunda triagem, com padronização do inóculo inicial. Para seis isolados, a produção de xilitol variou de 4,60 a 6,23 g L⁻¹, a partir de 10,73 g L⁻¹ de D-xilose com produtividade específica (q_p) entre 0,17 e 0,26 mmol g⁻¹ h⁻¹, $Q_p=0,10$ a 0,13 g L⁻¹ h⁻¹ e $Y_{P/S}=0,43$ a 0,58 g g⁻¹. Destacou-se a levedura 1.70, produzindo 6,23 g L⁻¹ de xilitol ($Q_p=0,13$ g L⁻¹ h⁻¹, $q_p=0,26$ mmol g⁻¹ h⁻¹ e $Y_{P/S}=0,58$ g g⁻¹), a qual foi

selecionada para determinação das melhores condições de cultivo. A melhor concentração de D-xilose foi 51,35 g L⁻¹, com produção de 32,70 g L⁻¹ de xilitol (Q_p=0,49 g L⁻¹ h⁻¹, q_p=0,49 mmol g⁻¹ h⁻¹ e Y_{P/S}=0,64 g g⁻¹). Utilizando 1,45 g L⁻¹ de massa celular, como inóculo inicial, foram obtidos os melhores parâmetros fermentativos (36,2 g L⁻¹ de xilitol a partir de 56,80 g L⁻¹ de D-xilose, Q_p=0,60 g L⁻¹ h⁻¹, q_p=0,58 mmol g⁻¹ h⁻¹ e Y_{P/S}=0,65 g g⁻¹). A melhor taxa de aeração foi obtida com 200 rpm, produzindo 27,20 g L⁻¹ de xilitol a partir de 46,70 g L⁻¹ de D-xilose (Q_p=0,90 g L⁻¹ h⁻¹, q_p=0,74 mmol g⁻¹ h⁻¹ e Y_{P/S}=0,57 g g⁻¹). Para 0,5% de extrato de levedura MERCK[®], obteve-se 33,00 g L⁻¹ de xilitol a partir de 50,00 g L⁻¹ de D-xilose (Q_p=0,64 g L⁻¹ h⁻¹, q_p=0,67 mmol g⁻¹ h⁻¹ e Y_{P/S}=0,65 g g⁻¹), e para 0,5% de extrato de levedura DIFCO[®] obteve-se 33,65 g L⁻¹ de xilitol a partir de 47,00 g L⁻¹ de D-xilose (Q_p=0,67 g L⁻¹ h⁻¹, q_p=0,60 mmol g⁻¹ h⁻¹ e Y_{P/S}=0,72 g g⁻¹). A levedura 1.70 foi caracterizada por provas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, visando a identificação de gênero e espécie. Entretanto, os resultados não foram conclusivos, apesar da semelhança morfológica com o gênero *Pichia*.

ABSTRACT

SAMPAIO, Fábio Coelho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, august 2001.

Selection of microorganisms for conversion of xylose to xylitol.

Adiviser: Jorge Luiz Cavalcante Coelho. Committee Members: Flávia Maria Lopes Passos e Virgínia Maria Chaves-Alves.

Two hundred fifty-two yeast isolated from a dairy industry environment, eighteen yeast isolated from coffee fruits and eleven filamentous fungi from the Universidade Federal de Viçosa, Microbiology Department fungal collection were screened for xylitol production by growing them in mineral medium supplemented with 1% Dxylose and 0.5% yeast extract, at 30°C and 100 rpm. Nineteen yeast that presented volumetric productivities (Q_P) between 0.06 and 0.12 g L⁻¹ h⁻¹ and yields ($Y_{P/S}$) from 0.14 to 0.57 g g⁻¹ were selected. Xylitol production by the filamentous fungi was low, varying from 0.14 to 0.52 g L⁻¹ presenting volumetric productivities (Q_P) from 0.002 to 0.006 g L⁻¹ h⁻¹. In a second screening of the nineteen yeast selected, for six isolated, xylitol production varied from 4.60 to 6.23 g L⁻¹ when starting with 10.73 g L⁻¹ D-xylose. Specific productivities (q_P) varied between 0.17 and 0.26 mmol g⁻¹ h⁻¹, Q_P from 0.10 to 0.13 g L⁻¹ h⁻¹ and $Y_{P/S}$ from 0.43 to 0.58 g g⁻¹. Yeast 1.70 stood out, producing 6.23 g L⁻¹ xylitol ($Q_P=0.13$ g L⁻¹ h⁻¹, $q_P=0.26$ mmol g⁻¹ h⁻¹ and $Y_{P/S}=0.58$ g g⁻¹). Yeast 1.70 proved promising for xylitol production and its optimal growth conditions were therefore determined.

The best D-xylose concentration was 51.35 g L^{-1} , resulting in production of 32.70 g L^{-1} xylitol ($Q_P=0.49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P=0.49 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{P/S}=0.64 \text{ g g}^{-1}$). The best fermentation parameters were obtained using 1.45 g L^{-1} of cellular mass as initial inoculum (36.2 g L^{-1} xylitol from 56.80 g L^{-1} D-xylose, $Q_P=0.60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P=0.58 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{P/S}=0.65 \text{ g g}^{-1}$). The best aeration rate was obtained at 200 rpm, producing 27.20 g L^{-1} xylitol from 46.70 g L^{-1} D-xylose ($Q_P=0.90 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P=0.74 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{P/S}=0.57 \text{ g g}^{-1}$). The addition of 0.5% MERCK[®] yeast extract produced 33.00 g L^{-1} xylitol from 49.40 g L^{-1} D-xilose ($Q_P=0.64 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P=0.67 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{P/S}=0.65 \text{ g g}^{-1}$) while the addition of 0.5% DIFCO[®] yeast extract produced 33.65 g L^{-1} xylitol from 47.00 g L^{-1} D-xylose ($Q_P=0.67 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P=0.60 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{P/S}=0.72 \text{ g g}^{-1}$). Yeast 1.70 was characterized through physiological, biochemical and morphological tests, in an attempt to identify it. However, in spite of a morphological similarity to the genus *Pichia*, results were inconclusive.

1. INTRODUÇÃO

A importância econômica e social do xilitol, que o coloca como produto de elevado valor agregado, reside em seu alto poder adoçante, sua propriedade anticariogênica e metabolismo insulina-independente que garantem sua aplicação nas indústrias de alimento e farmacêutica.

O xilitol é obtido industrialmente por via química, a partir da redução de D-xilose derivada de hidrolisados lignocelulósicos. Esta produção é assegurada por patentes e envolve desde a hidrólise da matéria-prima, resíduos lignocelulósicos ricos em xilana, até a hidrogenação catalítica de D-xilose a xilitol. Entretanto, o rendimento da conversão é baixo (50 a 60%), e são necessárias várias operações como troca iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico para purificação até o produto final, aumentando, assim, o preço de comercialização do xilitol.

A produção microbiana é uma alternativa ao processo químico, com a vantagem de ser conduzida em condições de temperatura e pressão brandas, portanto, com menor gasto de energia e, devido à especificidade da bioconversão, são obtidos rendimentos mais elevados, com baixo custo de separação/purificação, e efluentes mais limpos.

A seleção de microrganismos que fermentam D-xilose a xilitol, é o primeiro passo para o desenvolvimento de um processo de bioconversão com

alta produtividade e rendimento. Os fungos filamentosos, a maioria das leveduras e algumas bactérias são capazes de realizar essa bioconversão devido à presença da enzima xilose redutase NAD(P)H-dependente (XR) (EC 1.1.1.21), responsável pela redução de D-xilose a xilitol. A maioria das pesquisas sobre produção microbiana de xilitol utiliza leveduras, destacando-se o gênero *Candida*.

A produção de xilitol, assim como outros processos de bioconversão, é influenciada pelas condições ambientais. Fatores como temperatura, concentração de xilose, pH do meio de cultivo, concentração do inóculo, estado fisiológico do inóculo e taxa de aeração são críticos para a bioconversão.

Neste estudo, foram selecionadas espécies microbianas capazes de fermentar D-xilose a xilitol com alta produtividade e rendimento, e foram avaliadas algumas condições de cultivo reguladoras do processo de bioconversão, isto é, concentração de D-xilose, concentração de células do inóculo inicial, taxa de aeração pelo controle da agitação e concentração de extrato de levedura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resíduos Lignocelulósicos

Os resíduos agroindustriais, ou lignocelulósicos, são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. As hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinanas (du TOIT et al., 1984; BIELY, 1985; KERN et al., 1997; AGUIAR et al., 1999b).

Em madeira dura e outros resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto teor de xilanas, que são constituídas basicamente por unidades xilanopiranosídicas unidas por ligações β -1,4 com ramificações variáveis (BIELY, 1985; AGUIAR et al., 1999b). Devido à estrutura heterogênea e ao baixo grau de polimerização, xilana é facilmente hidrolisada.

Na hidrólise ácida, a massa do material hemicelulósico é tratada com solução de ácido diluído, sob pressão e temperatura altas, para hidrolisar a hemicelulose e precipitar a lignina. Os açúcares monoméricos dissolvem-se no meio de reação, juntamente com outros solutos. A ocorrência de inespecificidade e sítios deficientes de reação levam à formação de subprodutos indesejáveis, como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético que trazem restrição ao uso da hidrólise ácida (HYVÖNEM et al., 1982), sendo necessária a purificação parcial do hidrolisado (ROBERTO et al., 1994; SILVA et al., 1994;

ROBERTO et al., 1996; PREZIOSI-BELLOY et al., 1997; ALVES et al., 1998; GURGEL et al., 1998; SILVA et al., 1998; CONVERTI et al., 1999; DOMINGUEZ et al., 1999; RAMOS, 1999; CRUZ et al., 2000).

Em razão de sua maior especificidade e condições reacionais brandas, a hidrólise enzimática preserva a integridade dos açúcares que compõem a hemicelulose, evitando a formação de compostos de degradação, e pode substituir a hidrólise química que requer alta pressão e alta temperatura (HYVÖNEM et al., 1982). Entretanto, devido à especificidade das reações, seria necessária a ação conjunta de várias enzimas, que são encontradas na natureza entre bactérias marinhas e terrestres, bactérias do rúmen e ruminantes, hipertermófilos Archaea, fungos, algas, protozoários, crustáceos, insetos e sementes de plantas terrestres, constituindo um grupo complexo de enzimas, destacando-se β -1,4-D-xilana xilohidrolase (EC 3.2.1.8), β -D-xilosídeo xilohidrolase (EC 3.2.1.37), α -D-glicuronidase (EC 3.2.1.-), endo-1,5- α -L-arabinase (EC 3.2.1.99), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6) e ácido ferrúlico esterase (EC 3.1.1.-) (BIELY, 1985; NITISINPRASERT e TEMMES, 1991; HALTRICH et al., 1993; FERREIRA-FILHO, 1994; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997; AGUIAR et al., 1999b; FERREIRA, 1999; PINHEIRO, 1999; SILVEIRA et al., 1999; DUARTE, et al., 2000; LI et al., 2000).

Outras técnicas são utilizadas para obtenção de hidrolisado de resíduos lignocelulósicos ricos em xilana, tais como: autohidrólise "steam explosion" (MARCHAL et al., 1986; PREZIOSI-BELLOY et al., 1997; PREZIOSI-BELLOY et al., 2000) e extração, utilizando-se soluções alcalinas (du TOIT et al., 1984).

D-xilose, o principal produto da hidrólise de xilanas, pode ser convertida em proteína microbiana e em uma gama de substâncias de interesse industrial, tais como: combustíveis e solventes (etanol, butanol, 2,3-butanodiol, acetona e 2-propanol), alditóis (xilitol e glicerol) e ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e butírico), podendo também ser utilizada como substrato para produção de glicose isomerase (MARCHAL et al., 1986; FRAZER e MCCASKEY, 1989; FOGARTY e KELLY, 1990; AGUIAR et al., 1999b).

2.2. Xilitol

2.2.1. Propriedades Físico-Químicas

O xilitol apresenta a seguinte fórmula química: $C_5H_{12}O_5$, com peso molecular igual a 152,15 g. Sua aparência é de pó cristalino e cor branca, sendo inodoro e de sabor doce, apresentando poder adoçante igual ao da sacarose e maior do que o do sorbitol. Seu valor calórico é $4,0 \text{ Kcal g}^{-1}$. Apresenta solubilidade a 30°C igual à da sacarose (68 g por 100 g de solução). Ele é muito estável em soluções aquosas, mesmo sob condições de processamento usadas na indústria de alimentos. O ponto de fusão varia entre $92 - 96^\circ\text{C}$, e o ponto de ebulição é 216°C . Em elevada umidade relativa, o xilitol é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol. O calor de solução é igual a $-34,8 \text{ cal g}^{-1}$, dando uma sensação refrescante semelhante ao mentol. Sua densidade é igual a 1,50, sendo que, a densidade da solução de xilitol, como uma função da concentração, é menor em comparação com solução de sorbitol e sacarose (RUSSO, 1977; EMODI, 1978; HYVÖNEM et al., 1982; OLINGER, 2000).

2.2.2. Ocorrência

Xilitol é um açúcar amplamente distribuído na natureza. Plantas e frutas contêm, relativamente, baixa concentração, sendo a extração a partir de fontes naturais inviável economicamente. É encontrado como intermediário normal do metabolismo de carboidrato em mamíferos (ciclo do ácido glicurônico-xilulose), com produção de 5 a 15 g por dia em metabolismo normal. A concentração de xilitol no sangue encontra-se na faixa de $0,03 - 0,06 \text{ mg por } 100 \text{ mL de sangue}$ (RUSSO, 1977; EMODI, 1978; YILIKARI, 1979; HYVÖNEM et al., 1982).

2.2.3. Metabolismo

Xilitol é absorvido no intestino por difusão passiva ou facilitada, sendo que uso regular aumenta a taxa de absorção. O xilitol absorvido é transportado até o fígado, onde primeiramente é oxidado a D-xilulose pela poliol desidrogenase inespecífica que usa NAD^+ como coenzima ou oxidado a L-xilulose pela enzima específica NADP-poliol desidrogenase. D-xilulose é rapidamente fosforilada para D-xilulose-5-fosfato pela D-xilulose quinase. D-xilulose-5-fosfato é o intermediário normal da via das pentoses, e pode ser convertido para glicose-6-fosfato por reações dessa via. A glicose-6-fosfato pode, então ser convertida em glicose e glicogênio, ou em piruvato e lactato. Normalmente, no fígado, a maior porção de xilitol é transformada em glicose e armazenada na forma de glicogênio (YLIKARI, 1979).

2.2.4. Xilitol como Adoçante

Dentre os adoçantes alternativos, xilitol é cada vez mais empregado na indústria de alimentos, principalmente em confeitaria, como substituto da sacarose, sendo conhecido como a “Segunda Geração dos Adoçantes Polióis” (DOMINGUEZ et al., 1997; IKEUCHI et al., 1999). As características físico-químicas favorecem sua aplicação na formulação de balas mastigáveis, bala de hortelã, gomas de mascar, cobertura de drageados, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geléias, marmeladas, bebidas, etc., contribuindo ainda para a conservação, pois, dificulta o crescimento microbiano e a absorção de água (EMODI, 1978; HYVÖNEM et al., 1982; OLINGER et al., 2000).

Devido a ausência dos grupos aldeído e cetona na molécula, o xilitol não interage com proteínas nas reações de escurecimento do tipo Maillard, o que favorece sua utilização como ingrediente de alimentos processados a temperaturas elevadas quando essas reações não são desejáveis (HYVÖNEM et al., 1982).

2.2.5. As Características na Prevenção de Cáries Dentárias

Como adoçante em produtos de grande consumo por crianças, como balas, confeitos, goma de mascar, etc., a substituição da sacarose pelo xilitol torna o produto aceitável em sabor, além de contribuir em programas de prevenção de cáries.

Sacarose é um efetivo fator etiológico em cáries dentárias, contribuindo indiretamente para o desenvolvimento de doenças periodontais, por apresentar importância para adesão e crescimento bacteriano na cavidade bucal, com a formação do ácido que causa a desmineralização dos dentes. A sacarose é utilizada por várias bactérias, como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, encontradas em cáries dentárias (MÄKINEN, 1979; OLINGER, 2000). No final de 1960, xilitol chamou a atenção dos pesquisadores por não ser metabolizado por microrganismos específicos da microbiota bucal, não produzindo ácidos, mantendo o pH numa faixa segura de aproximadamente 5,5 a 6,0 (YILIKARI, 1979; HYVÖNEM et al., 1982; AGUIAR et al., 1999a).

O uso de xilitol é recomendado por dentistas em virtude de sua ação cariostática, inibindo a fermentação nas placas bacterianas já existentes, não-cariogênica, inibindo a formação de placas bacterianas e, conseqüentemente, de carie dental e anticariogênica, alterando o fluxo e a composição química da saliva com o aumento na concentração dos íons cálcio e fosfato, importantes na remineralização das lesões já existentes (MÄKINEN, 1979).

Os efeitos da substituição de sacarose da dieta por frutose e xilitol foram testados em voluntários na Finlândia (RUSSO, 1977). Após dois anos notou-se que, no grupo em que a dieta continha apenas frutose, houve redução de 30% na incidência de cárie dentária em relação ao grupo que consumiu sacarose. Para o grupo que consumia xilitol, houve redução de 90%.

2.2.6. Uso clínico do xilitol

Outra aplicação do xilitol é na nutrição de indivíduos diabéticos, uma vez que o uso de carboidratos rapidamente absorvidos, como glicose, são contra-indicados. O xilitol é lentamente absorvido, não causando mudanças rápidas na concentração de glicose no sangue, além de possuir metabolismo independente da insulina. A maior parte da glicose, formada a partir de xilitol, é armazenada no fígado em forma de glicogênio. A ingestão deste adoçante não leva a mudanças significativas nas concentrações de lipídios, urato ou outros componentes do sangue (YILIKARI, 1979; AGUIAR et al., 1999a; OLINGER, 2000).

