



MARÍLIA SANTIAGO DE BRITO DE PAULA

**PRODUÇÃO DE ERITRITOL POR LEVEDURAS
CULTIVADAS EM MEIO CONTENDO GLICEROL COMO
FONTE DE CARBONO**

**LAVRAS – MG
2017**

MARÍLIA SANTIAGO DE BRITO DE PAULA

**PRODUÇÃO DE ERITRITOL POR LEVEDURAS CULTIVADAS EM MEIO
CONTENDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

COORIENTADORA:

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Paula, Marília Santiago de Brito de.

Produção de eritritol por leveduras cultivadas em meio
contendo glicerol como fonte de carbono / Marília Santiago de
Brito de Paula. - 2017.

56 p. : il.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Coorientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Eritritol. 2. Manitol. 3. Arabitol. I. Dias, Disney Ribeiro. II.
Schwan, Rosane Freitas. III. Título.

MARÍLIA SANTIAGO DE BRITO DE PAULA

**PRODUÇÃO DE ERITRITOL POR LEVEDURAS CULTIVADAS EM MEIO
CONTENDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para a
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de abril de 2017

Dra. Lílian Pantoja UFVJM

Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedroso Miguel UFLA

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Orientador

LAVRAS – MG

2017

A Deus,

Aos meus familiares,

Aos meus amigos e esposo,

A todos os envolvidos na conclusão desse trabalho.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento nesses dois anos de mestrado, por ter me concedido sabedoria, entendimento, fé e força para enfrentar os momentos mais difíceis.

A UFLA e ao Departamento de Biologia;

Ao meu orientador Professor Dr. Disney Ribeiro Dias por todo auxílio, ensinamentos, pela bondade e educação com que sempre me tratou;

Aos professores pelos ensinamentos passados, especialmente ao professor Dr. Eustáquio;

A minha banca Dra. Lílian Pantoja e Dra Maria Gabriela;

A Cidinha, Dr. Leonardo e Dra. Karla, quero agradecer por toda ajuda que me deram, pelos conselhos, pelo carinho e amizade, sem vocês não teria chegado onde cheguei, essa vitória devo muito a todo apoio que recebi.

A CAPES pela bolsa;

A secretária Rose, por todo auxílio que me prestou;

Aos colegas de laboratório Rafaela Merlo, Fernanda, Daiane, Daiana, Acsa, Pamela, Luciana, Nádia, Dérica, Joice, Ana Paula, Silvia, Aline, Michele, Rafaela Andrade, Bárbara e Juliana, pelos bons momentos vividos, por terem tornado esses dois anos mais felizes, pelos conselhos e amizade, todas são muito especiais para mim;

Aos meus amigos Débora, Leandro, Larissa, Ivens, Bruno, Priscila, Mísia e Kaline, por todo apoio, pelas orações, pelas palavras carinhosas, pela amizade;

A minha irmã Marina e meu cunhado Natan, vocês foram essenciais para que chegasse até aqui, especialmente por me fazerem rir nos momentos de tristeza;

Ao meu esposo Ronaldo, pelo amor, carinho, paciência, por ter sido meu suporte e porto seguro nos momentos mais difíceis, pelas madrugadas e finais de semana que me fez companhia no laboratório, sem você não teria conseguido;

Aos meus pais Rosana e Maurílio, e a minha sogra Lourdes e meu sogro Ricardo, agradeço pelas orações, pelo suporte, pelo carinho, essa vitória dedico especialmente a vocês;

Aos meus avós Bina e Juca, e, Conceição e Pedro obrigada por tudo;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

“As tuas mãos me fizeram e me afeiçoaram, dá-me inteligência para que aprenda Teus estatutos.” Salmos 119:73

RESUMO GERAL

O Eritritol é um poliol que atualmente é produzido em processos biotecnológicos já que a síntese química parece ser ineficaz. Possui inúmeras características que o tornam interessante para as indústrias alimentícias tais como baixas calorias, sabor muito semelhante a sacarose, seguro para o consumo dos diabéticos e não cariogênico. Espécies microbianas, especialmente leveduras, são de grande importância para a produção de eritritol. Neste trabalho trinta e duas leveduras da Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA), foram utilizadas para testes de crescimento, consumo da fonte de carbono e produção de eritritol em meios contendo glicerol ou glicose, na concentração de 100g/L. Os resultados mostraram que das trinta e duas leveduras testadas, três se mostraram mais eficientes na produção de eritritol: *Candida rugosa* CCMA 0371, e duas cepas de *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e CCMA 0357. Além de eritritol também foi detectada a presença de manitol e arabitól tanto em glicose como em glicerol, sendo o glicerol considerado melhor do que a glicose para a produção de eritritol, manitol e arabitól.

Palavras-chave: Eritritol. Manitol. Arabitól. Glicerol. Glicose.

GENERAL ABSTRACT

Erythritol is a polyol that is currently produced in biotechnological processes since chemical synthesis appears to be ineffective. It has numerous characteristics that make it interesting for the food industries like low calories, taste very similar to sucralose, safe for the consumption of diabetics and non-cariogenic. Microbial species, especially yeasts, are of great importance for the production of erythritol. In this work, thirty-two yeasts from the Collection of Cultures of Agricultural Microbiology (CCMA) were used for growth tests, carbon source consumption and erythritol production in media containing glycerol or glucose at 100g / L concentration. The results showed that of the thirty-two yeasts tested, three were more efficient in the production of erythritol: *Candida rugosa* CCMA 0371, and two strains of *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 and CCMA 0357. In addition to erythritol, the presence of mannitol and arabitol Both in glucose and glycerol, and glycerol is considered better than glucose for the production of erythritol, mannitol and also arabitol.

