

FÁBIO COELHO SAMPAIO

CONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL POR *Debaryomyces*
hansenii UFV-170 EM MEIO SEMI-SINTÉTICO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

RESUMO

SAMPAIO, Fábio Coelho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2005.
Conversão de xilose em xilitol por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em meio semi-sintético. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiros: Frederico José Vieira Passos, Hilário Cuquetto Mantovani e Célia Alencar de Moraes.

Com o objetivo de avaliar o processo de conversão de xilose em xilitol por um novo isolado de *Debaryomyces hansenii* em meio semi-sintético, foi determinada a influência de diferentes variáveis de cultivo, a relação entre o crescimento da biomassa e a produção de xilitol, e a recuperação do produto final, utilizando ferramentas matemáticas e modelagem metabólica. Avaliando a influência do pH inicial do meio e da temperatura de cultivo na conversão de 50 g L⁻¹ de xilose (S_o), foi observado que o pH ótimo está entre 4,0 e 8,0, com a produção de xilitol (P_m) entre 37,5±1,7 e 41,8±0,78 g L⁻¹ e o rendimento ($Y_{P/S}$) entre 0,70±0,01 e 0,76±0,01/0,02 g g⁻¹, enquanto, a temperatura ótima está entre 30°C e 35°C com P_m entre 41,0±1,1 e 41,6±1,1 g L⁻¹ e $Y_{P/S}$ entre 0,75±0,02 e 0,77±0,04 g g⁻¹. A conversão também foi estudada sob forte limitação de oxigênio, sendo observada uma produção de xilitol desprezível, e sob condição semi-aeróbia, quando foram obtidos os melhores valores de produção de xilitol ($P_{max} > 70$ g L⁻¹ e $Y_{P/S} > 0,65$ g g⁻¹, para $S_o \cong 100$ g L⁻¹). Foi determinado que o acúmulo de xilitol no meio de cultivo está associado ao estado fisiológico característico de fase de crescimento desacelerado e à concentração de biomassa que influencia a disponibilidade de oxigênio dissolvido e a manutenção da capacidade de conversão, limitada apenas pela disponibilidade de substrato e nitrogênio. Aplicando *design* fatorial (3³ e 3²), foi

observado que a combinação de maior concentração de xilose ($S_o = 165 \text{ g L}^{-1}$), na presença de alta concentração inicial de células ($X_o = 6,4 \text{ g L}^{-1}$) e alta aeração (300 rpm) beneficiou o processo de conversão. Na simulação da composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, as células suportaram as condições impostas pela presença de inibidores e de outros açúcares. A cristalização de xilitol em meio semi-sintético fermentado tratado com carvão ativo (20 g L^{-1}) foi favorecida pelo aumento na concentração de xilitol ($675 \leq P^o_{xyt} \leq 911 \text{ g L}^{-1}$). Baixa temperatura ($-10 \leq T_c \leq 15^\circ\text{C}$) foi mais eficiente em termos de rendimento de cristalização, enquanto o grau de pureza apresentou um comportamento contrário. a presença simultânea de xilose residual reduziu o conteúdo de xilitol dos cristais de 97,7 para 85,3%, porém aumentou 1,6 vezes o rendimento de cristalização de 0,27 para 0,42. Finalmente, o estudo cinético da cristalização de xilitol revelou o efeito positivo da presença de xilose residual ($168 \pm 8.0 \text{ g L}^{-1}$) que aumentou a velocidade constante de crescimento de cristais, assim permitindo a operação a maiores temperaturas e menor P^o_{xyt} . Os resultados obtidos nas etapas do processo de conversão de xilose em xilitol, confirmaram o potencial da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 na conversão de xilose em xilitol.

ABSTRACT

SAMPAIO, Fábio Coelho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, august 2005.
Xylose-to-xylitol conversion by *Debaryomyces hansenii* UFV-170 in medium semi-synthetic. Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Frederico José Vieira Passos, Hilário Cuquetto Mantovani and Célia Alencar de Moraes.

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% D-xylose 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 ($Q_P=0.49$ g L⁻¹ h⁻¹, $q_P=0.49$ mmol g⁻¹ h⁻¹ and $Y_{P/S}=0.64$ 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 g L⁻¹ h⁻¹, q_P=0.58 mmol g⁻¹ h⁻¹ and Y_{P/S}=0.65 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 g L⁻¹ h⁻¹, q_P=0.74 mmol g⁻¹ h⁻¹ and Y_{P/S}=0.57 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 g L⁻¹ h⁻¹, q_P=0.67 mmol g⁻¹ h⁻¹ and Y_{P/S}=0.65 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 g L⁻¹ h⁻¹, q_P=0.60 mmol g⁻¹ h⁻¹ and Y_{P/S}=0.72 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.