O uso do xilitol em nutrição parenteral é recomendado no estado pós-operatório e pós-traumático, em que ocorre resistência à insulina com utilização deficiente de glicose (YILIKARI, 1979).

A prevenção de otite média aguda é outro uso clínico potencial de xilitol. UHARI et al. (1996), trabalhando com 306 crianças que apresentaram, na maioria, o quadro de otite média aguda recorrente, avaliaram a ministração de xilitol em gomas de mascar. Esses autores observaram menor recorrência da doença, concluindo que xilitol tem efeito preventivo contra otite média aguda. Em outro trabalho, UHARI et al. (2001) mostraram que o xilitol inibe o crescimento *in vitro* de *Streptococcus pneumoniae* e inibe a ligação de *Pneumococos* e *Haemophilus influenzae* às células da nasofaringe. Uma dose diária de 8,4 – 10 g, dividida em 5 doses, foi clinicamente efetiva e permitiu menor utilização dos antimicrobianos.

2.2.7. Outros Usos Potenciais

Xilitol pode ser utilizado como agente osmolítico de proteínas (ZABNER et al., 2000), bem como na fabricação de poliésteres ramificados (poli-hidroxi-propil) no campo da traumatologia (AGUIAR et al., 1999a) e na formulação de produtos da indústria farmacêutica (EMODI, 1978; UHARI et al., 1996).

2.2.8. Segurança e Toxicidade

Xilitol, *in vivo*, não induz alteração na concentração de triglicérides e de colesterol, sendo a diarreia osmótica um dos poucos efeitos colaterais. Em indivíduos não-adaptados, a dose máxima de xilitol que não causa diarreia é 20 - 40 g dia⁻¹. Entretanto, após algumas semanas de adaptação, doses de até 400 g dia⁻¹ são toleradas (EMODI, 1978; YILIKARI, 1979).

A infusão de grandes quantidades de xilitol, através de dietas parenterais, pode levar à acidose láctica e formação de cristais de oxalato de cálcio. Infusão segura é de no máximo 0,25 mg Kg⁻¹ h⁻¹ (YILIKARI, 1979).

2.2.9. Mercado de Consumo e Produção

Em nível mundial, o mercado vem apresentando crescimento notável (preço FOB US\$ 15 Kg⁻¹). No Brasil, o xilitol pode ser considerado produto em fase de introdução, e foi aprovado como produto dietético pelo DIMED, Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos do Ministério da Saúde, conforme processo número 4624/79 comunicado número 730/80 de 7 de julho de 1980. Na Alemanha, seu uso é permitido para alimentos, sendo aceito na nova regulamentação de produtos para diabéticos. Na Argentina, seu uso é permitido pela legislação alimentícia. No Canadá, o xilitol é permitido em gomas de mascar, desde agosto de 1976, nos níveis considerados adequados ao processo. Nos Estados Unidos, pode ser usado em alimentos dietéticos em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. Na França, há permissão para seu uso em alimentos que estão sob estudo. Na Inglaterra, o xilitol consta na lei alimentícia. No Japão, é permitido somente para nutrição parenteral. No México, é permitido como açúcar substituto para diabéticos. Na Suíça, é mencionado na legislação alimentícia desde 1936, sendo seu uso permitido em produtos dietéticos, desde que declarado (AGUIAR et al., 1999a; AGUIAR et al., 1999b).

Devido às etapas de fracionamento, separação e purificação por meio da utilização de técnicas cromatográficas no processo químico, o valor comercial

do xilitol é elevado e, conseqüentemente, a produção anual é restrita, o que impede a ampliação do mercado consumidor.

2.3. Produção de Xilitol

2.3.1. Produção por Via Química

Até 1975, a produção de xilitol estava centralizada na Itália, Alemanha, antiga União Soviética, Japão e China. A produção em larga escala foi iniciada na Finlândia, pela Finnish Sugar Co. Ltd., Helsinque, produzindo acima de 3.000 toneladas ano⁻¹, utilizando “*birchwoods*”, madeira que contém alto teor de xilana. Em 1976, os direitos de produção foram transferidos para a Xyrofin Ltda, uma sociedade comercial entre a Finnish Sugar Co. e a F. Hoffmann – La Roche e Co. Ltd., Basileia, Suíça (HYVÖNEM et al., 1982).

O xilitol é obtido por hidrogenação catalítica de xilose pura. Este processo é assegurado por patentes, e envolve desde a hidrólise da matéria-prima lignocelulósica e purificação para obtenção de xilose até a hidrogenação a xilitol e purificação final. A hidrogenação catalítica utiliza temperatura variando de 80 a 140°C e pressão de 50 atm na presença de metal catalisador. Alguns processos foram desenvolvidos utilizando-se subprodutos da agroindústria, tais como a casca de amêndoa, na Itália, a casca de arroz e caroço de algodão, na China e ex-União Soviética, permitindo o aproveitamento dessa biomassa que causa problemas de poluição ambiental (RUSSO, 1977; HYVÖNEM et al., 1982; GURGEL et al., 1993; SILVA et al., 1994; SILVA et al., 1997; RODRIGUES et al., 1998a; IKEUCHI et al., 1999; RAMOS, 1999; OLINGER, 2000).

2.3.2. Produção por Via Biotecnológica

2.3.2.1. Microrganismos Utilizados

A produção microbiana é uma alternativa para obtenção de xilitol, que mostra-se competitiva pelo fato de ser conduzida em condições de temperatura e pressão brandas, além de maior especificidade das enzimas microbianas no processo de bioconversão, o que resulta em alto rendimento, baixo custo de separação/purificação e efluentes mais limpos. Leveduras são consideradas os melhores produtores de xilitol, destacando-se o gênero *Candida* (BARBOSA et al., 1988; CAO et al., 1994; WINKELHAUSEN et al., 1996; FURLAN et al., 1997; KERN et al., 1997; SÁNCHEZ et al., 1997; OH et al., 1998; RODRIGUES et al., 1998a; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998; IKEUCHI et al., 1999; RAMOS, 1999; CHOI et al., 2000).

Leveduras são encontradas em vários ambientes, como solo e plantas, destacando-se também na indústria de laticínios. A expressão dos genes das enzimas do metabolismo de D-xilose é induzida pela presença do substrato D-xilose. Os genes codificadores dessas enzimas estão presentes na maioria das leveduras, e é possível obter espécies produtoras de xilitol a partir de isolados de ambientes com baixa concentração ou ausência de D-xilose, assim como, ambiente de laticínios.

Trabalhos realizados por RHOM et al. (1992), JAKOBSEN e NARVHUS (1996), FLEET(1999) e GADAGA et al. (2000), referem-se à presença dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Debaryomyces* em ambientes relacionados a laticínios. Espécies destes gêneros utilizam lactose como fonte de carbono, e destacam-se em estudos de bioconversão de D-xilose a xilitol.

Algumas espécies de bactérias são capazes de converter D-xilose a xilitol, embora não atraiam o interesse dos pesquisadores devido à baixa produção. Para a maioria das bactérias, xilose é isomerizada diretamente a xilulose por ação da enzima xilose isomerase, não havendo, portanto, a produção de xilitol (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998; AGUIAR et al., 1999b).

A utilização de fungos filamentosos para produção de xilitol foi inicialmente descrita por CHIANG e KNIGHT (1960), que trabalharam com *Penicillium chrysogenum*, enquanto no último relato consta que *Petromyces albertensis* acumulou 39,8 g L⁻¹ de xilitol quando cultivado por 10 dias em 100 g L⁻¹ de xilose (DAHIYA, 1990).

Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza, onde possuem papel na decomposição de matéria orgânica, estando também relacionados à maioria das fitopatologias. Uma vez que a matéria orgânica contém grande quantidade de pentoses, principalmente na forma de pentosanas, e que xilose, após a glicose, é o açúcar mais encontrado na natureza, é de interesse o estudo do metabolismo deste substrato por fungos filamentosos (CHIANG e KNIGHT, 1960).

Um dos primeiros relatos de produção microbiana de xilitol refere-se à triagem de microrganismos adequados para o processo de bioconversão. Dentre 44 leveduras pertencentes a 5 gêneros e distribuídas em 12 espécies, *Pichia stipidis* 709-261, *Candida tropicalis* 1004 e *Candida guilliermondii* FTI-20037 consumiram mais de 90% da xilose nas primeiras 24 h (BARBOSA et al., 1988). As outras consumiram mais de 90%, após 48 h de cultivo. As duas melhores produtoras foram *C. tropicalis* 1004 e *C. guilliermondii* FTI-20037, as quais acumularam 17 e 16 g L⁻¹ de xilitol representando 0,57 e 0,53 g de xilitol por grama de D-xilose consumida, respectivamente. Estudos semelhantes foram realizados por du PREEZ e PRIOR (1985), JEFFRIES e KURTZMAN (1994), SIRISANSANEEYAKUL et al. (1995), LEMBO et al. (1997) e IKEUCHI, et al. (1999).

2.3.2.2. Aspectos Bioquímicos

No metabolismo microbiano, D-xilose é primeiro reduzida a xilitol por ação da xilose redutase NADPH ou NADH dependente (EC 1.1.1.21), produto do gene *xy1*. Xilitol é, então, oxidado para xilulose pela ação da xilitol desidrogenase NAD⁺ ou NADP⁺ dependente (EC 1.1.1.9), produto do gene *xy2*. Esta reação é seguida pela formação de xilulose-5-fosfato, por ação de xilulose

quinase ATP-dependente (EC 2.7.1.17), que entra na via das pentoses. A formação de ATP e a oxidação de NADH são realizadas na cadeia de transporte de elétrons, na mitocôndria, sendo fortemente dependentes de oxigênio, o qual é de vital importância para a regeneração dos cofatores essenciais para o metabolismo, formação de biomassa e excreção de xilitol (YILIKARI, 1979; KERN et al., 1997; SILVA et al., 1997; SILVA et al., 1998; AZUMA et al., 2000; OSTERGAARD et al., 2000).

Um modelo para compreensão das duas etapas envolvidas no metabolismo de xilose em xilitol foi proposto por BARBOSA et al. (1988), em que, pela via pentose fosfato, ocorre oxidação de um mol de glicose-6-fosfato a CO_2 e H_2O gerando doze moles de NADPH e doze moles de NADP^+ . A manutenção do balanço de cofatores é assegurada pela utilização do NADPH durante a redução de xilose. O xilitol será somente catabolizado para produzir glicose-6-fosfato, regenerando, assim, NADPH e mantendo o ciclo.

De acordo com a constante de Michaelis-Menten para NADPH ($K_M=0,036$ mM) e para NADH ($K_M=0,085$ mM), SIRISANSANEEYAKUL et al. (1995) determinaram, para *Candida mogii* ATCC 18364, que D-xilose é preferencialmente reduzida para xilitol pela D-xilose redutase NADPH dependente e, então, oxidado para xilulose via xilitol desidrogenase NAD^+ dependente. NOLLEAU et al. (1995) determinaram a mesma especificidade de cofatores para as enzimas de *C. guilliermondii* e *Candida parapsilosis*.

VERDUYN et al. (1985) determinaram que xilose redutase de *P. stipitis* apresenta dupla especificidade para NADPH e NADH, sendo que maior atividade ocorreu na utilização de NADPH como cofator.

KERN et al. (1997) utilizando diferentes modelos de indução, concluíram que a síntese dessas duas enzimas não está sob controle ordenado em *Candida tenuis*, e que a formação de aldose redutase ativa, NADPH e NADH-dependente, foi induzida durante crescimento de *C. tenuis* em várias pentoses estruturalmente relacionadas. D-xilose e L-arabinose foram identificadas como melhores indutores, enquanto D-arabinose e D-lixose, as quais não ocorrem comumente na natureza, aumentaram a atividade aldose redutase. Xilitol desidrogenase foi significativamente induzida por

D-xilose, L-arabinose e D-lixose, enquanto D-arabinose teve pequeno efeito indutor. Segundo esses autores, o xilitol, substrato da xilitol desidrogenase, não induz especificamente a síntese da enzima responsável por sua assimilação na célula.

2.3.2.3. Fatores de Regulação da Biossíntese de Xilitol

Todos os dados publicados sobre essa bioconversão demonstram que o acúmulo de xilitol no meio é influenciado pelas condições ambientais. Estudar o efeito destas condições é de particular interesse, como pré-requisito para se obter maior rendimento e produtividade na produção deste adoçante.

A concentração de D-xilose é considerada fator crítico para o crescimento do microrganismo e bioconversão. Na ausência de D-xilose, não ocorre formação de xilitol. D-xilose é requerida para a indução de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) (ROBERTO et al., 1994; SIRISANSANEEYAKUL et al., 1995; OH et al., 1998; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998; AGUIAR et al., 1999a; SILVA e ROBERTO, 1999).

DAHIYA (1991) observou que, na presença de 100 g L^{-1} de D-xilose, *P. albertensis* alcançou a produção máxima de $36,8 \text{ g L}^{-1}$ de xilitol. Quando a concentração de D-xilose foi aumentada para 150 g L^{-1} , a produção de xilitol diminuiu, o que pode ser explicado pelo efeito osmótico, ou repressão pelo substrato das enzimas do metabolismo de xilose.

Em razão de uma elevada pressão osmótica, resultante da concentração inicial de D-xilose de 300 g L^{-1} , *C. guilliermondii* apresentou redução na taxa de produção de xilitol, que alcançou 160 g L^{-1} (MEYRIAL et al., 1991). Embora o crescimento celular tenha sido prejudicado com o aumento na concentração inicial de substrato, a capacidade excretora da levedura aumentou, já que menor concentração celular foi responsável por maior produção de xilitol.

DOMINGUEZ et al. (1996) observaram um aumento na produção de xilitol por *Candida* sp 11.2, atingindo o máximo de $28,9 \text{ g L}^{-1}$, após 48 h de cultivo na presença de concentrações de D-xilose variando de 30 a 50 g L^{-1} ,

utilizando hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar. Acima da concentração de 50 g L⁻¹ de D-xilose, ocorreu queda na produção.

Em concentrações muito altas de D-xilose, entre 217 e 279,24 g L⁻¹, *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426 consumiu lentamente o açúcar devido à alta pressão osmótica (DOMINGUEZ et al., 1997). Da mesma forma, *C. tropicalis* KFCC-10960 não suportou concentrações de xilose acima de 150 g L⁻¹, resultando em decréscimo na taxa de produção volumétrica de xilitol (OH e KIM, 1998).

O pH extracelular tem grande influência no processo metabólico, embora este fator varie para cada espécie. As leveduras, geralmente, crescem bem em meio ácido com pH variando entre 3,5 e 3,8. O limite de tolerância está entre 2,5 e 8,0 para várias espécies (ROBERTO et al., 1996; SÁNCHEZ et al., 1997; SILVA et al., 1998). A membrana celular não é completamente permeável a íons hidrogênio e, assim, o pH intracelular e do meio podem ser diferentes. Afetando a permeabilidade celular, o pH pode influenciar a solubilidade ou precipitar alguns componentes do meio, tornando impossível sua assimilação (SÁNCHEZ et al., 1997).

O melhor pH para a bioconversão de xilitol por *D. hansenii* NRRL Y-7426, foi entre 4,5 e 5,5. No pH inicial de 4,5, a concentração e produtividade de xilitol foram 86,29 g L⁻¹ e 1,80 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, enquanto para o pH de 5,5 foram 91,91 g L⁻¹ e 1,91 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente (DOMINGUEZ et al., 1997).

A temperatura é outra condição de cultivo que influencia o processo de bioconversão. A produção de xilitol, por *Candida* sp B-22, foi relativamente constante à temperatura de 35 - 40°C, sendo reduzida acima de 45°C (CAO et al., 1994). Para *D. hansenii* NRRL Y-7426, essa produção foi constante à temperatura entre 28 e 37°C. Neste intervalo de temperatura, a xilose foi rapidamente consumida, e xilitol produzido numa concentração de 100 g L⁻¹. A 44°C a bioconversão de xilose, e conseqüentemente a produção de xilitol (41,88 g L⁻¹), foi reduzida (DOMINGUEZ et al., 1997).

BARBOSA et al. (1988) observaram que na bioconversão, utilizando *C. guilliermondii*, ocorre o máximo acúmulo de xilitol (23 g L⁻¹) e maior velocidade específica de crescimento (0,78 h⁻¹) à temperatura entre 30 - 35°C.

A aeração é condição experimental crítica para produção de xilitol. O suprimento de oxigênio determina se D-xilose será fermentada ou respirada, regulando o equilíbrio do consumo de carbono para bioconversão e crescimento (du PREEZ e PRIOR, 1985; BARBOSA et al., 1988; WINKELHAUSEN et al., 1996; DOMINGUEZ et al., 1997; SILVA et al., 1997; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998; AGUIAR et al., 1999a).

Os aspectos bioquímicos e fisiológicos do requerimento de oxigênio no metabolismo não são inteiramente conhecidos. Parecem estar relacionados ao transporte de açúcares, à regeneração de coenzimas e produção de ATP durante a fosforilação oxidativa (SILVA et al., 1998). Alto potencial redox favorece a formação de massa celular, enquanto baixo potencial redox estimula a produção de xilitol como um produto do metabolismo secundário. Para efetiva produção de xilitol, oxigênio deve ser regulado no menor nível de oxigênio dissolvido (DO) (MALESZKA e SCHNEIDER, 1981; OH et al., 1998; SILVA et al., 1998).

A produção de xilitol por *C. parapsilosis* foi máxima no potencial redox de 100 mv, sendo que acima deste valor houve queda no crescimento celular (OH et al., 1998). Alto potencial redox, ou seja, alta concentração de oxigênio, desvia o consumo de xilose para o crescimento celular.