Keywords: Erythritol. Mannitol. Arabitol. Glycerol. Glucose.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Valor energético dos polióis.....	19
Figura 2 - Visão simplificada das vias metabólicas de utilização do glicerol em leveduras.....	20
Figura 3 - Principais rotas da via das pentoses fosfato.....	23
Figura 4 - Rota da biossíntese de eritritol em leveduras e bactérias. Enzimas envolvidas, <i>EPDH</i> eritritol-4-fosfato-desidrogenase, <i>PK</i> fosfocetolase, <i>E4PK</i> eritrose-4-fosfato quinase, <i>PTase</i> fosfatase, <i>ER</i> eritrose redutase.....	24
Figura 5 - Via de biossíntese de eritritol a partir de glicerol em <i>Yarrowia lipolytica</i>	27

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Crescimento das leveduras <i>Candida rugosa</i> CCMA 0371 em glicerol puro e glicose, e <i>Yarrowia lipolytica</i> 25 CCMA 0242 em glicerol puro e glicose.....	45
Figura 2 - Concentração de Eritritol pelas leveduras <i>Candida rugosa</i> CCMA 0371 e <i>Yarrowia lipolytica</i> 25 CCMA 0242 em meio de crescimento contendo (a) Glicerol Puro e (b) Glicose após 12 dias de fermentação.....	47
Figura 3 - Leveduras que apresentaram produção de (a) manitol e (b) arabitol em glicerol puro e glicose após 12 dias de fermentação.....	50
Figura 4 - Cinética do consumo de glicerol em relação a produção de eritritol e manitol para <i>Candida rugosa</i> CCMA 0371 (a) e <i>Yarrowia lipolytica</i> 25 CCMA 0242 (b) ao longo dos 12 dias de fermentação.....	53

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

- Tabela 1 - Leveduras obtidas junto a Coleção de culturas da Microbiologia Agrícola CCMA utilizadas no teste para crescimento em glicerol puro e glicose e avaliação da produção de poliois com seus respectivos códigos e origem de coleta.....38
- Tabela 2 - Valores de absorbância (595 nm) durante crescimento das trinta e duas leveduras em glicerol puro e glicose ao longo de 12 dias de fermentação.....42
- Tabela 3 - Comparação da produção de açúcares álcoois pelas leveduras *Candida rugosa* CCMA 0371, *Yarrowia lipolytica* 25 CCMA 0242 e *Yarrowia lipolytica* 9.4 CCMA 0357 em glicerol puro e glicose.....46
- Tabela 4 - Parâmetros cinéticos no ponto de máxima produção de eritritol (12 dias) por *Candia rugosa* CCMA 0371 e *Yarrowia lipolytica* 25 CCMA 0242.....49

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	14
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Polióis e sua importância.....	16
2.2	Síntese de polióis por microrganismos.....	19
2.3	Produção de eritritol por microrganismos.....	21
2.4	Leveduras.....	24
2.4.1	Leveduras do gênero <i>Candida</i>.....	25
2.4.2	<i>Yarrowia lipolytica</i> e suas aplicações.....	26
	REFERENCIAS.....	29
	CAPÍTULO 2	34
1	INRODUÇÃO.....	36
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1	Microrganismos.....	38
2.2	Meios de cultivo, condições e preparo do inóculo.....	39
2.3	Métodos analíticos.....	40
2.4	Parâmetros de produção.....	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1	Seleção de Leveduras.....	42
3.2	Produção de Polióis.....	45
3.3	Consumo de Glicerol e Glicose.....	52
4	CONCLUSÃO.....	54
	REFERENCIAS.....	55

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Dos produtos gerados por leveduras a partir da conversão do glicerol, a literatura destaca a produção de alguns polióis (KHAN et al., 2009; RYMOWICZ; RYWINSKA, 2009). Os polióis são também conhecidos como açúcares álcoois e se encontram distribuídos no reino vegetal e animal. Mesmo sendo compostos naturais de muitas plantas e animais sua extração se torna inviável, devido aos baixos teores e etapas de extração envolvidas. Os polióis são muito utilizados em indústrias alimentícias dada a sua capacidade de conferir “corpo” aos alimentos além de substituem ou restringem a adição de açúcar sem alterar o sabor ou a textura do alimento (GOMES et al., 2007). Os principais polióis para esses fins são: o manitol, o xilitol, o eritritol, o isomalte, o lactitol, o sorbitol e hidrolisados de amido hidrogenado.

O eritritol é um poliól constituído de quatro carbonos, se encontra distribuído amplamente na natureza em frutas, algas, cogumelos e em alguns alimentos fermentados, é derivado do monossacarídeo eritritose e está presente na alimentação do homem desde os tempos antigos. É considerado um poliól perfeitamente adequado para a utilização em balas e chocolates, podendo substituir totalmente o açúcar, reduzindo cerca de 30% o valor calórico do alimento que pode ser consumido por diabéticos (WANKENNE et al., 2013).

Porém o que o destaca dos demais edulcorantes são suas características físico-químicas e fisiológicas únicas, que o permite ser empregado isoladamente ou combinado com edulcorantes intensos permitindo-se obter produtos com qualidades sensoriais e tecnológicas mais próximas possíveis dos produtos preparados com sacarose, com o benefício de apresentar redução calórica em torno de 90% (AOKI, 1993).

Segundo Zorn e Czermak (2013), a produção de eritritol por microrganismos está normalmente associada a fungos e leveduras osmofílicas, esses microrganismos são descritos como acumuladores de polióis ou de seus derivados em resposta ao aumento da pressão osmótica externa.

Graças a demanda de mercado e o grande interesse das indústrias alimentícias no uso do eritritol, pesquisadores tem concentrado esforços em maneiras de reduzir o custo da produção de eritritol. Desta forma, surgiu na última década a possibilidade de utilização de subprodutos como substratos de baixo custo para os processos microbiológicos. Neste cenário,

muita atenção tem sido dada ao potencial biotecnológico da levedura *Yarrowia lipolytica* que pode converter o glicerol em eritritol (TOMASZKEWSK; RYMOWICZ; RYWINKA, 2013).

O eritritol, encontrado em pequenas concentrações na natureza, pode ser sintetizado quimicamente ou em processos microbiológicos. Com o avanço das pesquisas, foram descobertas e descritas uma grande variedade de microrganismos produtores de eritritol: *Aspergillus niger*, *Aurobasidium sp.*, *Beauveria bassiana*, *Candida magnoliae*, *Moniliella sp.*, *Penicillium sp.*, *Pseudozyma tsukubaensis*, *Torula corallina*, *Trigonopsis variabilis*, *Trichosporonoides sp.*, *Ustilagomycetes sp.* e *Yarrowia lipolytica* (ZORN; CZERMAK, 2013).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Polióis e sua importância

Os polióis ou açúcares álcoois, são também conhecidos como edulcorantes de corpo constituindo uma classe importante de carboidratos que podem ser monossacarídicos (sorbitol, manitol, xilitol, eritritol), dissacarídicos (isomalte, latitol, lactitol) ou até mesmo uma mistura de sacarídeos e polissacarídeos hidrogenados. Os polióis que são monossacarídeos podem ser encontrados em frutas, verduras e até mesmo como produto do metabolismo intermediário de carboidratos em animais. Nas indústrias são utilizados como emulsificantes, estabilizantes, umectantes, crioprotetores e redutores do ponto de congelamento (BAUCHART; AUROUSSEOU; AUCLAIR, 1985; GEAY; RICHET; THIVEND, 1992; WANKENNE et al., 2013).

Candido e Campos (1996) afirmaram em seus estudos que os polióis são obtidos a partir da conversão do grupo carbonílico (aldeído e cetona) dos açúcares em álcool por hidrogenação catalítica, essa conversão confere aos polióis propriedades importantes como resistência ao escurecimento, maior estabilidade química, maior afinidade por água e menor susceptibilidade a fermentação, que são características importantes e particularmente interessantes para a aplicação em indústrias de alimentos.

Uma das principais utilidades dos polióis é a de conferir “corpo” aos alimentos. Para obter-se um alimento diet e light com qualidade, é fundamental o uso de ingredientes de baixa caloria capazes de substituir o açúcar sem prejudicar o sabor e as características físicas do produto. Os ingredientes que fazem essa substituição podem ser divididos em dois grupos distintos de compostos: os edulcorantes de alta intensidade e os de baixa intensidade que podem ser denominados de agentes de corpo. (GOMES et al., 2007)

Em indústrias alimentícias estes poliois são empregados em mistura com edulcorantes intensos quando há necessidade de restringir o açúcar, não promovendo redução calórica mas permitindo que o sabor e a textura permaneçam satisfatórios para o consumo. Os polióis se comportam como carboidratos sendo absorvidos lentamente pelo intestino delgado independentemente da insulina por absorção passiva, não elevando a taxa de insulina no sangue (WANKENNE et al., 2013).

As principais aplicações dos polióis em alimentos são em confeitos isentos de açúcar como balas, geleias, chocolates bem como em pães, bebidas não alcólicas e produtos lácteos. Entre os polióis mais utilizados nas indústrias alimentícias estão o eritritol, o isomalte, o lactitol, o maltitol, o manitol, o sorbitol e o xilitol (GOMES et al.; 2007)

A maioria dos polióis apresentam características físicas e químicas similares aos açúcares com a vantagem de apresentarem menos calorias não serem cariogênicos, estas características ampliam suas aplicações em alimentos e produtos farmacêuticos (RODRIGUES, 2005; TALJA; ROOS, 2001)

Segundo Tomaszewak, Rywinska e Gladkowski 2012, o eritritol é um álcool de açúcar com quatro carbonos produzido por leveduras osmofílicas em processos microbiológicos já que sua produção química é ineficaz, podendo ser também encontrado em frutas, algas, cogumelos e em alguns alimentos fermentados.

Este poliól apresenta um perfil de sabor semelhante ao da sacarose e embora possua apenas 6% das calorias de um açúcar ainda tem 70% da doçura (Figura 1), além disso não é cariogênico. Seu uso na alimentação é amplamente aprovado, já que possui ausência de efeitos colaterais gástricos. (TOMASZEWAK; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2012)

O xilitol é um poliól com importância em diversas áreas industriais graças ao seu poder edulcorante equivalente ao da sacarose, tendo seu maior emprego em produtos não cariogênicos (CHOI et al., 2000; YLIKAHRI, 1979). Na indústria alimentícia o uso do xilitol é amplamente desejável por se tratar de uma substância atóxica, sendo seu uso seguro para humanos, por essa razão, é potencialmente aplicado na fabricação de alguns alimentos como: balas, gomas de mascar, sorvetes, chocolates, entre outros (CORTEZ, 2005).

O manitol possui seis carbonos e tem inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Se encontra distribuído na natureza em diversos tipos de plantas, algas, micélios de fungos e cogumelos (TOMASZEWAK; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2012). É bastante conhecido por apresentar efeitos que são benéficos a saúde, por esta razão são amplamente adicionados em produtos com valor extranutricional (WISSELINK et al., 2002). Assim como os demais açúcares álcoois, o manitol é parcialmente absorvido pelo organismo não influenciando o nível de insulina no sangue, evitando assim uma hiperglicemia sendo então aplicado em alimentos destinados a diabéticos (GRIFFIN; LYNCH, 1972).