Para *C. moggii* ATCC 18364 durante condição anóxica (48 h), a concentração de D-xilose e a biomassa permaneceram constantes, enquanto a taxa de formação de etanol e xilitol foi baixa (SIRISANSANEEYAKUL et al., 1995). Xilitol é produzido em condições aeróbicas, bem como em condições de oxigênio limitado, mas não em anaerobiose. Rendimento máximo de xilitol foi obtido, quando a concentração inicial de D-xilose foi 53 g L⁻¹ e a taxa de oxigênio específica foi 0,5 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹.

NOLLEAU et al. (1995) determinaram que a melhor taxa de transferência de oxigênio para *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* foi 2,2 mmol L⁻¹ h⁻¹

e $0,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com rendimentos de $0,66 \text{ g g}^{-1}$ e $0,75 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente.

Trabalhando com *C. guilliermondii* FTI 20037 e hidrolisado de cana-de-açúcar como fonte de D-xilose, SILVA et al. (1997) conseguiram produtividade volumétrica máxima de $0,87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e máximo rendimento de $0,67 \text{ g g}^{-1}$, sob agitação fixada de 400 rpm e taxa de aeração de 0,45 v.v.m. Foi detectado, ainda, que o aumento na taxa de oxigênio alterava o pH de 5,5 para aproximadamente 7,0.

WALTHER et al. (2001) cultivaram *C. tropicalis* ATCC 96745 em diferentes condições de aeração, controlando o volume de meio em frascos de 250 mL: 65 mL (aeróbio), 100 mL (semi-aeróbio) e 135 mL (microaeróbio), avaliando a interação com a concentração de D-xilose. A maior produtividade ($0,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi obtida em condição aeróbia. Eles observaram que, com alta taxa de aeração e alta concentração de xilose, a produção de xilitol era alta. As células cresciam vigorosamente, aumentando a densidade celular e, conseqüentemente, abaixando o nível de oxigênio que permitia a maior produção de xilitol. O mesmo não acontecia com baixa concentração de xilose, que levava à baixa densidade celular e, conseqüentemente, maior nível de oxigênio dissolvido, com menor acúmulo de xilitol. Em condição semi-aeróbia, foi obtido rendimento máximo de $0,7 \text{ g g}^{-1}$ para concentração inicial de 156 g L^{-1} de xilose.

É difícil comparar os dados de diferentes estudos, já que a oxigenação é estimada por diferentes técnicas. Entretanto, é evidente que as leveduras requerem pequena oxigenação do meio de cultivo, para a redução de D-xilose, e apresentam taxas específicas para cada espécie.

Normalmente é necessário suplementar o meio de cultivo com fatores nutricionais, como o extrato de levedura, peptona e extrato de carne. Para algumas leveduras, o extrato de levedura é um importante nutriente para produção de xilitol. Para outras, entretanto, ele não tem efeito significativo, sendo o crescimento dessas leveduras favorecido pela utilização de amônia ou uréia e casaminoácidos como fonte de nitrogênio (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

Maior produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI-20037 foi verificada na presença de 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, e o aumento na concentração para 30 g L⁻¹ resultou em menor produção de xilitol (BARBOSA et al., 1988).

PREZIOSI-BELLOY et al. (2000) trabalhando com auto-hidrolisado de fragmentos de madeira de álamo, observaram que extrato de levedura adicionado ao meio de cultivo até a concentração de 3 g L⁻¹ favorecia a produção de xilitol por *C. guilliermondii*.

O inóculo inicial desempenha papel importante no processo de bioconversão. Alta concentração de células (26 mg mL⁻¹) de *Candida* sp B-22 levou à produção de 210 g L⁻¹ de xilitol a partir de 260 g L⁻¹ de xilose, após 96 h de incubação, com rendimento de 81% do valor teórico (CAO et al., 1994). Esses autores constataram que, utilizando alta densidade de células, o decréscimo no tempo de bioconversão é grande, quando comparado à baixa densidade.

BARBOSA et al. (1988) obtiveram rendimento de aproximadamente 81% do valor teórico, na produção de xilitol, como consequência do decréscimo de oxigênio, o qual favorece a produção de xilitol, utilizando alta concentração celular de *C. guilliermondii*.

Outras condições e técnicas de cultivo podem regular e beneficiar a bioconversão de D-xilose a xilitol, tais como: a concentração de sais (KERN et al., 1997; AZUMA et al., 2000); a utilização simultânea de D-xilose e glicose (ROBERTO et al., 1994; PFEIFER et al., 1996; FURLAN et al., 1997; KERN et al., 1997; PREZIOSI-BELLOY et al., 1997; LEBEAU et al., 1998; OH e KIM, 1998; SILVA et al., 1998; CHOI et al., 2000; GÍRIO et al., 2000; TAVARES et al., 2000); a utilização de metanol no cultivo (DAHIYA, 1990); a idade do inóculo e a adaptação das células (CHEN e GONG, 1985; FELIPE, 1994; PFEIFER et al., 1996; SENE, 1996; CHOI et al., 2000; CRUZ et al., 2000); o cultivo em batelada, batelada alimentada e cultura contínua (FURLAN et al., 1997; RODRIGUES et al., 1998a; RODRIGUES et al., 1998b; CRUZ et al., 2000; TAVARES et al., 2000); e a utilização de células imobilizadas (DOMINGUEZ et al., 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismos

Foram utilizadas leveduras da coleção do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, isoladas do ambiente da indústria de laticínios (GUIMARÃES, 2001) e de frutos de café (SAKIYAMA, 2000, dados não publicados) e os seguintes fungos filamentosos da micoteca do Departamento de Microbiologia: *Penicillium roqueforti* CCT 0062, *Penicillium crustosum* CCT 4034, *Penicillium brevicompactum* CCT 4457, *Penicillium chrysogenum* CCT 1273, *Penicillium purpurogenum* CCT 2008, *Penicillium citrinum* CCT 3281, *Penicillium janthinellum* CCT 3162 catalogados na Fundação André Tosello e *Penicillium expansum* VIC, *Penicillium italicum* DMB1, *Penicillium griseoroseum* CCT 6421 e *Aspergillus niger* DMB2, isolados na Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Triagem de Leveduras para Produção de Xilitol a partir de D-xilose

3.2.1. Manutenção das Culturas

As leveduras do estoque, mantidas a -80°C em 20% de glicerol em YPL e YM, foram ativadas em meio YPL-ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, lactose 2%, ágar-ágar 2%) ou YM-ágar (extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1%, ágar-ágar 2%), incubadas a 30°C por 24 a 48 h. Após incubação, uma alçada de cada levedura foi repicada em meio mineral sólido, pH 6,0 (KH_2PO_4 0,62 g L^{-1} ; K_2HPO_4 2,0 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L^{-1} e MgSO_4 1,1 g L^{-1}), acrescido de 1% de D-xilose (MERCK®) e 0,5% de extrato de levedura e, novamente, incubada nas mesmas condições descritas. As placas foram mantidas a 4°C . Esse estoque foi repicado, semanalmente, e utilizado para padronização do inóculo.

3.2.2. Produção do Inóculo

Na primeira triagem, não houve padronização da concentração de células no inóculo inicial. Uma alçada das colônias foi utilizada como inóculo. Posteriormente, na segunda triagem, a concentração de células no inóculo inicial foi padronizada para uma densidade óptica entre 0,08 e 0,1. Frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL do meio mineral, pH 6,0 (KH_2PO_4 0,62 g L^{-1} ; K_2HPO_4 2,0 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L^{-1} e MgSO_4 1,1 g L^{-1}), acrescido de D-xilose (1%) e extrato de levedura (0,5%) foram inoculados com uma alçada das colônias e incubados a 30°C , 100 rpm por 20 – 24 h. Após esse período, as células foram separadas por centrifugação a 4000 g por 5 minutos a 4°C , e ressuspendidas em 5 mL de água peptonada. Essa suspensão foi utilizada para padronização do inóculo.

3.2.3. Triagem

Na triagem, foi utilizado o mesmo meio mineral e condições de cultivo da produção do inóculo. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0 e 48 h na primeira triagem, e 0, 24 e 48 h na segunda triagem, sendo as concentrações de açúcares (D-xilose e xilitol) do sobrenadante determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A massa seca das células obtidas de alíquotas de 1 mL, retiradas do meio de cultivo, foi determinada por incubação a 105°C por 48 h até peso constante (CALMAM, 1969). Foram determinados os parâmetros da bioconversão (produtividade específica, produtividade volumétrica e rendimento). A segunda triagem com padronização do inóculo foi realizada em duplicata, e os resultados representam as médias dos valores experimentais.

3.3. Triagem de Fungos Filamentosos para Produção de Xilitol a partir de D-xilose

3.3.1. Manutenção das Culturas e Produção do Inóculo

Os fungos filamentosos obtidos na Micoteca do Departamento de Microbiologia foram ativados em meio ágar-aveia inclinado (40 g L⁻¹ de farinha de aveia e 15 g L⁻¹ de ágar) e incubados a 25°C até a esporulação. Após incubação, eles foram mantidos em estoque à temperatura de 4°C. Para produção do inóculo, a cultura estocada foi repicada em tubos de cultura contendo o mesmo meio, e incubada às mesmas condições.

3.3.2. Obtenção e Padronização da Suspensão de Esporos

A suspensão de esporos foi obtida por meio de raspagem da superfície da cultura em ágar-aveia com alça de platina, e posterior ressuspensão em

solução de Tween 80 a 0,5% (v/v). A suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos Vortex, sendo efetuada a contagem do número de esporos em câmara de Neubauer. O inóculo foi padronizado em 10^6 esporos mL^{-1} de meio de triagem .

3.3.3. Triagem

Os fungos foram cultivados em meio mineral de triagem já descrito (item 3.2.3), utilizando-se as mesmas condições de cultivo. Alíquotas do meio foram retiradas nos tempos 0, 24, 48 , 72 e 96 h após inoculação, centrifugadas e analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de D-xilose e xilitol. No tempo de 96 h, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração em tamis de 400 mesh (poro de 37 μm), sendo, em seguida, lavado com água destilada para determinação da massa do micélio seco (g L^{-1}) por incubação a 105°C , por 48 h, até peso constante. Foram determinados os parâmetros da bioconversão (produtividade volumétrica e rendimento). A triagem de fungos filamentosos foi realizada em duplicata, e os resultados representam as médias dos valores experimentais.

3.4. Determinação da Concentração de D-xilose e Xilitol

As alíquotas coletadas do meio de cultivo foram centrifugadas duas vezes a 10.000 rpm em microcentrífuga (SORVAL MC 12V), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -18°C . As análises foram feitas em CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência) – HP Hewlett Packard série 1050, detector HP 1047A, utilizando coluna BIO-RAD aminex HPX-874 (300 x 7,8 mm), eluente H_2SO_4 0,01 N, fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura da coluna de 60°C . Foram utilizados padrões de 5, 10 e 25 mM de D-xilose e xilitol.

As amostras foram diluídas, quando necessário, sendo utilizado o volume de 20 μL para a análise cromatográfica.

3.5. Determinação dos Parâmetros da Bioconversão

Com a concentração dos açúcares e massa celular, foram calculados os parâmetros do processo, conforme se segue:

- Produtividade volumétrica (Q_p) = quantidade de xilitol produzido (g) / L h
- Produtividade específica (q_p) = quantidade de xilitol produzido (mmol) / massa celular (g) h
- Rendimento ($Y_{P/S}$) = quantidade de xilitol produzido (g) / quantidade de D-xilose consumida (g).

Os parâmetros foram calculados, quando a concentração de xilitol era máxima.

3.6. Efeito das Condições Reguladoras da Bioconversão de D-xilose a Xilitol

3.6.1. Microrganismo

Neste experimento, foi utilizada a levedura de código 1.70 isolada de ambiente de laticínios.

3.6.2. Inóculo

3.6.2.1. Manutenção e Produção

A manutenção do isolado 1.70 e a produção do inóculo ocorreram, conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. O meio e as condições de cultivo utilizados para ativação, alteravam-se com a definição dos fatores reguladores da bioconversão.

3.6.2.2. Determinação da Relação Massa Celular Seca versus Densidade Óptica

A levedura (1.70) selecionada foi pré-ativada em 10 mL do meio de triagem (item 3.2.3), nas mesmas condições de cultivo utilizadas. Após 12 - 18 h, foi feita a inoculação de 50 mL do mesmo meio em frascos Erlenmeyer de 125 mL com as células pré-ativadas até uma densidade óptica entre 0,08 - 0,1. Esse frasco foi incubado por 12 - 18 h, nas mesmas condições de cultivo utilizadas anteriormente. Após esse período, as células foram separadas por centrifugação a 4000 g, por 5 minutos a 15°C, e usadas para o preparo de suspensão em 5 mL de água peptonada. Dessa suspensão foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL para as quais foi determinada a massa seca a 105°C por 48 h. Uma amostra de 1 mL da suspensão foi utilizada para realização das seguintes diluições: 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 3×10^{-2} , 4×10^{-2} , 5×10^{-2} e 6×10^{-2} em triplicata. Para estas diluições, foi determinada a absorvância a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU série 600. Esse experimento foi realizado com duas repetições. A regressão linear entre absorvância e massa celular seca (g L^{-1}) permitiu a determinação da massa celular seca correspondente a uma unidade de densidade óptica (WHITE e HEGEMAN, 1998). Uma unidade de densidade óptica a 600 nm equivale a $0,598 \text{ g L}^{-1}$ de massa celular seca.

3.6.3. Medida de Crescimento

O crescimento foi estimado por medida da absorvância em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 600 nm, e convertido a massa celular seca ($1DO=0,598 \text{ g L}^{-1}$ de massa celular seca). As amostras foram diluídas, quando a densidade óptica ultrapassava o valor 0,6.

3.6.4. Determinação da Concentração de D-xilose e Xilitol

Foi realizada, utilizando-se CLAE, conforme descrito no item 3.4. As amostras foram retiradas nos tempos específicos, centrifugadas, sendo o sobrenadante analisado conforme já mencionado.

3.6.5 Parâmetros da Bioconversão

Os parâmetros foram calculados, segundo descrição no item 3.5.

3.6.6. Delineamento Experimental

Este experimento foi realizado com duas repetições, sendo cada repetição analisada em duplicata. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores experimentais.

3.6.7. Efeito da Concentração de D-xilose

Foram avaliadas as concentrações: 2,4; 5,00; 9,50; 23,00; 27,60; 51,35 e 98,40 g L^{-1} de D-xilose. Para o cultivo, foram utilizados o meio e as condições de incubação da triagem (item 3.2.3). O inóculo foi padronizado para uma densidade óptica (DO_{600}) de 0,08 - 0,1. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 h, com exceção do cultivo com 98,40 g L^{-1} de

D-xilose para o qual foram retiradas amostras ainda no tempo de 72, 96 e 120 h.

3.6.8. Efeito da Concentração de Células do Inóculo Inicial

Foi utilizado o meio de cultura descrito no item 3.2.3, acrescido da concentração de 5% de xilose. Os inóculos iniciais testados foram: 0,05; 0,22; 0,45; 1,00; 1,45; 2,20 e 6,5 g L⁻¹ de massa celular seca. A produção do inóculo ocorreu, conforme descrito no item 3.2.2, utilizando-se 5% de D-xilose. O cultivo foi realizado a 30°C e 100 rpm. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 h, com exceção do inóculo de 6,0 g L⁻¹ para o qual foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 10, 20, 30, 40 e 50 h de cultivo.

3.6.9. Efeito da Aeração por Controle da Agitação

Diferentes condições de aeração do meio de cultivo foram obtidas, utilizando-se as seguintes condições de agitação: 100, 200 e 300 rpm. Foram utilizados o meio e todas as condições de cultivo definidas anteriormente. Alíquotas de 1 mL foram retiradas, quando necessário, nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 h.

3.6.10. Efeito da Concentração de Extrato de Levedura

As concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0% de extrato de levedura MERCK[®] foram avaliadas, acompanhadas do controle sem extrato de levedura. Para a concentração de 0,5%, foi utilizado também extrato de levedura DIFCO[®]. Foram utilizados o meio e as condições descritas anteriormente. A levedura foi cultivada por 60 h, sendo retiradas alíquotas de 10 em 10 h, incluindo o tempo zero.

3.7. Caracterização Fisiológica e Bioquímica da Levedura 1.70

A levedura selecionada (1.70) foi caracterizada por meio de provas fisiológicas, bioquímicas e análise morfológica, conforme descrito por KURTZMAN e FELL (1997). Foram realizados testes de fermentação de sacarose, glicose, galactose, lactose, maltose e xilose, além dos testes de assimilação de glicose, galactose, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-raminose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, inulina, amido solúvel, metanol, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), D-manitol, D-glucitol (D-sorbitol), inositol, isopropanol, etilacetato, acetona, citrato, gliconato, salicina, α -metil-D-glicosídeo, glicosamina, nitrato, nitrito e L-lisina. Foram avaliadas a resistência a 1% de acetato, à alta concentração de NaCl e à cicloheximida, crescimento em diferentes temperaturas (15, 25, 30, 37 e 42°C), produção de acetato e de urease e testes indicativos da atividade de β -galactosidase e xilanases. O tamanho e morfologia das células, a presença e tipo de divisão celular e a presença e tipo de esporo formado foram observados com auxílio de microscopia óptica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Triagem de Microrganismos para Produção de Xilitol a partir de D-xilose

Para a triagem de leveduras, foram utilizados duzentos e cinquenta e dois isolados do ambiente de laticínios e dezoito isolados de frutos de café (quatro epifíticas e quatorze, provavelmente, endofíticas). Sessenta e uma leveduras não produziram xilitol, sendo que cinco não consumiram D-xilose (2.97, 2.98, 3.50, IV END 29, IV EPI 125). Para as demais, a produção variou de 0,01 a 5,30 g L⁻¹ a partir de 10,50 g L⁻¹ de D-xilose, com consumo variando de 1,23 a 100%.

Dezenove leveduras apresentaram maior produtividade volumétrica (variando de 0,06 a 0,12 g L⁻¹ h⁻¹) e maior rendimento (variando de 0,14 a 0,57 g g⁻¹) na bioconversão com consumo de D-xilose entre 52 e 100%. São elas: 1.09, 1.16, 1.26, 1.33, 1.54, 1.55, 1.67, 1.68, 1.70, 1.71, 1.76, 1.81, 1.88, 1.90, 1.91, 1.99, 2.64, 2.80 e 3.47.

Devido a não padronização da concentração de células do inóculo inicial na primeira triagem, essas dezenove leveduras foram novamente testadas, com o inóculo inicial padronizado para uma densidade óptica entre 0,08 e 0,1. O resultado dessa segunda triagem é apresentado nos Quadros 1 e 2, com os parâmetros calculados após 24 e 48 h de cultivo. Pode-se observar uma

variação em relação à primeira triagem devido, provavelmente, à padronização do inóculo.

Quadro 1 - Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) para o cultivo em batelada de leveduras em meio mínimo mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C após 24 h

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q_P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
1.09	3,46	100	0,14	0,29	0,32
1.16	1,96	100	0,08	0,14	0,18
1.26	2,63	70	0,11	0,17	0,35
1.33	2,20	74	0,09	0,24	0,28
1.54	4,56	98	0,19	0,45	0,43
1.55	4,26	99	0,18	0,39	0,40
1.67	2,07	77	0,09	0,15	0,25
1.68	1,73	64	0,07	0,17	0,25
1.70	5,84	100	0,24	0,54	0,54
1.71	4,94	99	0,21	0,42	0,47
1.76	2,46	48	0,10	0,31	0,47
1.81	2,13	35	0,08	0,38	0,56
1.88	3,66	74	0,15	0,31	0,46
1.90	4,35	87	0,18	0,29	0,46
1.91	4,03	72	0,17	0,36	0,52
1.99	3,75	76	0,16	0,26	0,46
2.64	4,70	99	0,20	0,44	0,44
2.80	5,01	99	0,21	0,37	0,47
3.47	1,39	54	0,06	0,16	0,24

Nesta segunda triagem, destacaram-se as leveduras 1.54, 1.55, 1.70, 1.71, 2.64 e 2.80, que produziram, respectivamente, 4,60; 4,92; 6,23; 5,15; 4,58 e 5,30 g L⁻¹ de xilitol com consumo total de 10,73 g L⁻¹ de D-xilose, após 48 h de cultivo. A produtividade volumétrica variou de 0,10 a 0,13 g L⁻¹ h⁻¹, a produtividade específica de 0,17 a 0,26 mmol g⁻¹ h⁻¹ e o rendimento de 0,43 a 0,58 g g⁻¹.

Constatou-se que, para os isolados 1.26, 1.33, 1.67, 1.88, 1.90, 1.91, 1.99 e 2.64, houve uma diminuição na produção de xilitol após 48 h de cultivo, quando comparada à produção em 24 h. Esta redução provavelmente deve-se

ao consumo do xilitol utilizado para o crescimento microbiano, o que acarretou queda nos valores dos parâmetros calculados.

Quadro 2 - Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) para o cultivo em batelada de leveduras em meio mínimo mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C após 48 h

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q_P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
1.09	3,49	100	0,07	0,10	0,33
1.16	1,96	100	0,04	0,04	0,18
1.26	1,06	100	0,20	0,20	0,10
1.33	1,39	100	0,03	0,03	0,13
1.54	4,60	100	0,10	0,22	0,43
1.55	4,92	100	0,10	0,20	0,46
1.67	2,20	100	0,04	0,04	0,19
1.68	2,22	100	0,05	0,05	0,21
1.70	6,23	100	0,13	0,26	0,58
1.71	5,15	100	0,11	0,23	0,48
1.76	2,75	100	0,06	0,06	0,26
1.81	2,78	100	0,06	0,06	0,26
1.88	2,68	100	0,06	0,06	0,25
1.90	2,56	100	0,05	0,05	0,24
1.91	3,18	100	0,07	0,07	0,30
1.99	2,39	100	0,05	0,05	0,22
2.64	4,58	100	0,10	0,17	0,43
2.80	5,30	100	0,11	0,20	0,49
3.47	1,96	95	0,04	0,05	0,19

A levedura 1.70 apresentou maior produção de xilitol em 24 e 48 horas, alcançando valores de 6,23 g L⁻¹, com maior produtividade volumétrica (0,13 g L⁻¹ h⁻¹) e também maior produtividade específica (0,26 mmol g⁻¹ h⁻¹), assim como o melhor rendimento (0,58 g g⁻¹), destacando-se, na triagem realizada, como uma levedura promissora para a produção de xilitol a partir de D-xilose.

A triagem de leveduras de ambientes ricos em xilana é, teoricamente, mais promissora para obtenção de leveduras produtoras de xilitol. Sendo assim, foram testadas as leveduras epifíticas e, provavelmente, endofíticas, isoladas de frutos de café. Entretanto, a produção de xilitol foi baixa, variando entre 0,22 e

1,50 g L⁻¹ a partir de 10,70 g L⁻¹ de D-xilose com baixos valores para os parâmetros avaliados.

A alta produtividade e rendimento por leveduras isoladas do ambiente de laticínios pode ser questionável, já que este ambiente não é rico em D-xilose. Entretanto, a avaliação desta característica em isolados de laticínios é conveniente, quando considera-se que essas leveduras têm origens diversas, por se tratar de um ambiente aberto e que, no isolamento, foram utilizadas amostras como silagem, estrume e leite cru, levando à maior diversidade dos isolados. Além disso, várias espécies estudadas para a bioconversão de D-xilose a xilitol são encontradas em ambiente de laticínios.

A maioria dos estudos de bioconversão de D-xilose a xilitol utiliza leveduras. Poucos são os relatos de utilização de fungos filamentosos. Entretanto, eles possuem as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), responsáveis pelo metabolismo de D-xilose (CHIANG e KNIGHT, 1960; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

Neste estudo, foi realizada a triagem de onze fungos filamentosos, e o resultado do consumo de D-xilose e da produção de xilitol acompanhados por 96 h, são apresentados na Figura 1. Os fungos *P. roqueforti* CCT 0062 e *P. brevicompactum* CCT 4457, após 96 h de cultivo, foram os que menos consumiram D-xilose, enquanto os fungos *P. purpurogenum* CCT 2008, *P. chrysogenum* CCT 1273, *P. citrinum* CCT 3281, *P. janthinellum* CCT 3162, *P. expansum* VIC, *P. italicum* DMB1 e *P. griseoroseum* CCT 6421 consumiram a totalidade do açúcar presente no meio, merecendo destaque *P. griseoroseum* CCT 6421 e *P. janthinellum* CCT 3162, que consumiram mais da metade da D-xilose após 48 h de cultivo.

A produção de xilitol e a produtividade volumétrica variaram de 0,14 a 0,52 g L⁻¹ (a partir de 11,50 g L⁻¹ de D-xilose com consumo entre 15 e 79%) e de 0,002 a 0,006 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, conforme apresentado no Quadro 3. *P. crustosum* produziu a maior concentração de xilitol, após o consumo de 76% de D-xilose (0,52 g L⁻¹), com produtividade volumétrica de 0,005 g L⁻¹ h⁻¹ e pequeno rendimento de 0,06 g g⁻¹ (dado não apresentado), alcançando a maior massa celular (8,16 g L⁻¹). Uma possível explicação para a menor

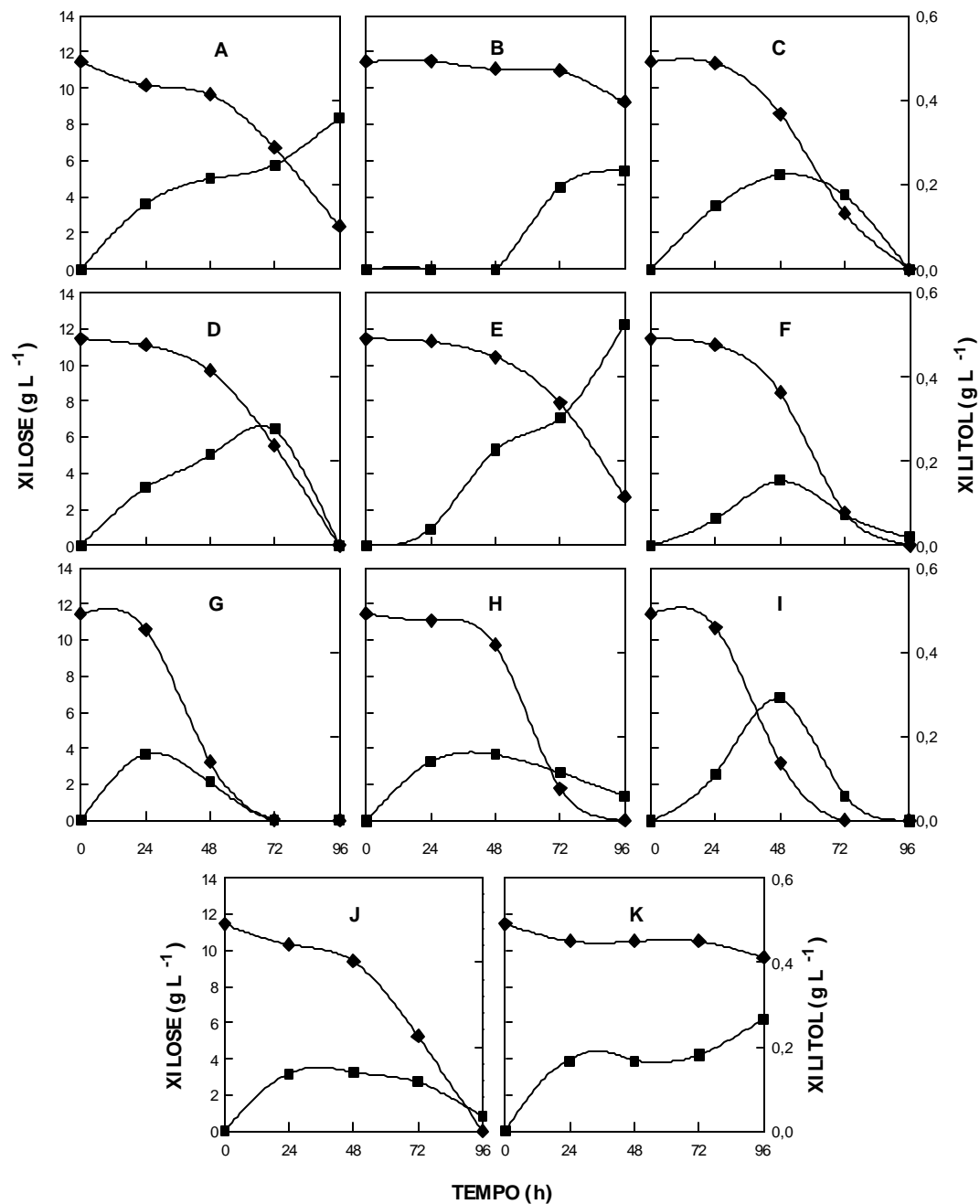


Figura 1 – Consumo de D-xilose (—○—) e concentração de xilitol (—□—) por *A. niger* (A), *P. brevicompactum* (B), *P. chrysogenum* (C), *P. citrinum* (D), *P. crustosum* (E), *P. expansum* (F), *P. griseoroseum* (G), *P. italicum* (H), *P. janthinellum* (I), *P. purpurogenum* (J) e *P. roqueforti* (K) cultivados em batelada por 96 horas em meio mínimo mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura, pH 6,0, a 100 rpm e 30°C.

Quadro 3 - Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_p) e massa celular (g L^{-1}) de fungos filamentosos de culturas em batelada, em meio mínimo mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C

Fungo Filamentoso	Xilitol (g L^{-1})	% Xilose consumida	Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Massa Celular (g L^{-1})*
<i>A. niger</i>	0,36	79	0,004	7,20
<i>P. brevicompactum</i>	0,23	20	0,002	0,74
<i>P. chrysogenum</i>	0,22	25	0,005	6,92
<i>P. citrinum</i>	0,27	52	0,004	5,19
<i>P. crustosum</i>	0,52	76	0,005	8,16
<i>P. expansum</i>	0,15	52	0,003	5,12
<i>P. griseoroseum</i>	0,16	7,5	0,006	4,38
<i>P. italicum</i>	0,16	15	0,003	5,42
<i>P. janthinellum</i>	0,29	72	0,006	7,15
<i>P. purpurogenum</i>	0,14	18	0,003	5,44
<i>P. roqueforti</i>	0,27	16	0,003	0,66

* Massa micelial no tempo de 96 h de cultivo.

produção de xilitol por fungos filamentosos é o metabolismo eminentemente aeróbio, que mesmo em condições de baixa oxigenação é mais eficiente. Além disso, a xilose é utilizada eficientemente como fonte de carbono, o que significa atividade considerável da xilitol desidrogenase devido à eficiente recuperação do NAD(P)^+ e, portanto, consumo do xilitol produzido.

O interesse na utilização de fungos filamentosos é devido à produção de outras enzimas, como o complexo enzimático xilanolítico, que possibilitaria a obtenção do substrato D-xilose, a partir de resíduos lignocelulósicos ricos em xilana, por hidrólise enzimática, com posterior produção de xilitol por ação do próprio fungo filamentoso. LATIF e RAJOKA (2001), utilizando enzimas microbianas produzidas por *Chaetomium thermophile*, observaram atividade xilanolítica significativa, que proporcionou aproximadamente 90% de conversão da xilana de 100 g L^{-1} de sabugo de milho tratado com hidróxido de sódio. No

entanto, a levedura *C. tropicalis*, foi utilizada para o processo de bioconversão de D-xilose a xilitol.

Considerando os resultados da triagem para leveduras e fungos filamentosos, foi selecionada a levedura 1.70, isolada do ambiente de laticínios, em coleta realizada na saída da empacotadeira, que apresentou rendimento de 0,58 g g⁻¹, produtividade volumétrica de 0,13 g L⁻¹ h⁻¹ e produtividade específica de 0,26 mmol g⁻¹ h⁻¹, produzindo 6,23 g L⁻¹ de xilitol a partir de 10,73 g L⁻¹ de D-xilose, após 48 h de cultivo.

Bons resultados foram obtidos em triagem realizada por IKEUCHI et al. (1999). *Candida* sp 559-9 destacou-se com produção de 204 ± 10 g L⁻¹ de xilitol a partir de 250 g L⁻¹ de xilose após 5 dias de incubação, com uma eficiência de conversão igual a 92,7% (considerando o valor teórico de produção de xilitol a partir de D-xilose, pelo balanço das equações do metabolismo, igual a 0,912).

Um rendimento de 0,62 g g⁻¹ na produção de xilitol foi registrado para *C. mogii* ATCC 18364 e, segundo SIRISANSANEEYAKUL et al. (1995), esta levedura foi considerada como boa produtora de xilitol.

Apesar de várias triagens já realizadas, não podemos comparar os resultados obtidos ao considerar que o meio e as condições do cultivo são diferentes para cada trabalho. Nesta primeira etapa do trabalho, o rendimento de xilitol obtido na triagem foi baixo para justificar a utilização da levedura 1.70 na produção de xilitol em larga escala. Entretanto, é possível melhorar este processo, definindo e otimizando as condições reguladoras da bioconversão.

4.2. Definição das Condições Reguladoras da Bioconversão de D-xilose a Xilitol

4.2.1. Concentração de D-xilose

Foram avaliadas as seguintes concentrações de D-xilose: 2,40; 5,00; 9,50; 23,00; 27,60; 51,35 e 98,40 g L⁻¹. Os resultados de consumo de D-xilose, da produção de xilitol e do crescimento microbiano são apresentados na Figura 2. Nas concentrações de 2,40 e 5,00 g L⁻¹, D-xilose foi consumida rapidamente, sendo esgotada após 20 h de crescimento. O tempo necessário

para o consumo de 9,50; 23,00; 27,60; 51,35 e 98,40 g L⁻¹ de D-xilose aumentou, visto que a concentração de D-xilose era maior, além da utilização da mesma concentração de células no inóculo inicial.

Tanto a produção de xilitol quanto o crescimento microbiano aumentaram com a maior concentração de D-xilose no meio de cultura. O crescimento máximo obtido em cada concentração de D-xilose foi 2,40; 2,93; 2,98; 4,00; 5,10; 5,70 e 9,00 g L⁻¹, respectivamente. Houve aumento da massa celular com o aumento da concentração de D-xilose. Após a depleção de D-xilose, o crescimento da levedura torna-se lento, com tendência à fase estacionária de crescimento, enquanto a concentração de xilitol no meio decai devido, provavelmente, ao consumo deste para produção de energia nas reações de manutenção. Resultado semelhante foi relatado por BARBOSA et al. (1988), que observaram consumo de xilitol por *C. guilliermondii*, após incubação prolongada.

O tempo necessário para o consumo total de D-xilose, utilizando 98,40 g L⁻¹ de D-xilose foi maior, ou seja, cerca de 120 h, quando comparado às demais concentrações (Figura 2). IKEUCHI et al. (1999) observaram que período maior foi requerido para a produção máxima de xilitol em 300 g L⁻¹ de D-xilose, devido à menor taxa de crescimento de *Candida* sp 559-9.