O sorbitol, que também é conhecido como D-sorbitol, D-glucitol e D-sorbito foi descoberto em 1872, é o poliól mais encontrado na natureza em frutas como a maçã, a pera, o pêssago, a ameixa, a cereja, bem como em algas marinhas e bebidas fermentadas como a cidra. Apresenta cerca de metade do valor energético da sacarose (Figura 1). (CALORIE CONTROL COUNCIL, 2010). É um agente umectante utilizado em indústrias como melhorador de textura, com alto poder dulçor, cerca de 0,6 % maior que a sacarose possuindo ação refrescante. É utilizado em produtos que apresentam tendência ao endurecimento e ressecamento, como alguns doces, produtos panificados e chocolate. Quando consumido em excesso, apresenta efeito laxativo (LE; MULDERING, 2001).

De acordo com Wankenne et al. (2013), o isomalte apresenta propriedades físicas e químicas muito semelhantes ao açúcar, possui estabilidade química, térmica, microbiológica e enzimática, por essa razão apresenta de 10 à 15 vezes mais resistência a hidrólise ácida e enzimática do que a sacarose. Em experiência com animais, ingerir este poliól em altas doses ocasionou diarreia e distúrbios metabólicos, porém, tanto animais como seres humanos, tendem a se adaptar mais rapidamente a altas doses de isomalte do que de outro poliól. O isomalte é utilizado em indústrias para substituir o uso da sacarose, sendo empregado em sorvetes, gomas de mascar, gelatinas e recheios. Por absorver menos água que a sacarose, seu uso permite maior crocância quando utilizado em produtos panificados light (SCIFFMAN et al., 1995).

O lactitol também é um poliól muito utilizado em indústrias devido ao seu sabor suave e agradável, cerca de 0,4 vezes maior que a sacarose, entretanto, não apresenta sabor residual. Possui ação prebiótica, que tem sido estudada para o crescimento e estimulação de *Lactobacillus* (SCIFFMAN et al., 2001; VAN VELTHUIJSEN; BLANKERS, 2001).

Os hidrolisados hidrogenados de amido (HSH) se referem a misturas de oligo e polissacarídeos hidrogenados adicionados com polióis (sorbitol, manitol e maltitol). Incluem xaropes que por não apresentarem predominância de uma substância, recebem a designação genérica de hidrolisado. São mais doces que a sacarose e são empregados como corantes, enzimas, produtos dietéticos e veículos em aromas (EBERHARDT; TOLABA; SUÁREZ, 2001).

O maltitol pode ser utilizado como substituto de gordura e açúcar, como melhorador de cremosidade em chocolates e bolos dietéticos. Possui sabor similar a sacarose, sendo ligeiramente refrescante. Por apresentar baixa solubilidade, não é utilizado em produtos como

sorvetes, frutas em conserva, refrigerantes e confeitos. É encontrado na natureza em alguns vegetais, frutas, cogumelos e algas marinhas (WANKENNE et al., 2013).

Figura 1 – Valor energético dos polióis (NABORS, 2002)

poliol	energia* (kcal/g)
eritritol	0,2
manitol	1,6
isomalte	2,0
lactitol	2,0
maltitol	2,1
xilitol	2,4
sorbitol	2,6
hidrolisados hidrogenados de amido	3,0

*sacarose 4 kcal/g

2.2 Síntese de Polióis por Microrganismos

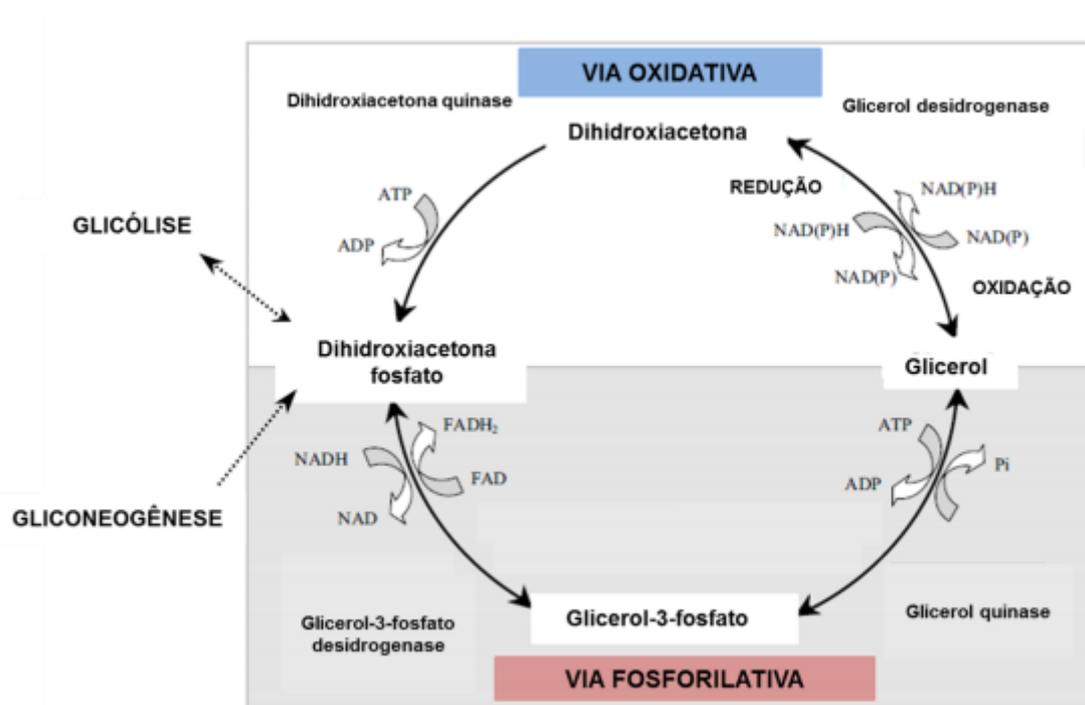
A via biotecnológica é uma alternativa para a produção de alguns polióis com utilização em indústrias. Polióis como xilitol, sorbitol, manitol, eritritol, sorbitol e lactitol, são alguns exemplos de álcoois de açúcar utilizados e disponíveis comercialmente (WANKENNE et al., 2013)

O glicerol, é uma molécula que pode ser absorvida pela célula microbiana através de difusão facilitada. É uma molécula simples em sua composição e muito abundante, por essa razão, alguns microrganismos utilizam o glicerol como fonte de carbono, convertendo-o em diferentes intermediários metabólicos (DOBSON; GRAY; RUMBOLD, 2012).

Existem duas vias bem conhecidas para o metabolismo do glicerol em leveduras: a via fosforilativa (via do glicerol – 3fosfato) e a via oxidativa (via da dihidroxiacetona) que podem ser observadas na Figura 2. Algumas leveduras utilizam essas duas vias metabólicas para

assimilação do glicerol, outras espécies fazem uso apenas de uma dessas vias, como é o caso da levedura *Yarrowia lipolytica*, que utiliza apenas a via fosforilativa. (ERKAMOVA; MORGUNOV, 1987; LEVINSON; KURTZMAN; KUO, 2007; MAKRI; FAKAS; AGGELIS, 2010).

Figura 2 - Visão simplificada das vias metabólicas de utilização do glicerol em leveduras SILVA, 2013



Dos produtos gerados por leveduras a partir da conversão do glicerol, a literatura destaca a produção de alguns polióis (KHAN; BIDE; GADRE, 2009; RYMOWICZ; RYWINSKA, 2009).

A produção industrial dos polióis tem se realizado por meio de processos químicos que envolvem hidrogenação de açúcar com adição de catalizadores químicos (KUSSEROW; SCHIMPF; CLAUS, 2003), esses processos são difíceis, o que tem impulsionado o estudo e grande interesse no desenvolvimento de processos bioquímicos microbianos (ALMEIDA; FÁVARO; QUIRINO, 2012).

A produção microbiana é uma alternativa para a produção de xilitol, o processo de bioconversão apresenta baixo custo e alto rendimento, sendo as leveduras consideradas os melhores microrganismos para produção de xilitol, destacando-se o gênero *Candida*

(BARBOSA et al., 1988; CHOI et al., 2000). Algumas espécies de bactérias são capazes de converter D-xilose a xilitol, porém esse processo de conversão não tem atraído o interesse de pesquisadores devido à baixa produtividade (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

A utilização de processos fermentativos para a produção de sorbitol, tornou-se uma solução viável, já que o processo diminui os custos e impactos ambientais. Dentre os microrganismos candidatos a produção industrial, tem se destacado *Zymomonas mobilis* (FARIA, 2002), que sob condições de estresse, como por exemplo a alta concentração de açúcares, a enzima glicose-frutose-oxidoreductase fornece a célula uma alta concentração de sorbitol para balancear os efeitos da desidratação causada pela diferença de concentração do meio intra e extracelular.

Dentre os polióis mencionados anteriormente, o manitol é uma molécula amplamente usada em indústrias alimentícias, tem sua obtenção industrial a partir da alta pressão da hidrogenação catalítica da mistura de frutose e glicose. Algumas leveduras como *Torulopsis mannifaciens* (CBS 5981), *T. versatilis* (CBS 1752) e a (NCIM 3470) *Candida magnoliae*, são exemplos de microrganismos envolvidos na produção de manitol a partir de glicerol. O processo de bioconversão por essas leveduras, mostrou grande vantagem pois não produz outros metabolitos detectáveis nas análises, tendo por resultado uma solução aquosa limpa a partir da qual a recuperação da molécula torna-se relativamente fácil (SILVA; OLIVEIRA, 2013).

De acordo com Insumos 2008, o eritritol é um poliól que possui origem natural e por esse motivo, pode ser obtido por processos biotecnológicos em duas etapas distintas. Na primeira etapa é obtida a glicose através de hidrólise enzimática do amido de milho ou trigo, essa glicose é posteriormente fermentada na segunda etapa do processo, através de leveduras osmofílicas, à eritritol.

Segundo Silva e Oliveira (2013), a utilização de substratos mais baratos como o glicerol bruto, pode reduzir os custos na produção de eritritol. A espécie de *Y. lipolytica* tem chamado a atenção de cientistas pois se mostra capaz de metabolizar uma grande variedade de subprodutos industriais.

2.3 Produção de Eritritol por Microrganismos

O eritritol é um poliól utilizado como edulcorante de baixas calorias, seguro para o consumo, não cariogênico, apresenta um perfil de sabor semelhante ao da sacarose e no corpo humano o eritritol é excretado na urina, sem alterar o nível de insulina, sendo assim, é seguro para o consumo de diabéticos (WANKENNE et al., 2013).

Segundo Tomaszewak, Rymowicz e Rywinska (2013), como sua produção química é ineficaz, o eritritol é o único poliól produzido em processos biotecnológicos. A capacidade de sua produção tem sido relatada para leveduras osmofílicas, alguns fungos e bactérias, utilizando substratos tradicionais como glicose, frutose, sacarose e hidrolisados de amido. Com o intuito de reduzir o custo na produção de eritritol, muitos esforços têm sido focados para avaliar o impacto de fatores como a temperatura, o pH, a pressão osmótica, as fontes de carbono, a concentração dos substratos utilizados, a adição de NaCl e a suplementação com vitaminas e minerais.