A produção de xilitol aumentou com o incremento de D-xilose de 2,40 a 98,40 g L⁻¹ (Quadro 4). A maior produção de xilitol (60,00 g L⁻¹) foi encontrada na concentração de 98,40 g L⁻¹. Geralmente o aumento na concentração de

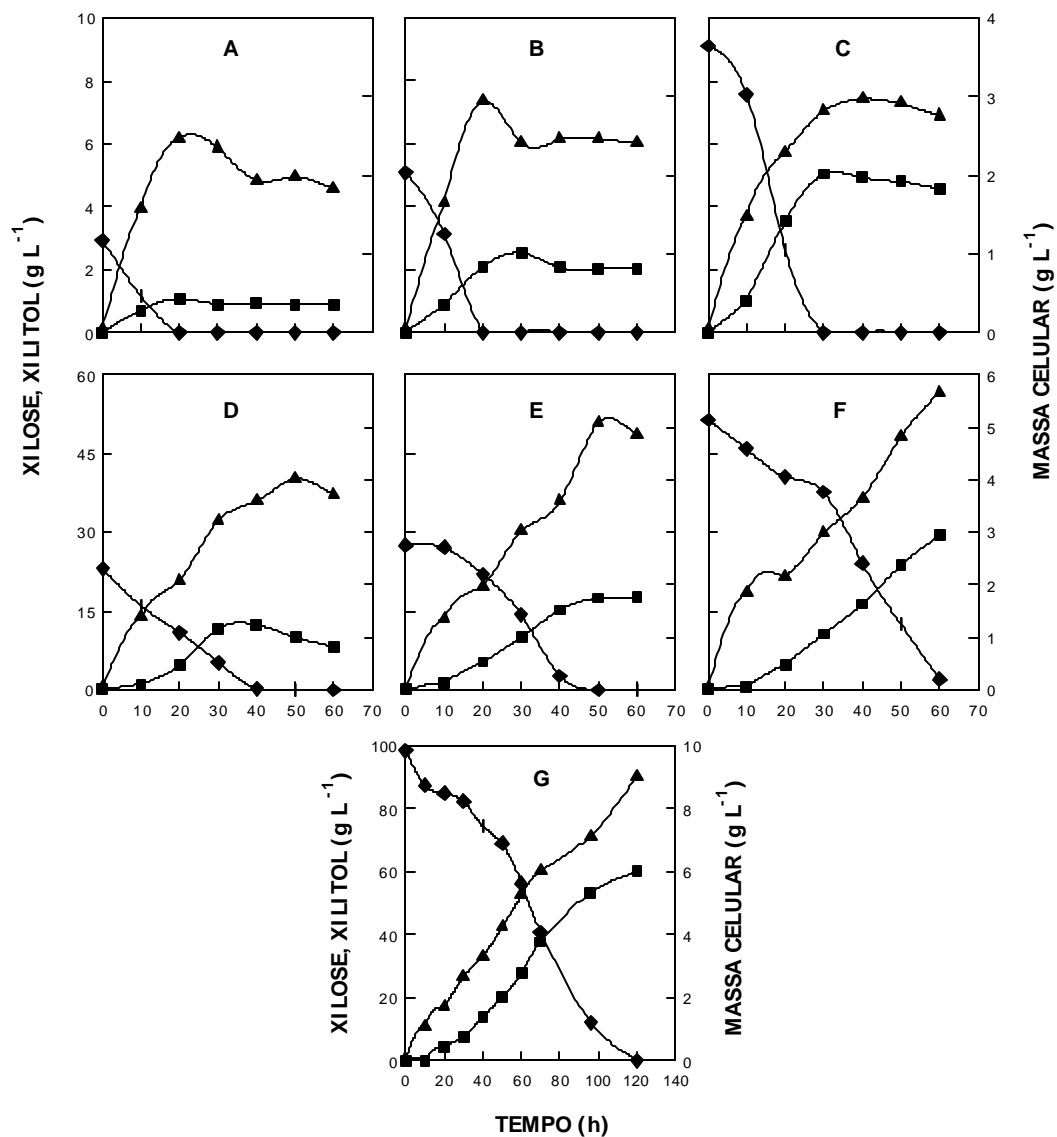


Figura 2 – Massa celular (—◻—), consumo de D-xilose (—◊—) e produção de xilitol (—▲—) para o cultivo da levedura 1.70 em batelada, em meio mínimo mineral acrescido de 0,5% de extrato de levedura, pH 6,0, a 100 rpm e 30°C, em diferentes concentrações de D-xilose: 2,40 g L⁻¹ (A), 5,00 g L⁻¹ (B), 9,50 g L⁻¹ (C), 23,00 g L⁻¹ (D), 27,60 g L⁻¹ (E), 51,35 g L⁻¹ (F) e 98,40 g L⁻¹ (G).

Quadro 4 – Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) para o cultivo em batelada da levedura 1.70 em meio mínimo mineral acrescido de concentrações crescentes de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C

Xilose (g L⁻¹)	Xilitol (g L⁻¹)	% Xilose consumida	Q_P (g L⁻¹ h⁻¹)	q_P (mmol g⁻¹ h⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g⁻¹)
2,40	1,07	100	0,05	0,14	0,36
5,00	2,54	100	0,08	0,30	0,50
9,50	5,04	100	0,17	0,40	0,53
23,00	10,04	99	0,30	0,50	0,54
27,60	17,50	100	0,33	0,40	0,61
51,35	32,70	96	0,49	0,49	0,64
98,40	60,00	100	0,50	0,36	0,60

açúcar conduz a aumento na produção de xilitol em batelada, caso o microrganismo seja capaz de tolerar altas concentrações de açúcar e alta pressão osmótica (OH et al. 1998).

A produtividade volumétrica (Q_P) variou entre 0,05 e 0,50 g L⁻¹ h⁻¹, a produtividade específica (q_P) de 0,14 a 0,50 mmol g⁻¹ h⁻¹ e o rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,36 a 0,64 g g⁻¹. A produtividade volumétrica e o rendimento aumentaram, acompanhando a concentração de D-xilose, atingindo valores máximos nas concentrações de 51,35 (0,49 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,64 g g⁻¹, respectivamente) e 98,40 g L⁻¹ (0,50 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,60 g g⁻¹, respectivamente). A maior produtividade específica (q_P) foi obtida nas concentrações de D-xilose de 23,00 g L⁻¹ (0,50 mmol g⁻¹ h⁻¹) e de 51,35 g L⁻¹ (0,49 mmol g⁻¹ h⁻¹). Para todas as concentrações utilizadas, a produção máxima de xilitol ocorreu quando o consumo de D-xilose foi quase total (96 a 100%).

A concentração ótima de D-xilose para produção de xilitol varia de levedura para levedura, mas há consenso de que acima de um valor ótimo, devido à alteração da pressão osmótica do meio, a fisiologia microbiana e a produção de xilitol são alteradas.

OH et al. (1998), detectaram que a produtividade específica, a produtividade volumétrica e o rendimento de xilitol de *C. parapsilosis* aumentaram até à concentração de 170 g L⁻¹, acima da qual a produção de xilitol decrescia. Foi observado, para *C. moggii* ATCC 18364, que maior concentração de D-xilose levou ao aumento nas taxas de consumo de xilose e de formação de xilitol, enquanto a taxa de crescimento específico permaneceu constante (SIRISANSANEEYAKUL et al., 1995). *C. tropicalis* KFCC-10960 não suportou concentrações de D-xilose acima de 150 g L⁻¹ devido à pressão osmótica, resultando em decréscimo na taxa de produção volumétrica de xilitol (OH e KIM, 1998).

Considerando que o xilitol desempenha a função de soluto compatível, contribuindo para a viabilidade da célula em resposta a um ambiente hostil (AGUIAR et al., 1999b), é necessário o estudo da bioconversão de D-xilose a xilitol utilizando altas concentrações de D-xilose, ou seja, em situação de estresse osmótico onde, provavelmente, a produção de xilitol seria maior.

Com base nos valores dos três parâmetros e nas concentrações de D-xilose utilizadas, destacou-se o cultivo na concentração de 51,35 g L⁻¹ ($Q_P=0,49$ g L⁻¹ h⁻¹, $q_P=0,49$ mmol g⁻¹ h⁻¹ e $Y_{P/S}=0,64$ g g⁻¹), sendo, a partir de então, essa concentração de D-xilose definida para avaliação dos demais parâmetros. A concentração de 98,4 g L⁻¹, apesar de produzir uma concentração de xilitol maior (60,0 g L⁻¹), não foi utilizada por apresentar um menor rendimento (0,60 g g⁻¹).

4.2.2. Concentração de Células do Inóculo Inicial

Foram avaliadas as seguintes concentrações de massa celular seca no inóculo inicial: 0,05; 0,22; 0,45; 1,00; 1,45; 2,20 e 6,50 g L⁻¹. O resultado do consumo de D-xilose, da produção de xilitol e do crescimento microbiano são apresentados na Figura 3. Constatou-se que quanto maior o inóculo utilizado, mais rápido foi o consumo de D-xilose. Para 0,05 g L⁻¹ de inóculo inicial, o consumo total de D-xilose ocorreu no tempo de 70 h, e para 6,5 g L⁻¹ no tempo de 50 h. A maior massa celular (12,79 g L⁻¹) foi obtida para o inóculo

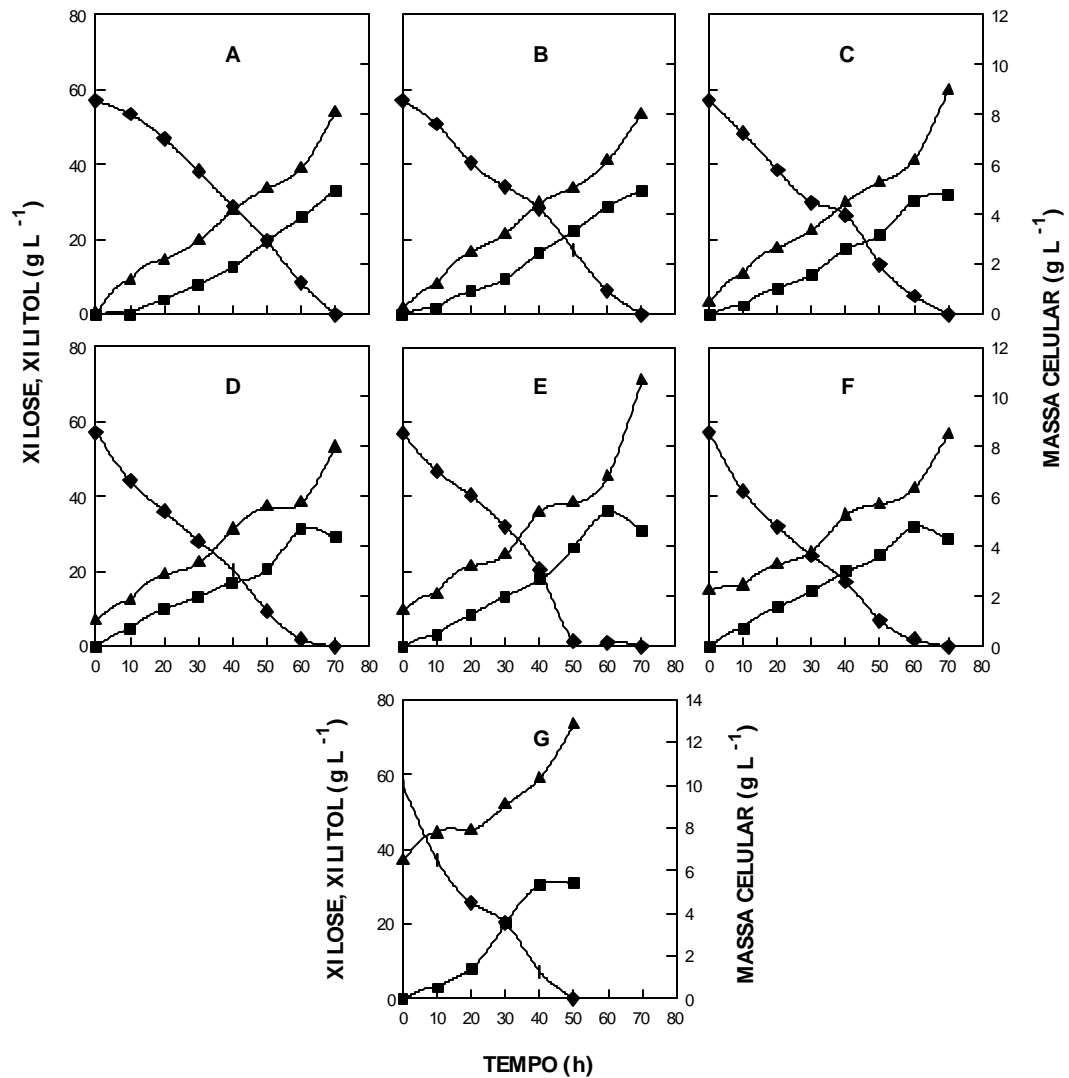


Figura 3 – Massa celular (—□—), consumo de D-xilose (—◇—) e produção de xilitol (—▽—) para o cultivo da levedura 1.70 em batelada, em meio mínimo mineral acrescido de 0,5% de extrato de levedura e 5% de D-xilose, pH 6,0, a 100 rpm e 30°C em diferentes concentrações de célula no inóculo inicial: 0,05 g L⁻¹ (A), 0,22 g L⁻¹ (B), 0,45 g L⁻¹ (C), 1,00 g L⁻¹ (D), 1,45 g L⁻¹ (E), 2,20 g L⁻¹ (F) e 6,50 g L⁻¹ (G).

Quadro 5 – Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_p), produtividade específica (q_p) e rendimento ($Y_{P/S}$) para o cultivo em batelada da levedura 1.70, em meio mínimo mineral acrescido de 5,0% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C em diferentes concentrações de célula no inóculo inicial

Inóculo (g L⁻¹)	Xilitol (g L⁻¹)	% Xilose consumida	Q_p (g L⁻¹ h⁻¹)	q_p (mmol g⁻¹ h⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g⁻¹)
0,05	33,12	100	0,47	0,39	0,58
0,22	33,10	100	0,47	0,39	0,58
0,45	32,05	100	0,46	0,38	0,57
1,00	31,17	97	0,52	0,60	0,56
1,45	36,20	100	0,60	0,58	0,65
2,20	31,96	97	0,53	0,55	0,57
6,50	30,70	100	0,61	0,32	0,54

inicial de 6,50 g L⁻¹. Para os demais inóculos, a massa celular variou de 7,0 a 11,0 g L⁻¹. A concentração máxima de xilitol foi obtida, quando o consumo de D-xilose foi total (100%), a não ser para o inóculo de 1,00 e 2,20 g L⁻¹ em que o consumo foi de 97%.

Resultados semelhantes foram apresentados por CAO et al. (1994), estudando *Candida* sp B-22. Esses autores mostraram que com alta concentração de células, no inóculo inicial, ocorreu completa conversão de D-xilose a xilitol após 100 h de incubação, e com baixa concentração celular o tempo de bioconversão aumentou, significativamente, o que resultou em diferença de 80% na produção de xilitol entre os inóculos de 3,8 e 26 mg mL⁻¹, após 100 h de cultivo.

Nos inóculos de 1,00; 1,45 e 2,20 g L⁻¹, pode-se observar, no tempo de 70 h, um aumento de massa celular seca quando a concentração de D-xilose é praticamente nula, comprovando o consumo de xilitol pela levedura 1.70, observado por uma queda na concentração de xilitol.

Neste estudo, a produtividade volumétrica (Q_p) variou de 0,46 a 0,61 g L⁻¹ h⁻¹, a produtividade específica (q_p) de 0,32 a 0,60 mmol g⁻¹ h⁻¹, e o

rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,54 a 0,65 g g⁻¹ (Quadro 5). A produção de xilitol foi maior no inóculo de 1,45 g L⁻¹ (36,20 g L⁻¹ a partir de 56,80 g L⁻¹ de D-xilose). O melhor rendimento ($Y_{P/S}=0,65$ g g⁻¹) também foi obtido com o inóculo de 1,45 g L⁻¹.

OH et al. (1998) observaram que a produtividade volumétrica foi maior com o aumento na concentração inicial de células de *C. parapsilosis*. A produtividade específica de xilitol, entretanto, foi quase constante em relação ao aumento da concentração celular.

Para *D. hansenii* NRRL Y-7426, a maior produtividade de xilitol (1,4 g L⁻¹ h⁻¹) foi obtida a partir da concentração celular inicial de 3 g L⁻¹, após 72 h de cultivo, quando 105,8 g L⁻¹ de xilitol foram produzidos (DOMINGUEZ et al., 1997). Concentrações celulares acima deste valor não levaram ao aumento na produção de xilitol.

Os maiores valores de produtividade volumétrica (Q_p) foram obtidos para os inóculos de 1,45 (0,60 g L⁻¹ h⁻¹) e 6,5 g L⁻¹ (0,61 g L⁻¹ h⁻¹). Para os inóculos iniciais de 1,00 (0,60 mmol g⁻¹ h⁻¹) e 1,45 g L⁻¹ (0,58 mmol g⁻¹ h⁻¹), foram obtidos os maiores valores de produtividade específica (q_p). Fica demonstrado que a condição que proporciona maior rendimento não é a mesma que proporciona maior produtividade específica. Portanto, considerando o conjunto dos três parâmetros avaliados, o inóculo de 1,45 g L⁻¹ ($Q_p=0,60$ g L⁻¹ h⁻¹; $q_p=0,58$ mmol g⁻¹ h⁻¹ e $Y_{P/S}=0,65$ g g⁻¹) foi definido como a melhor concentração de células para o inóculo inicial.

4.2.3. Nível de Aeração da Cultura

O efeito do nível de aeração sobre a produção de xilitol foi determinado pelo controle da agitação. A Figura 4 apresenta os dados de consumo de D-xilose, da produção de xilitol e do crescimento microbiano para cultivos da levedura 1.70, nas agitações de 100, 200 e 300 rpm. Nas duas maiores rotações (200 e 300 rpm), o consumo total de D-xilose ocorreu no tempo de 30 h, enquanto para 100 rpm este consumo ocorreu até o tempo de 70 h. A massa celular final obtida nos três níveis de aeração foi, aproximadamente, a

mesma ($9,55 \pm 0,45 \text{ g L}^{-1}$), mas em tempos diferentes, já que maior aeração contribui para a formação de biomassa.