Existe no mercado atual uma crescente demanda por este produto, por esta razão a produção de eritritol por processos biotecnológicos está a tornar-se cada vez mais importante, sendo os processos de fermentação utilizados para esta finalidade. (MIRONEZUK et al., 2014)

Microrganismos produtores de eritritol já são conhecidos há muitos anos. Trabalhos relatam microrganismos que produzem rendimentos de 35 a 40% do açúcar utilizado no meio. Com o avanço das pesquisas, foram descobertas e descritas uma grande variedade de microrganismos produtores de eritritol: *Aspergillus niger*, *Aurobasidium sp.*, *Beauveria bassiana*, *Candida magnoliae*, *Moniliella sp.*, *Penicillium sp.*, *Pseudozyma tsukubaensis*, *Torula corallina*, *Trigonopsis variabilis*, *Trichosporonoides sp.*, *Ustilagomycetes sp.* e *Yarrowia lipolytica*, sendo que cada diferente microrganismo faz uso de diferentes caminhos para a síntese de eritritol. *Trichosporonoides megachiliensis*, por exemplo, utiliza principalmente o caminho das pentoses fosfato, para produção de eritritol, bem como *Yarrowia lipolytica* que converte glicose em eritrose 4-fosfato pela via das pentose fosfato (Figuras 3 e 4) (ZORN; CZERMAK, 2013).

Nas últimas décadas, vários estudos foram realizados relatando a produção de ácido cítrico a partir do glicerol pela levedura *Yarrowia lipolytica*, identificando que durante a biossíntese do ácido cítrico a partir do glicerol, estavam presentes nos caldos de cultura dois subprodutos predominantes: eritritol e manitol. Os autores observaram a capacidade de produção de eritritol para leveduras osmofílicas dos seguintes gêneros: *Pichia*, *Zygopichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Moniliella*, *Torula*, *Torulopsis*, *Trigonopsis*, *Trichosporon*,

Trichosporonoides, *Pseudozyma*, e *Ustilago*. Vale a pena ressaltar que glicose, frutose, sacarose e hidrolisados de amido são os principais substratos utilizados para a produção de eritritol por leveduras osmofílicas (TOMASZEWSK et al., 2014).

A biossíntese de ácidos álcoois por leveduras osmofílicas envolve reações das vias de Embden-Meyerhof e das pentoses fosfato. A formação do eritritol, em especial, se dá pela ação da enzima transcetolase sobre a frutose-6-fosfato, deixando como produto da reação um fragmento de 4 carbonos, a eritrose 4-fosfato, um intermediário do ciclo das pentoses fosfato, que possivelmente é desfosforilado e reduzido (Figura 4). A enzima chave na síntese de eritritol é a eritrose redutase que catalisa a última etapa da transformação (AOKI, 1993)

Figura 3- Principais rotas da via das pentoses fosfato (ZEIGER, et al., 2012).

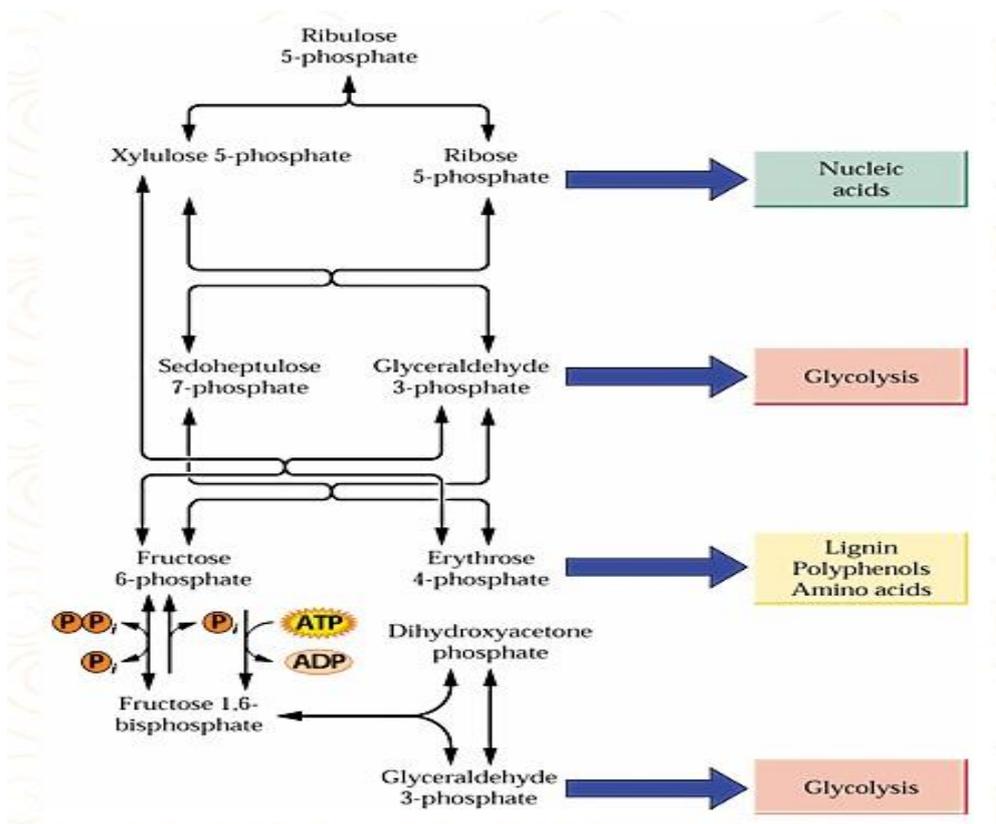
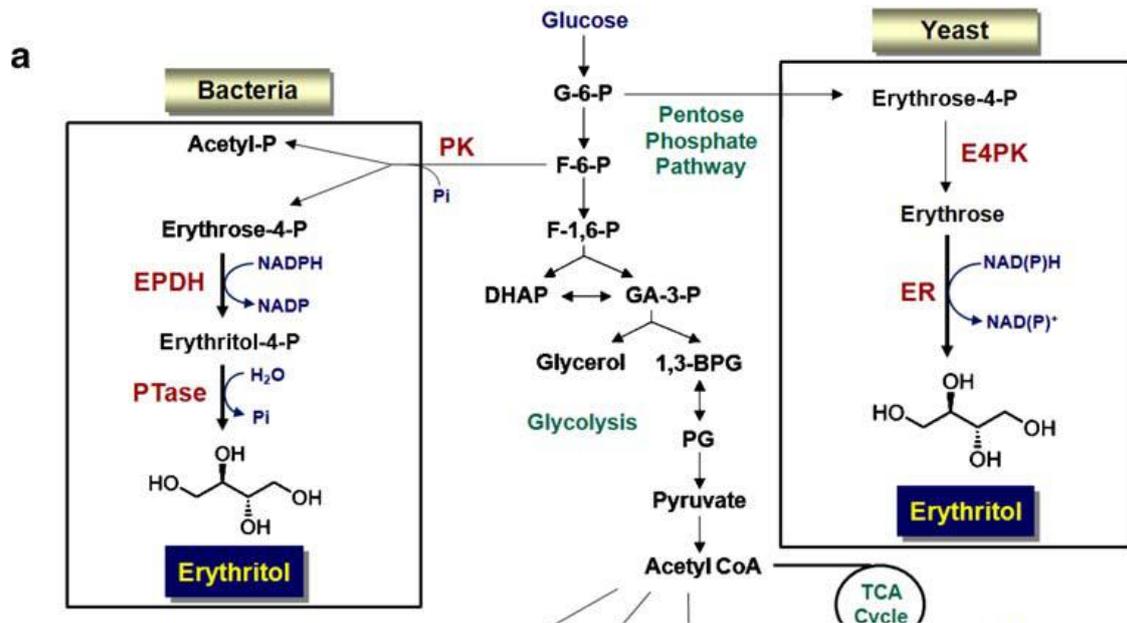


Figura 4 - Rota da biossíntese de eritritol em leveduras e bactérias. Enzimas envolvidas, *EPDH* eritritol-4-fosfato-desidrogenase, *PK* fosfoctolase, *E4PK* eritrose-4-fosfato quinase, *PTase* fosfatase, *ER* eritrose redutase



2.4 Leveduras

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucarióticos unicelulares integrados no reino *Fungi*, domínio *Eukaria* e são caracterizadas por possuírem um crescimento vegetativo unicelular e por apresentarem possibilidade de formação de estruturas sexuais não contidas em corpos de frutificação (KURTZMAN, 1994; PHAFF; MILLER; MRAK, 1978).

Estes microrganismos têm sido utilizados para produção de um grande número de produtos de interesse industrial, especialmente na indústria alimentícia e também no desenvolvimento de vários processos biotecnológicos devido a diversidade de ambientes em que podem ser encontradas e sua adaptação a diversos tipos de substratos (JAQUES; CASEREGOLA, 2008).

As indústrias cada vez mais introduzem e aperfeiçoam processos de fermentação utilizando leveduras aproveitando do potencial de matérias primas renováveis para se obter produtos como bebidas, alimentos, fármacos, enzimas, biofertilizante, bioinseticidas, entre outros. Neste cenário os resíduos agrícolas e agroindustriais, tais como o melaço de cana de açúcar, farelos de soja, milho, trigo, aveia, glicerol bruto, resíduos celulósicos e da indústria de

papel, vem ganhando destaque com uma gama de processos fermentativos (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2002).

Segundo Pahff, Miller e Mrak (1978), as leveduras por serem microrganismos quimio-organo-heterotróficos são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e de energia, e, a escolha por determinado nutriente é determinante para a diversidade das espécies em diferentes nichos.

Estes microrganismos são amplamente encontrados na natureza em ambientes muito diversos: terrestres, aquáticos e aéreos, onde as plantas parecem constituir os nichos mais comuns (INACIO et al., 2002).

2.4.1 Leveduras do gênero *Candida*

Candida é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e animais, colonizando a pele e mucosas dos tratos digestivos e urinário, bucal e vaginal. Atualmente são descritas 197 espécies do gênero *Candida* que pertencem ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes* e família *Cryptococcaceae*, havendo algumas espécies classificadas na subdivisão *Ascomycota*. Pouco mais de 20 espécies estão relacionadas a infecções no homem (LACAZ; PORTO; MELO, 1998).

Em meio sólido as leveduras desse gênero apresentam colônias cremosas de aspecto liso ou rugoso, possuindo coloração branco/amarelada. Em microscópio essas células são globosas, ovaladas ou ovaladas alongadas tendo em média de 3 a 14 μm (LACAZ; PORTO; MELO, 1998).

De acordo com Gilfillan et al. (1998), *Candida* é um ascomiceto geralmente unicelular, porém existem algumas espécies que possuem capacidade de desenvolver hifas como as que podem ocorrer em infecções oportunistas. A patogenicidade das espécies do gênero *Candida* é atribuída ao dimorfismo, à aderência, a secreção de enzimas, a diversidade de genótipos e a variabilidade de antígenos, desta forma a candidíase é na maioria das vezes de origem endógena ocorrendo como consequência de um distúrbio imunológico do hospedeiro. Dentre as espécies deste gênero *Candida albicans* tem sido relatada como a mais prevalente em infecções no homem, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Além da importância para a saúde pública, o gênero *Candida* apresenta muitos outros interesses, sendo a indústria alimentícia uma das principais áreas de aplicação dessas leveduras, por exemplo: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são empregadas na produção de glutamato monossódico e ácido cítrico (OKI et al., 1971; PAZOUKI et al., 2000).

Dentre as espécies já estudadas para produção de eritritol, a levedura *Candida magnoliae* tem sido utilizada há décadas em processos biotecnológicos utilizando glicose. Algumas espécies de *Candida* foram descritas como ineficientes para produção de eritritol devido à alta formação de subprodutos (MIRONCZUK et al., 2010).