O aumento do oxigênio favorece o aumento da biomassa, enquanto o rendimento de xilitol têm relação inversa. O excesso de oxigênio ativa o ciclo do ácido cítrico regenerando o NAD^+ , que funciona como cofator para a enzima xilitol desidrogenase que transforma xilitol em xilulose. Xilulose é, posteriormente, degradada por meio da via das pentoses e Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para piruvato, intermediário comum que entra no ciclo do ácido cítrico (TCA) (WINKELHAUSEN et al., 1996; LAPLACE et al., 1991).

De acordo com o Quadro 6, a maior produção de xilitol ($27,20 \text{ g L}^{-1}$ a partir de $46,70 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose), a maior produtividade volumétrica ($0,90 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e a maior produtividade específica ($0,74 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram obtidas à agitação de 200 rpm, que proporcionou a melhor aeração para produção de xilitol, apesar do menor rendimento ($0,57 \text{ g g}^{-1}$), quando comparado ao obtido com agitação de 100 rpm ($0,58 \text{ g g}^{-1}$).

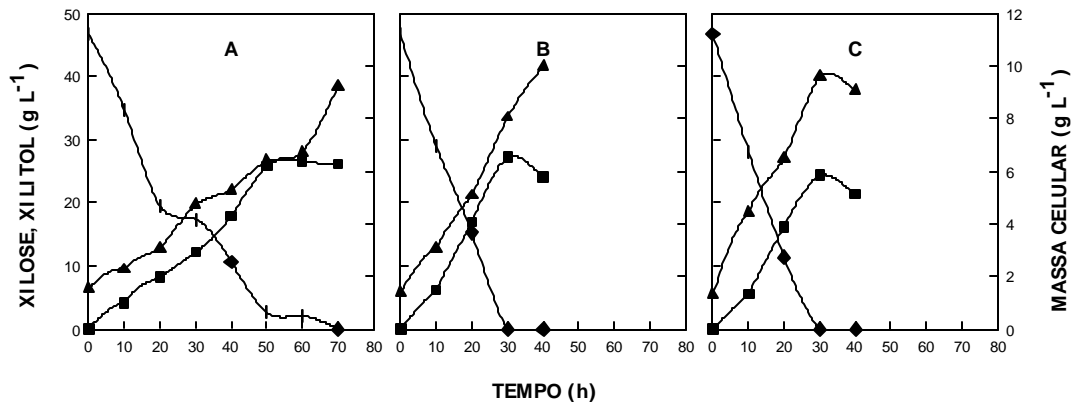


Figura 4 – Massa celular (\square), consumo de D-xilose (\circ) e produção de xilitol (\triangle) para o cultivo da levedura 1.70 em batelada, em meio mínimo mineral acrescido de 0,5% de extrato de levedura e 5% de D-xilose, pH 6,0, a 30°C e concentração celular de $1,45 \text{ g L}^{-1}$ no inóculo inicial e diferentes rotações: 100 (A), 200 (B) e 300 rpm (C).

Quadro 6 - Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) para o cultivo em batelada da levedura 1.70, em meio mínimo mineral acrescido de 5% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 30°C e diferentes rotações

rpm	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q_P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
100	26,60	96	0,46	0,45	0,58
200	27,20	100	0,90	0,74	0,57
300	25,55	100	0,80	0,56	0,53

Resultados semelhantes foram obtidos por DOMINGUEZ et al. (1997), que avaliaram a produção de xilitol por *D. hansenii*. A 300 rpm a xilose foi consumida rapidamente, resultando em 99,67 g L⁻¹ xilitol, enquanto a 200 rpm a xilose foi consumida lentamente, mas produziu 113,4 g L⁻¹ de xilitol.

BARBOSA et al. (1988), trabalhando com *C. guilliermondii*, também detectaram que, com decréscimo na aeração, ocorreu aumento no rendimento de xilitol, enquanto a concentração de etanol e D-xilose diminuíram. Em 1985, du PREEZ e PRIOR, interessados na produção de etanol por *Candida shehatae* CSIR-Y492, verificaram que o aumento na aeração minimizou a produção de xilitol.

O oxigênio parece regular a produção de xilitol por influenciar o potencial redox no interior da célula. Em condições de microaerobiose (200 rpm), há pouco oxigênio e excesso de NADH levando ao desequilíbrio na taxa NADH/NAD⁺, o que não ocorre com o aumento na taxa de aeração do meio de cultivo (300 rpm).

Entretanto, a presença do oxigênio é necessária para maior crescimento microbiano e para assimilação de D-xilose. O cultivo em anaerobiose não é condição ideal para produção de xilitol (FURLAN, et al., 1991; NOLLEAU et al., 1995).

Comparando-se a produtividade volumétrica, a produtividade específica e o rendimento, obtidos sob as mesmas condições em experimento anterior, $Q_P=0,60$ g L⁻¹ h⁻¹, $q_P=0,58$ mmol g⁻¹ h⁻¹ e $Y_{P/S}=0,65$ g g⁻¹ (Quadro 5), com os

obtidos na agitação de 100 rpm, $Q_P=0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P=0,45 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $Y_{P/S}=0,58 \text{ g g}^{-1}$, observa-se uma redução no valor dos parâmetros. Esta redução pode ser explicada pela troca da marca do extrato de levedura, já que era utilizado extrato de levedura DIFCO® e passou-se a utilizar extrato de levedura MERCK®. Considerando a importância do extrato de levedura na produção de xilitol, avaliou-se o efeito destas duas marcas na produção de xilitol pela levedura 1.70.

4.2.4. Concentração do Extrato de Levedura

A Figura 5 apresenta os resultados para o cultivo da levedura 1.70 na ausência de extrato de levedura, às concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0% de extrato de levedura MERCK®, comparados a extrato de levedura DIFCO® 0,5%. Em todos os casos o padrão dos gráficos é o mesmo. Observa-se um aumento na massa celular com a crescente concentração de extrato de levedura, já que, ele funciona como um fator de crescimento, suplementando o meio de cultivo com nutrientes como vitaminas e aminoácidos.

Para várias leveduras utilizadas no processo de bioconversão, há diferenças quanto à suplementação do meio de cultivo. Algumas leveduras não necessitam da presença de extrato de levedura, enquanto para outras ele se faz necessário em diferentes concentrações, específicas, para cada espécie (BARBOSA et al., 1988; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

KERN et al. (1997) observaram que, para *C. tenuis*, o aumento na concentração de extrato de levedura resultou em significativo aumento na biomassa e formação da enzima (aldose redutase). Já para *C. moggii* ATCC 18364, foi detectado que a adição de extrato de levedura e peptona não tem efeito sobre a produção de xilitol (SIRISANSANEYAKUL et al., 1995).

A maior produção de xilitol ($33,0 \text{ g L}^{-1}$ a partir de $50,0 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose) ocorreu quando se utilizou extrato de levedura MERCK® à concentração de 0,5%, obtendo-se produtividade volumétrica de $0,64 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, produtividade específica de $0,67 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e rendimento de $0,65 \text{ g g}^{-1}$ (Quadro 7). Para as

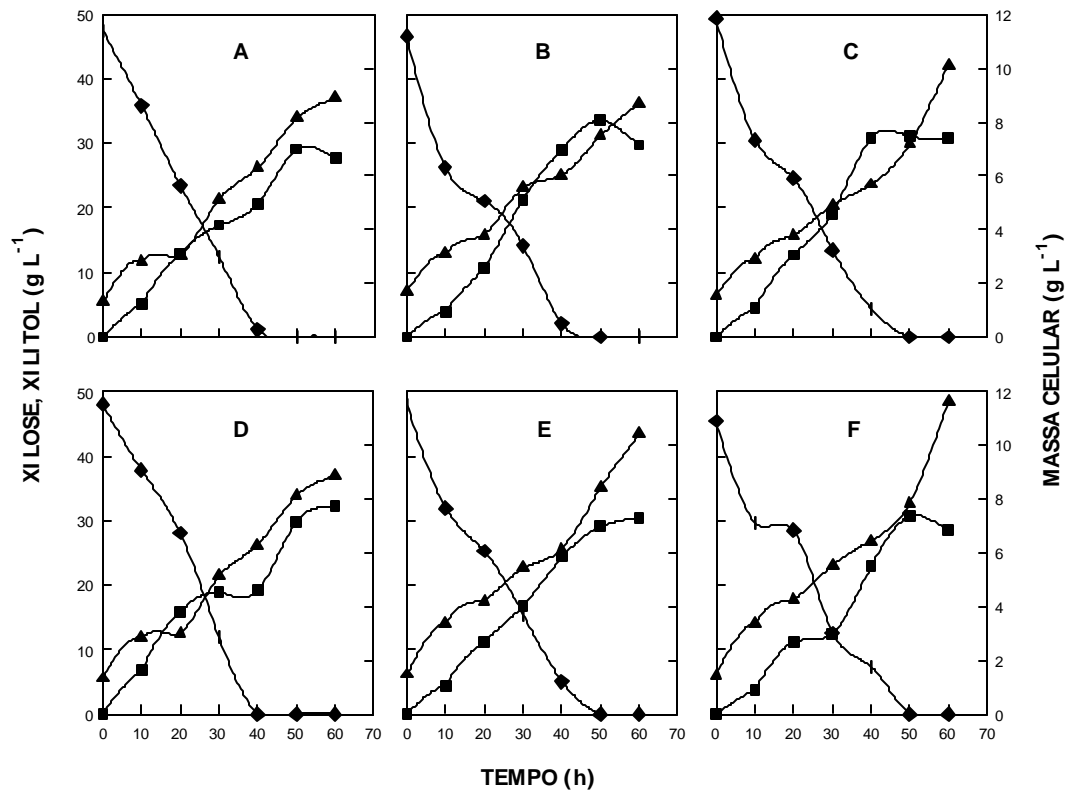


Figura 5 – Massa celular (—□—), consumo de D-xilose (—▽—) e produção de xilitol (—△—) para cultivo da levedura 1.70 em batelada, em meio mínimo mineral acrescido de 5% de D-xilose, pH 6,0, a 200 rpm e 30°C, sem acréscimo (A) e em diferentes concentrações de extrato de levedura MERCK®: 0,1 (B); 0,5 (C); 1,0 (E) e 2,0% (F) e 0,5%

de extrato de levedura DIFCO (D), utilizando inóculo inicial de 1,45 g L⁻¹.

Quadro 7 - Produção de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento (Y_{P/S}) para o cultivo em batelada da levedura 1.70, em meio mínimo mineral acrescido de 5% de D-xilose, diferentes concentrações de extrato de levedura MERCK® e 0,5% de extrato de levedura DIFCO® a 200 rpm e 30°C

Extrato de levedura (%)	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
0	29,15	100	0,58	0,47	0,61
0,1	32,27	100	0,60	0,48	0,62
0,5	33,00	100	0,64	0,67	0,65
0,5*	33,65	100	0,67	0,60	0,72
1,0	30,48	100	0,51	0,40	0,64
2,0	30,69	100	0,61	0,51	0,67

* Foi utilizado extrato de levedura DIFCO®.

concentrações maiores que 0,5%, a produtividade volumétrica e a produtividade específica foram menores com maior produção de massa celular, conforme apresentado na Figura 5, o que não beneficia a bioconversão de D-xilose a xilitol. Tais resultados foram semelhante àqueles apresentados por PREZIOSI-BELLOY et al. (2000). Segundo esses autores, o extrato de levedura estimulou a produção de xilitol e massa celular, quando *C. guilliermondii* foi cultivada em hidrolisado de madeira de álamo. Entretanto, concentrações maiores que 2 g L⁻¹ de extrato levedura não levaram à maior produção de xilitol, ocorrendo maior transporte de glicose e maior produção de etanol.

A presença de nutrientes orgânicos, como peptona e extrato de levedura, é essencial à produção de xilitol para *Candida* sp 559-9, conforme descrito por IKEUCHI et al. (1999). Entretanto, o excesso de extrato de levedura diminuiu a produção de xilitol.

A levedura 1.70 cultivada na presença de 0,5% do extrato de levedura DIFCO[®] apresentou produção de 33,65 g L⁻¹ de xilitol, a partir de 47,00 g L⁻¹ de D-xilose, produtividade volumétrica de 0,67 g L⁻¹ h⁻¹, produtividade específica de 0,60 mmol g⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 0,72 g g⁻¹, que podem justificar a não repetição dos parâmetros obtidos no experimento de padronização do inóculo. Entretanto, vale ressaltar que outros fatores como temperatura, pH do meio e idade do inóculo também podem influenciar os resultados.

Os parâmetros obtidos após a definição da melhor concentração de D-xilose e de células no inóculo inicial, da melhor condição de aeração e concentração de extrato de levedura MERCK[®] ($Q_P = 0,64 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P = 0,67 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $Y_{P/S} = 0,65 \text{ g g}^{-1}$) ainda não permitem a utilização dessa levedura para processo de bioconversão em escala industrial. Entretanto, há necessidade de determinar outras condições que influenciam a produção de xilitol, tais como o pH do meio de cultivo, a temperatura de incubação, a idade do inóculo e a composição do meio. De acordo com os resultados obtidos e considerando os outros estudos necessários à otimização do processo de bioconversão, a levedura 1.70 mostra-se promissora para produção de xilitol.

4.3. Caracterização fisiológica e bioquímica da levedura 1.70

O resultado da caracterização fisiológica e bioquímica da levedura 1.70 é apresentado no Quadro 8. Esta levedura foi capaz de fermentar glicose e galactose. Entretanto, a fermentação de galactose foi fraca, já que o gás ocupou menos de um terço do tubo de Duhram. Ela foi incapaz de fermentar lactose, D-xilose, maltose e sacarose, com produção de dióxido de carbono. Este experimento foi realizado em duplicata e acompanhado durante três semanas.

A levedura 1.70 foi capaz de assimilar as seguintes fontes de carbono: hexoses, D-glicose e D-galactose; dissacarídeos, celobiose, lactose, maltose, sacarose e melibiose; trissacarídeos, melizitose e rafinose; pentoses, D-xilose, D-arabinose; alcóois, glicerol, ribitol, D-manitol e D-glucitol; ácido orgânico, gliconato e glicosídeos, salicina e α -metil-D-glicosídeo. Ela não assimilou as

seguintes fontes: L-arabinose, D-ribose, L-raminose, trealose, inulina, amido solúvel, metanol, etanol, eritritol, inositol, isopropanol, etilacetato, acetona e citrato.

Quadro 8 – Caracterização fisiológica e bioquímica da levedura 1.70

FERMENTAÇÃO		ASSIMILAÇÃO	
	GLICOSE		
	GALACTOSE		
	D-XILOSE		
	SACAROSE		
	MALTOSE		
	LACTOSE		
	GLICOSE		
	GALACTOSE		
	D-XILOSE		
	L-ARABINOSE		
	D-ARABINOSE		
	D-RIBOSE		
	L-RAMINOSE		
	MALTOSE		
	SACAROSE		
	CELOBIOSE		
	TREALOSE		
	LACTOSE		
	MELIBIOSE		
	RAFINOSE		
	MELIZITOSE		
	INULINA		
	AMIDO SOLÚV.		
	METANOL		
	ETANOL		
	GLICEROL		
	ERITRITOL		
	RIBITOL		
	D-MANITOL		
	D-GLUCITOL		
	INOSITOL		
	ISOPROPANOL		

ASSIMILAÇÃO E OUTRAS CARACTERÍSTICAS	
F= fraco	ETILACETATO
	ACETONA
	CITRATO
	GLICONATO
	SALICINA
	α-METIL-D-GLICOSÍDEO
	GLICOSAMINA
	NITRATO
	NITRITO
	L-LISINA
	10% NaCl 5% GLICOSE
	UREASE
	PRODUÇÃO ACETATO
	RESISTÊNCIA ACETATO
	0,01% CICLOHEXIMIDA
	0,1% CICLOHEXIMIDA
	CRESCIMENTO 15°C
	CRESCIMENTO 25°C
	CRESCIMENTO 30°C
	CRESCIMENTO 37°C
	CRESCIMENTO 42°C
	PELÍCULA
	ANEL

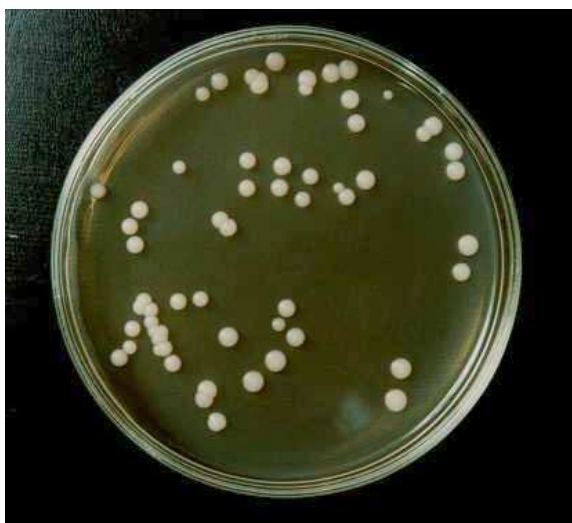


Figura 6 – Colônias da levedura 1.70 em 5% de extrato de malte – ágar após incubação a 30°C por 3 dias

Outras características foram avaliadas. A levedura 1.70 não foi capaz de assimilar nitrato e nitrito como fonte de nitrogênio, utilizando apenas L-lisina. Assimilou glicosamina e foi capaz de crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio, suportando alta pressão osmótica. Não apresentou resistência a acetato no meio contendo este ácido. Foi sensível às concentrações de cicloheximida utilizadas (0,1 e 0,01%), e não apresentou atividade de urease. Não cresceu a 42°C, mas foi capaz de crescer a 15, 25, 30 e 37°C, formando anel e não formando película. Foi observada a formação de sedimento de células, nos meios de crescimento.

A levedura não cresceu, quando cultivada em meio contendo xilana (SIGMA®) como única fonte de carbono, devido à ausência de produção de enzimas xilanolíticas. Foi observada atividade de β -galactosidase, demonstrada pela coloração azul das colônias em meio contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosídeo).

O experimento para assimilação, assim como para as outras características avaliadas, foi acompanhado durante três semanas de incubação à temperatura de 30 °C.

As características morfológicas da colônia e das células foram observadas. Em 5% de extrato de malte-ágar, após 2 dias de incubação a 25°C, as colônias são cremosas, opacas, de formato oval, côncavo e de tamanho médio pequeno (Figura 6), enquanto as células são cilíndricas e ovais com 4 – 6,7 µm, apresentando brotamento monopolar (Figura 7).



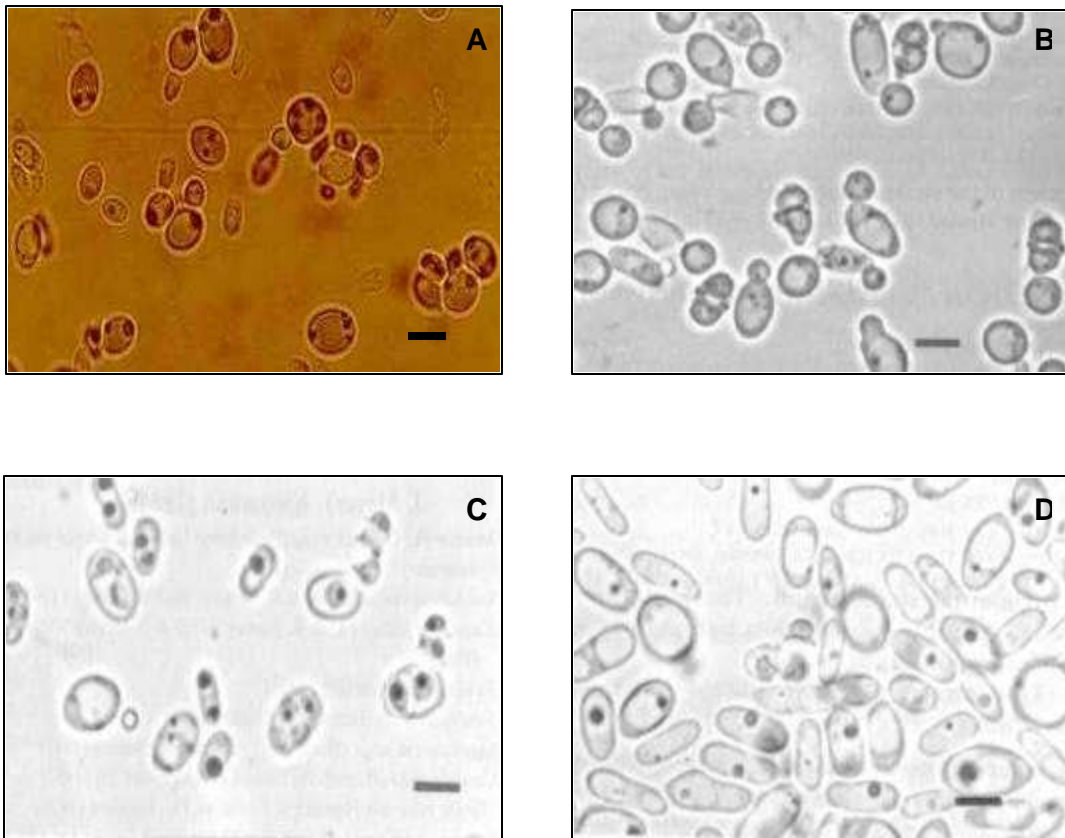
Figura 7 - Observação a fresco de células da levedura 1.70, microscopia óptica. Cultivo em 5% de extrato de malte-ágar por 3 dias a 30°C: presença de brotamento monopolar. Barra = 5 µm.

A formação de ascósporos foi observada por inoculação da levedura em 5% de extrato de malte-ágar, incubado por 10-30 dias a 30°C. Os ascósporos formados são semelhantes aos ascósporos apresentados pelo gênero *Pichia* (Figura 8).

Estudos semelhantes foram realizados por RHOM et al. (1992), que isolaram 1013 leveduras de produtos de laticínios, e baseados nas características fisiológicas e bioquímicas dos isolados fizeram a identificação das espécies. As leveduras foram distribuídas em 17 gêneros e 37 espécies. Destacaram-se os gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Yarrowia*.

GADAGA et al. (2000), isolaram e identificaram leveduras de leite fermentado do Zimbábue. A partir dos isolados de 30 amostras, foram identificadas 20 diferentes leveduras, com base na caracterização fisiológica e bioquímica. Dentre estas, *S. cerevisiae*, *Candida lusitanae*, *Candida colliculosa*,

Saccharomyces dairenenses, *Candida lipolitica*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*,
Zygosaccharomyces spp e *Rhodotorula rubra*.



fresco, microscopia óptica: A – Ascósporos formados após cultivo da levedura
1.70 em 5% de extrato de malte-ágar por 5 dias, 30°C;
B, C, D – Ascósporos formados por espécie do gênero
Pichia (KURTZMAN e FELL, 1997). Barra = 5 µm.

Com os resultados obtidos na caracterização fisiológica, bioquímica e morfológica da levedura 1.70, não foi possível a identificação. A taxonomia de leveduras é complexa e novos sistemas, incluindo técnicas moleculares, têm sido utilizados para compreensão da ecologia de vários ambientes. Técnicas como PCR (Polymerase Chain Reaction) e RAPD (Randomic Amplified Polimorfic DNA), suplementam os sistemas convencionais de identificação (DEÁK e BEUCHAT, 1987) e poderão, no futuro, auxiliar na identificação da levedura 1.70. KURTZMAN e FELL (1997) já descrevem a comparação da sequência do RNA/DNA ribossômico, para obtenção de relações filogenéticas entre leveduras.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Das duzentos e setenta leveduras testadas, sessenta e uma não produziram xilitol a partir de D-xilose, demonstrando que nem todas as leveduras são capazes de realizar esta bioconversão, ou que as condições de cultivo não foram favoráveis à produção de xilitol por essas espécies.

Da triagem realizada com leveduras isoladas do ambiente de laticínios e de frutos de café, selecionou-se a levedura 1.70 que produziu $6,23 \text{ g L}^{-1}$ de xilitol a partir de $10,73 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose, com produtividade volumétrica (Q_P) de $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, produtividade específica (q_P) de $0,26 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e rendimento ($Y_{P/S}$) de $0,58 \text{ g g}^{-1}$, mostrando-se promissora para uso na produção de xilitol.

A produção de xilitol por fungos filamentosos foi baixa. A produção máxima foi de $0,52 \text{ g L}^{-1}$, a partir de $11,50 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose, obtida por *P. crustosum*. Os fungos filamentosos consumiram D-xilose principalmente para o crescimento, e nas condições utilizadas não demonstraram ser bons produtores de xilitol.

A concentração inicial de D-xilose influenciou a produção de xilitol pela levedura 1.70. A melhor concentração de substrato foi $51,35 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose com produção de $32,70 \text{ g L}^{-1}$ de xilitol, produtividade volumétrica e específica de $0,49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e rendimento de $0,64 \text{ g g}^{-1}$.

A bioconversão de D-xilose a xilitol foi favorecida, utilizando-se como inóculo inicial uma massa celular de 1,45 g L⁻¹, o que gerou produtividade volumétrica de 0,60 g L⁻¹ h⁻¹, produtividade específica de 0,58 mmol g⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 0,65 g g⁻¹.

Sob influência da aeração, mediante controle da agitação, melhores resultados foram obtidos para 200 rpm, produzindo 27,20 g L⁻¹ de xilitol a partir de 46,70 g L⁻¹ de D-xilose, com produtividade volumétrica de 0,90 g L⁻¹ h⁻¹, produtividade específica de 0,74 mmol g⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 0,57 g g⁻¹.

A produção de xilitol foi 33,00 g L⁻¹ a partir de 50,0 g L⁻¹ de D-xilose, utilizando 0,5% de extrato de levedura MERCK[®], com produtividade volumétrica de 0,64 g L⁻¹ h⁻¹, produtividade específica de 0,67 mmol g⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 0,65 g g⁻¹. Utilizando extrato de levedura DIFCO[®], foi obtida produção de 33,65 g L⁻¹ de xilitol a partir de 47,00 g L⁻¹ de D-xilose, com produtividade volumétrica de 0,67 g L⁻¹ h⁻¹, produtividade específica de 0,60 mmol g⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 0,72 g g⁻¹, sendo a utilização desta marca melhor indicada para a produção de xilitol a partir de D-xilose, utilizando a levedura 1.70 e as condições de cultivo definidas neste trabalho.

Considerando os resultados apresentados e os demais estudos necessários para otimização do processo de bioconversão, a levedura 1.70 mostra-se promissora para produção de xilitol.

A caracterização fisiológica, bioquímica e morfológica da levedura 1.70 não permitiu a determinação da espécie, apesar da semelhança morfológica dos ascósporos da levedura 1.70 com os do gênero *Pichia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim da SBCTA**, v.33, n.2, 184-193, 1999a.
- AGUIAR, W. B.; ANDRADE, C. M. M. C.; ANTUNES, J. G.; ARAÚJO, Q. F.; BRITO, F. H. X.; DAMACO, M. C. T.; FARIA, L. F.; FONSECA, M. C. C.; GIMENES, M. A. P.; GUERRANTE, M. F.; LEAL, M. L. M.; LEMOS, R. P. A.; MOTTA, R. P. A.; NÓBREGA, R.; SÁ, M. C. A.; SILVA, M. L. A.; PEREIRA, N. J. Biotecnologia de hemicelulose. **ENZITEC**, VII1- VII5, 1999b.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. E.; PRATA, A. M. R. Pretratament of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.89-97, 1998.
- AZUMA, M.; IKEUCHI, T.; KIRITANI, R.; KATO, J.; OOSHIMA, H. Increase in xylitol production by *Candida tropicalis* upon addition of salt. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p.129-135, 2000.
- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANGILHA, I. M.; SCNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factores which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.11, p.286-289, 1985.

- CALMAN, C. T. The evaluation of micelial growth. In: MOURANCHE, A. e COSTERS, C. (Ed.). **Methods in Microbiology**. London: **Academic Press**, v.1, p. 567-591, 1969.
- CAO, N. J.; TANG, R.; GONG, C. S.; CHEN, L. F. The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.45-46, p.515-519, 1994.
- CHEN, L.; GONG, C. Fermentation of bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. **Journal of Food Science**, v.50, p.226-228, 1985.
- CHIANG, C.; KNIGHT, S. G. Metabolism of Dxylose by moulds. **Nature**, v.188, n.4744, p.79-81, 1960.
- CHOI, J.; MOON, K.; RYU, Y.; SEO, J. Production of xylitol in cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, n.22, p.1625-1628, 2000.
- CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*. **Biotechnology Letters**, n.22, p.1895-1898, 2000.
- CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUEZ, J. M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 82, p.141-151, 1999.
- DAHIYA, J. S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. **Canadian Journal Microbiology**, v.37, p.1418, 1991.
- DEÁK, T.; BEUCHAT, L. R. Identification of foodborne yeasts. **Journal of Food Protection**, v.50, n.3, p.243-264, 1987.
- DOMINGUEZ, J. M.; GONG, G. S.; TSAO, G. T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57-58, p.49-56, 1996.
- DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C. S.; TSAO, G. Production of xylitol from D-xylose by *Debaromyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63-65, p.117-127, 1997.
- DOMINGUEZ, J. M.; CRUZ, J. M.; ROCA, E.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from wood hydrolysates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.81, p.119-130, 1999.

- du PREEZ, J. C.; PRIOR, B. A. A quantitative screening of some xylose-fermenting yeasts isolates. **Biotechnology Letters**, v.7, n.4, p.241-246, 1985.
- du TOIT, P. J.; OLIVIER, S. P.; BILJON, P. L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrate. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicelulose, and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.1071-1078, 1984.
- DUARTE, M. C. T.; PELLEGRINO, A. C. A.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; FRANCO, T. T. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, Abr./Jun., 2000.
- EMODI, A. Its properties and food applications. **Food Technology**, p.28-32, 1978.
- FELIPE, M. G. A. **Obtenção de xilitol por fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Viçosa, M.G.: UFV, 1994. 141p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia das Fermentações) - Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, M. H. **Atividade xilanolítica de *Penicillium griseoroseum* cultivado em resíduo lignocelulósico**. Viçosa, M.G.: UFV, 1999. 65p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa.
- FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1093-1109, 1994.
- FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, n.50, p.101-117, 1999.
- FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Glucoses isomerases. In: **Microbial Enzymes and Biotechnology**, ed.2, p.199-220, 1990.
- FRAZER, F. R.; MCCASKEY, T. A. Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. **Biomass**, p.31-42, 1989.
- FURLAN, S. A.; BOUILLAUD, P.; STREHAIANO, P.; RIBA, J. P. Study of formation from xylose under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**, v.13, n.3, p.203-206, 1991.
- FURLAN, S. A.; DUPUY, M. L. D.; STREHAIANO, P. Xylitol production in repeated fed batch cultivation. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.13, p.591-592, 1997.

- GADAGA, T. H.; MUTUKUMIRA, A. N.; NARVHUS, J. A. Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. **International Dairy Journal**, n.10, p.459-466, 2000.
- GÍRIO, F. M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; AMARAL-CALLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v.71, p.245-251, 2000.
- GUIMARÃES, F. A.; SILVEIRA, W. B.; SAMPAIO, F. C.; DAMACENO, L. M.; PASSOS, F. M. L. Isolation and characterization of yeasts from dairy environments. In: **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, Caxambú, 2001. Livro de resumo. p.91.
- GURGEL, P. V. **Avaliação de método de recuperação de xilitol obtido por via fermentativa**. Viçosa, M.G.: UFV, 1993. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de viçosa.
- GURGEL, P. V.; FURLAN, S. A.; MARTINEZ, S. E. R.; MANCILHA, I. M. Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.15, n.3, 1998.
- HALTRICH, D.; PREISS, M.; STEINER, W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.15, p.854-860,1993.
- HYVÖNEM, L.; KOIVISTONEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances In Food Research**, v.28, p.373-403, 1982.
- IKEUCHI, T.; AZUMA, M.; KATO, J.; OOSHIMA, H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentration of xylose. **Biomass and Bioenergy**, v.16, p.333-339, 1999.
- JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy journal**, n.6, p.755-768, 1996.
- JEFFRIES, T. W.; KURTZMAN, C. P. Strain selection, taxononomy and genetics of xylose-fermenting yeasts. **Enzyme Microbial Technology**, v.16, p.922-932, 1994.
- KERN, M.; HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. **FEMS Microbiology Letters**, v.149, p.31-37, 1997.

- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: A taxonomic study**. 1997, 1055p.
- LAPLACE, J. M.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Fichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.36, p.158-162, 1991.
- LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, n.77, p.57-63, 2001.
- LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.50, p.309-313, 1998.
- LEMBO, T.; GOMES, E.; ALVES, H. F.; SILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de xilose redutase. **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Rio de Janeiro – RJ, 1997. Livro de resumos. p.169,.
- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. Relation between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.89-94, 2000.
- MÄKINEN, K. K. Xylitol and oral health. **Advances in Food Research**, v.25, p.137-158, 1979.
- MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts. **Canadian Journal Microbiology**, v.28, p.360-363, 1981.
- MARCHAL, R.; ROPARS, M.; VANDECASTELLE, J. P. Conversion in acetone and butanol of lignocellulosic substrates pretreated by steam explosion. **Biotechnology Letters**, v.8, n.5, p.365-370, 1986.
- MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*. Fermentation Behaviour. **Biotechnology Letters**, v.13, n.4, p.281-286, 1991.
- NITISINPRASERT, S.; TEMMES, A. The characteristics of a new non-spore-forming cellulolytic mesophilic anaerobic strain C126 isolated from municipal sewage sludge. **Journal of Applied Bacteriology**, v.71, p.154-161, 1991.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. **Biotechnology letters**, v.17, n.4, p.417-422, 1995.

- OH, D. K.; KIM, S.Y. Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.50, p.419-425, 1998.
- OH, D. K.; KIM, S. Y.; KIM, J. H. Increase of xylitol production rate by controlling redox potencial in *Candida parapsilosis*. **Biotechnology and Bioengineering** v.58, n.4, p.440-444, 1998.
- OLINGER, P. M. Confeitos: adoçantes fazem a diferença. **Food Ingredients Pesquisa e desenvolvimento na Indústria de alimentos e bebidas**, n.5, p.44-46, 2000.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.1, p.34-50, 2000.
- PINHEIRO, V. D. Produção de enzimas xilanolíticas por *Penicillium expansum*. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola**, Universidade Federal de Viçosa, M.G., 60 p., 1999.
- PFEIFFER, M. J.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.423-430, 1996.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, n.21, p. 124-129, 1997.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Xilitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, n.22, p. 239-243, 2000.
- RAMOS, R. M. **Tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com sais de alumínio para obtenção de xilitol por via fermentativa**. Viçosa, M.G.: UFV, 1999. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.
- ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; FELIPE, M. G. A.; SOUZA, C. A.; SATO, S.; CASTRO, H. F. Evaluation of rice straw hemicelulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v.16, n.11, p.1211-1216, 1994.
- ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicelulose hydrolysate for the production of xylitol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57-58, p.339-347, 1996.

- RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from agroindustrial residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.869-875, 1998a.
- RODRIGUES, D. C. G. ; SILVA, S. S., FELIPE, M. G. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate. **Journal of Biotechnology**, v.62, p.73-77, 1998b.
- ROHM, H. R.; LECHNER, F. I.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.370-376, 1992.
- RUSSO, J. R. Xylitol: anti-carie sweetener? **Food Engineering**, v.79, p.37-40, 1977.
- SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, J. A.; CAMACHO, F. The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.21, p.355-360, 1997.
- SENE, L. **Adaptação e reciclagem da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de xilitol**. Lorena, S.P.: FAENQUIL, 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
- SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: Um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.5, p.109-117, 1993/94.
- SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63-65, p.557-564, 1997.
- SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factores that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts - a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.7072, p.331-339, 1998.
- SILVA, C. J.; ROBERTO, I. C. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.743-747, 1999.
- SILVEIRA, F. Q. P.; XIMENES, F. A.; CACAIS, A. O. G.; MILAGRES, A. M. F.; MEDEIROS, C. I.; PULS, J.; FILHO, E. X. F.: Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.947-952, 1999.

- SIRISANSANEEYAKUL, S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n.6, p.565-570, 1995.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.17, n.1, p.39-67, 1997.
- TAVARES, J. M.; DUARTE, L. C.; AMARAL-CALAÇO, M. T.; GÍRIO, F. M. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.743-747, 2000.
- UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; KOSKELA, M.; NIEMELA, M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: Double blind randomised trial. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.40, p.217, 1996.
- UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v.19, p.144-147, 2001.
- VERDUYN, C.; VAN KLEEF, R.; FRANK, J.; SCHREUDER, H.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemistry Journal**, n.226, p.669-677, 1985.
- WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v.76, p.213-220, 2001.
- WHITE, D.; HEGEMAN, G. D. **Microbial physiology and biochemistry laboratory a quantitative approach**, p.6-7, 1998
- WINKELHAUSEN, E.; PITTMAN, P.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T. W. Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. **Biotechnology Letters**, v.18, n.7, p.753-758, 1996.
- WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1-14, 1998.
- YILIKARI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v.25, p.159-177, 1979.
- ZABNER, J.; SELLER, M. P.; LAUNSPACH, J. L.; KARP, P. H.; KEARNEY, W. R.; LOOK, D. C.; SMITH, J. J.; WELSH, M. J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **PNAS**, v.97, n.21, p.11614-11619, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A

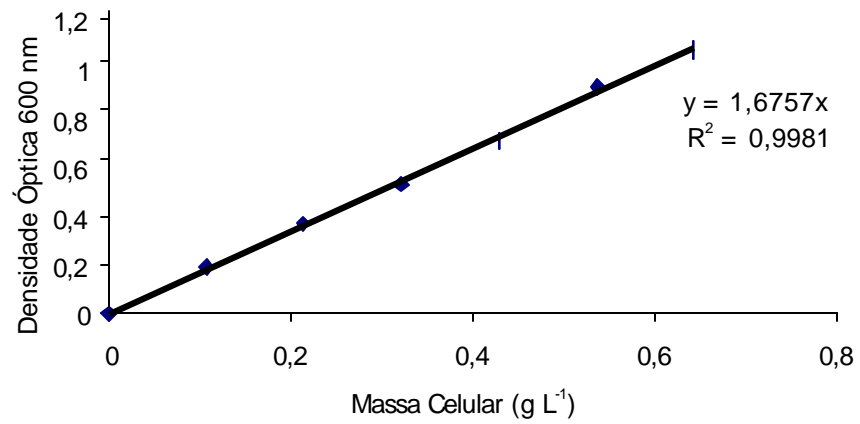


FIGURA 1 A – Curva de calibração utilizada na definição da massa celular correspondente a uma unidade de densidade óptica (DO).

APÊNDICE B

Quadro 1 A – Concentração de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) para o cultivo em batelada de leveduras isoladas do ambiente de laticínios, em meio mínimo mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C, após 48 h

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q_P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
1.01	1,49	100	0,03	0,2	0,13
1.02	2,62	100	0,05	0,04	0,23
1.03	0	100	0	0	0
1.04	1,75	50	0,04	0,04	0,32
1.05	0	91	0	0	0
1.06	0	100	0	0	0
1.07	1,00	100	0,20	0,20	0,09
1.08	1,40	94	0,03	0,014	0,13
1.09	3,53	100	0,07	0,15	0,32
1.10	1,08	100	0,20	0,20	0,10
1.11	0	44	0	0	0
1.12	0,41	89	0,008	0,01	0,04
1.13	1,86	100	0,04	0,03	0,17
1.14	0,45	100	0,09	0,01	0,04
1.15	1,36	81	0,03	0,04	0,15
1.16	3,58	100	0,07	0,08	0,32
1.17	0,39	100	0,20	0,20	0,08
1.18	0	100	0	0	0
1.19	1,34	100	0,03	0,03	0,12
1.20	1,60	100	0,03	0,03	0,14
1.21	0	91	0	0	0
1.22	0,57	100	0,01	0,01	0,06
1.23	0	100	0	0	0
1.24	2,34	100	0,05	0,06	0,21
1.25	0,31	100	0,006	0,006	0,03
1.26	2,73	100	0,06	0,05	0,24
1.27	2,16	100	0,04	0,03	0,19
1.28	1,13	100	0,20	0,20	0,10
1.29	0,72	52	0,20	0,20	0,12
1.30	1,36	100	0,04	0,04	0,17
1.31	0	18	0	0	0
1.32	0	19	0	0	0
1.33	2,72	100	0,06	0,05	0,24

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
1.34	0	33	0	0	0
1.35	0	100	0	0	0
1.36	0	21	0	0	0
1.37	0	100	0	0	0
1.38	1,54	87	0,03	0,10	0,016
1.39	0	6	0	0	0
1.40	1,71	100	0,04	0,04	0,15
1.41	1,37	100	0,04	0,02	0,17
1.42	0,57	100	0,01	0,05	0,01
1.43	0	88	0	0	0
1.44	0	100	0	0	0
1.45	1,44	100	0,03	0,20	0,12
1.46	1,53	100	0,03	0,20	0,14
1.47	0	100	0	0	0
1.48	0	100	0	0	0
1.49	0,17	51	0,003	0,004	0,03
1.50	0	100	0	0	0
1.51	0,14	100	0,003	0,004	0,01
1.52	0	100	0	0	0
1.53	1,21	100	0,03	0,20	0,11
1.54	3,42	100	0,07	0,13	0,30
1.55	3,87	100	0,08	0,31	0,35
1.56	0	21	0	0	0
1.57	0,59	92	0,01	0,01	0,06
1.58	0,37	56	0,007	0,004	0,06
1.59	0,98	100	0,20	0,01	0,09
1.60	0	100	0	0	0
1.61	2,95	100	0,06	0,03	0,26
1.62	1,95	100	0,04	0,04	0,17
1.63	0,23	6,4	0,04	0,009	0,32
1.64	2,14	100	0,04	0,04	0,19
1.65	0,30	81	0,01	0,20	0,09
1.66	0,49	55	0,01	0,008	0,08
1.67	5,25	100	0,11	0,004	0,47
1.68	2,84	100	0,06	0,06	0,25
1.69	0	14	0	0	0
1.70	5,30	100	0,12	0,12	0,52
1.71	4,91	100	0,10	0,06	0,44
1.72	2,23	100	0,05	0,03	0,20
1.73	0,99	100	0,20	0,20	0,09
1.74	1,48	100	0,03	0,20	0,13
1.75	0,04	100	0,0008	0,0005	0,003

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
1.76	2,81	61	0,06	0,07	0,41
1.77	0	100	0	0	0
1.78	2,22	62	0,05	0,15	0,32
1.79	1,76	100	0,04	0,04	0,16
1.80	2,32	100	0,05	0,06	0,21
1.81	2,92	52	0,06	0,14	0,50
1.82	0,02	96	0,0004	0,0004	0,02
1.83	2,83	100	0,06	0,07	0,25
1.84	2,64	100	0,05	0,05	0,24
1.85	1,56	100	0,03	0,14	0,03
1.86	2,99	100	0,06	0,03	0,27
1.87	0	100	0	0	0
1.88	2,97	100	0,06	0,06	0,26
1.89	1,35	100	0,20	0,03	0,12
1.90	2,80	100	0,06	0,05	0,25
1.91	3,95	93	0,08	0,08	0,38
1.92	0,20	100	0,0005	0,0004	0,02
1.93	0,20	100	0,0004	0,0004	0,02
1.94	0,19	100	0,004	0,04	0,20
1.95	3,15	100	0,06	0,0004	0,28
1.96	0,20	99	0,0005	0,0004	0,003
1.97	2,03	98	0,0042	0,04	0,18
1.98	0	100	0	0	0
1.99	3,17	100	0,07	0,20	0,28
1.100	1,97	100	0,041	0,05	0,17
2.01	0,21	100	0,004	0,03	0,20
2.02	1,58	25	0,03	0,04	0,16
2.03	0,35	20	0,007	0,20	0,14
2.04	0,30	84	0,006	0,01	0,15
2.05	0,80	4	0,20	0,01	0,10
2.06	0	100	0	0	0
2.07	0,89	34	0,20	0,20	0,09
2.08	0,32	100	0,007	0,20	0,10
2.09	1,00	14	0,20	0,03	0,10
2.10	0,57	100	0,01	0,03	0,42
2.11	0,43	100	0,009	0,005	0,04
2.12	1,89	100	0,04	0,07	0,20
2.13	0	100	0	0	0
2.14	2,10	100	0,04	0,12	0,22
2.15	0	100	0	0	0
2.16	0,09	100	0,02	0,02	0,01
2.17	1,22	99	0,03	0,20	0,12

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
2.18	0,49	15	0,01	0,20	0,33
2.19	0	100	0	0	0
2.20	0,24	100	0,005	0,003	0,20
2.21	0,03	100	0,0007	0,02	0,003
2.22	0	100	0	0	0
2.23	0	100	0	0	0
2.24	0	100	0	0	0
2.25	0,86	5	0,20	0,03	0,16
2.26	0,21	96	0,004	0,005	0,20
2.27	1,32	97	0,03	0,20	0,14
2.28	1,20	96	0,20	0,05	0,12
2.29	2,76	100	0,06	0,29	0,09
2.30	0,54	100	0,01	0,009	0,05
2.31	0,20	20	0,004	0,01	0,10
2.32	1,04	100	0,20	0,01	0,10
2.33	0,40	13	0,008	0,04	0,32
2.34	0	5	0	0	0
2.35	0	100	0	0	0
2.36	0,60	100	0,01	0,20	0,06
2.37	0	100	0	0	0
2.38	0	0,6	0	0	0
2.39	2,36	100	0,05	0,46	0,24
2.40	0	100	0	0	0
2.41	0	100	0	0	0
2.42	0	4	0	0	0
2.43	0	100	0	0	0
2.44	0,80	100	0,20	0,009	0,08
2.45	0,75	100	0,20	0,20	0,08
2.46	0	100	0	0	0
2.47	0,45	9	0,01	0,03	0,52
2.48	1,63	100	0,03	0,03	0,17
2.49	1,22	100	0,20	0,20	0,12
2.50	0	100	0	0	0
2.51	0,09	100	0,02	0,02	0,009
2.52	0,96	100	0,20	0,20	0,09
2.53	2,55	100	0,05	0,04	0,26
2.54	0,46	100	0,01	0,01	0,04
2.55	0,59	100	0,01	0,08	0,06
2.56	0,77	100	0,20	0,20	0,07
2.57	2,33	100	0,05	0,06	0,24
2.58	1,00	100	0,20	0,01	0,10
2.59	1,49	100	0,03	0,03	0,15

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
2.60	2,59	100	0,05	0,03	0,26
2.61	0,81	100	0,20	0,01	0,08
2.62	0,08	100	0,20	0,20	0,08
2.63	0,51	100	0,01	0,006	0,05
2.64	3,13	95	0,06	0,04	0,34
2.65	1,26	100	0,03	0,20	0,13
2.66	0,33	100	0,007	0,01	0,03
2.67	0,42	97	0,009	0,06	0,05
2.68	0,81	100	0,20	0,20	0,08
2.69	1,85	100	0,04	0,05	0,19
2.70	1,55	100	0,03	0,03	0,16
2.71	1,60	97	0,03	0,07	0,17
2.72	0	100	0	0	0
2.73	0,12	100	0,002	0,01	0,003
2.74	0,06	100	0,001	0,003	0,006
2.75	0	100	0	0	0
2.76	0	4,5	0	0	0
2.77	0,44	15	0,01	0,01	0,30
2.78	1,35	100	0,03	0,01	0,13
2.79	0	100	0	0	0
2.80	3,07	95	0,06	0,08	0,33
2.81	0,35	20	0,007	0,01	0,18
2.82	2,88	100	0,06	0,03	0,30
2.83	1,73	100	0,04	0,03	0,18
2.84	1,11	100	0,20	0,20	0,11
2.85	0,71	13	0,01	0,12	0,57
2.86	0,57	12	0,01	0,07	0,49
2.87	0,38	1,3	0,007	0,03	0,032
2.88	0	7,5	0	0	0
2.89	1,88	94	0,04	0,04	0,20
2.90	2,18	93	0,04	0,20	0,24
2.91	0,95	100	0,20	0,04	0,10
2.92	0	100	0	0	0
2.93	0	100	0	0	0
2.94	0,37	4,6	0,008	0,10	0,83
2.95	0,88	100	0,20	0,20	0,09
2.96	0,60	10	0,01	0,05	0,61
2.97	0	0	0	0	0
2.98	0	0	0	0	0
3.01	0,48	4	0,01	0,03	0,12
3.02	0	4	0	0	0
3.03	1,28	100	0,03	0,03	0,12

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
3.04	0,21	100	0,004	0,007	0,20
3.05	0,20	100	0,0005	0,0006	0,02
3.06	0,03	100	0,0007	0,001	0,003
3.07	0,78	100	0,20	0,20	0,08
3.08	0,97	100	0,20	0,03	0,09
3.09	0,94	100	0,20	0,03	0,09
3.10	1,39	100	0,20	0,04	0,13
3.11	0,99	100	0,20	0,03	0,09
3.12	0,72	100	0,01	0,20	0,07
3.13	1,03	100	0,20	0,03	0,10
3.14	1,65	100	0,03	0,05	0,16
3.15	0,94	100	0,20	0,03	0,09
3.16	0,92	6	0,20	0,009	1,62
3.17	1,24	100	0,20	0,04	0,12
3.18	1,00	100	0,20	0,03	0,09
3.19	0	100	0	0	0
3.20	0,97	100	0,20	0,10	0,03
3.21	0,01	100	0,0004	0,02	0,0006
3.22	1,09	100	0,20	0,11	0,03
3.23	2,20	100	0,04	0,22	0,07
3.24	2,07	100	0,04	0,20	0,07
3.25	0,86	100	0,20	0,08	0,03
3.26	0,54	100	0,01	0,05	0,20
3.27	0,57	14	0,01	0,40	0,06
3.28	0,17	100	0,003	0,20	0,004
3.29	2,27	100	0,05	0,22	0,07
3.30	1,19	100	0,20	0,11	0,03
3.31	0	5	0	0	0
3.32	0,9	100	0,20	0,08	0,20
3.33	0,96	100	0,20	0,09	0,03
3.34	0,06	100	0,001	0,006	0,02
3.35	0	100	0	0	0
3.36	2,14	100	0,04	0,21	0,10
3.37	0,47	3	0,01	1,63	0,01
3.38	1,23	100	0,20	0,12	0,56
3.39	1,81	100	0,04	0,17	0,06
3.40	1,51	100	0,03	0,15	0,06
3.41	1,76	100	0,04	0,17	0,06
3.42	0	39	0	0	0
3.43	0,03	100	0,0006	0,003	0,0008
3.44	0,92	100	0,20	0,09	0,20
3.45	1,12	27	0,20	0,4	0,14

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
3.46	1,18	100	0,20	0,11	0,03
3.47	3,80	100	0,08	0,37	0,14
3.48	0,37	20	0,008	0,17	0,10
3.49	0,30	100	0,006	0,03	0,20
3.50	0	0	0	0	0
3.51	0,03	100	0,0007	0,003	0,0008
3.52	0,91	10	0,20	0,86	0,21
3.53	1,19	100	0,20	0,11	0,03
3.54	0	100	0	0	0

Quadro 2 B – Concentração de xilitol, percentagem de D-xilose consumida, produtividade volumétrica (Q_P), produtividade específica (q_P) e rendimento (Y_{P/S}) para o cultivo em batelada de leveduras isoladas do ambiente de laticínios, em meio mínimo mineral acrescido de 1% de D-xilose e 0,5% de extrato de levedura a 100 rpm e 30°C, após 48 h

LEVEDURA	Xilitol (g L ⁻¹)	% Xilose consumida	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	q _P (mol g ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)
VII END 51	0,55	56	0,01	0,20	0,11
III END 13	0,47	56	0,01	0,20	0,09
VII END 54	0,46	57	0,01	0,01	0,09
III END 19	0,46	61	0,01	0,01	0,08
III END 2	0,44	68	0,01	0,01	0,07
III END 18	0,22	32	0,004	0,20	0,07
VIII END 38	0,42	62	0,009	0,01	0,07
III END 11	0,46	66	0,01	0,01	0,08
VIII END 45	0,53	50	0,01	0,20	0,12
SS END 66	1,10	100	0,20	0,03	0,12
SS END 69	1,42	97	0,03	0,04	0,16
IV END 13	0,48	58	0,01	0,20	0,09
IV END 29	0	0	0	0	0
I END 14	0	36	0	0	0
NS EPI 77	1,04	75	0,20	0,03	0,15
NS EPI 91	0,86	79	0,20	0,03	0,12
IV EPI 125	0	0	0	0	0
IV EPI 125	1,50	88	0,03	0,05	0,19

* END= ENDFÍTICA, EPI= EPIFÍTICA.