2.4.2 *Yarrowia lipolytica* e suas aplicações

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbica, pertencente ao reino Fungi, à classe dos Ascomycetos, subclasse Hemiascomycetos. Era conhecida e originalmente classificada como *Candida lipolytica*, posteriormente foi reclassificada como *Saccharomycopsis lipolytica* e hoje é conhecida como *Yarrowia lipolytica*. É uma espécie de levedura cuja pesquisa científica está em plena ascensão, por isso, tem sido um interessante objeto de estudo devido as várias lacunas hoje preenchidas sobre o seu metabolismo, o que tem atraído um grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de excretar diversos metabólitos de interesse (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Esta levedura apresenta dimorfismo, que se refere a capacidade que alguns fungos têm de crescerem em duas formas morfológicas distintas, geralmente como células ovais individuais ou como hifas filamentosas, sendo reversíveis entre as duas formas. Dependendo das condições ambientais e nutricionais pode crescer como célula oval, pseudo-hifa ou hifa septada. Fala-se que o dimorfismo desta levedura, assim como em outras espécies de leveduras, constitui um mecanismo de resposta a condições adversas como mudanças de temperatura ou condições nutricionais (KAWASSE et al., 2003).

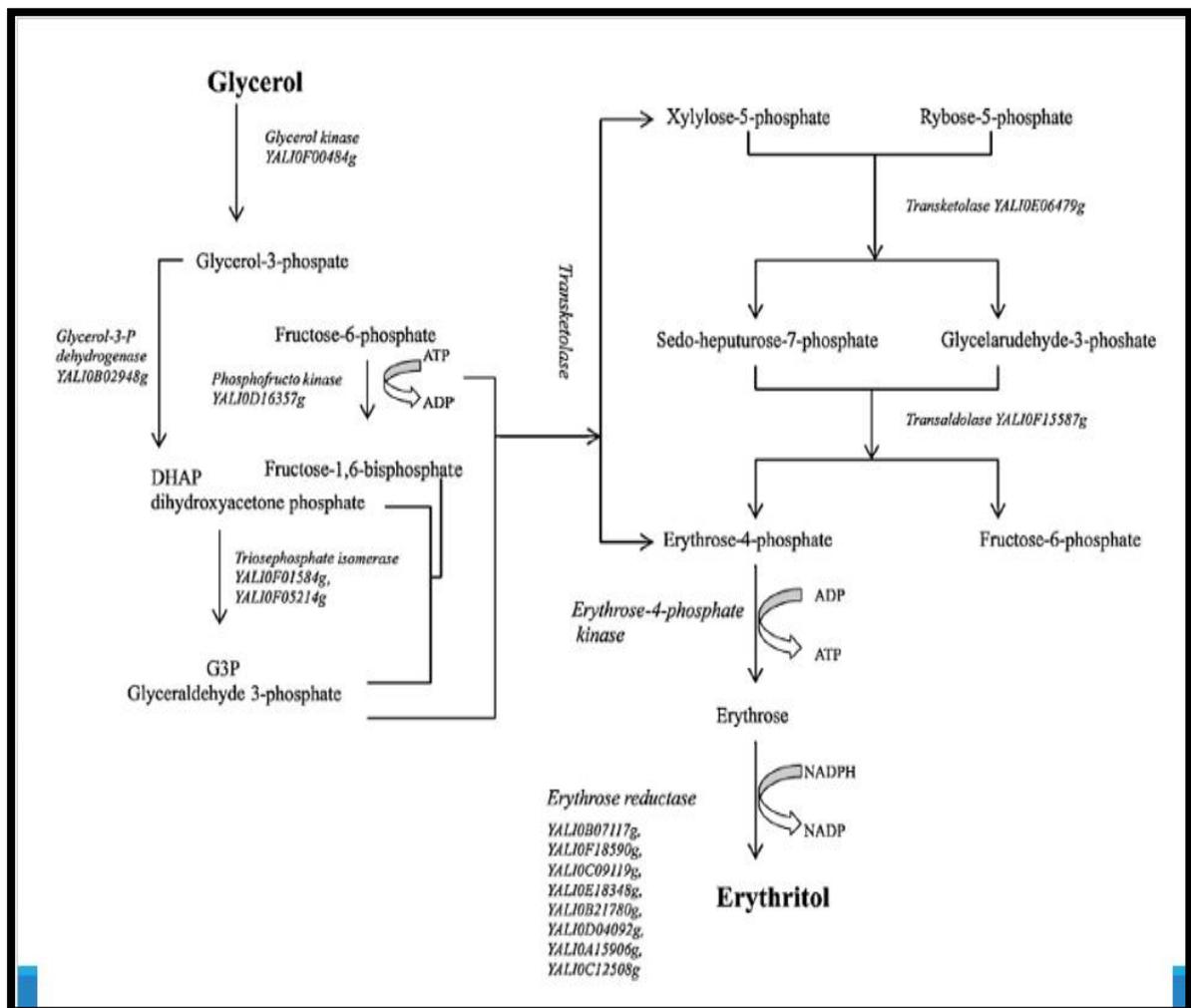
Possuem vigoroso crescimento em diferentes valores de pH, e exibem crescimento ótimo à 30°C embora sejam capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (BARTH; GAILLARDIN, 1997; FICKERS et al., 2004)

Muita atenção tem sido dada a capacidade que essa levedura possui metabolizar hidrocarbonetos e lipídeos, essa capacidade pode ser associada com seu habitat, pois possui

como nicho substratos ricos em lipídeos e proteínas, porém algumas espécies têm sido isoladas do solo, rede de tratamento de esgotos e ambientes contaminados com óleo (BARTH; GAILLARDIN, 1997; DOMINGUEZ et al., 2000).

Segundo Mironczuk et al. (2015), *Y. lipolytica* apresenta um grande potencial biotecnológico para produção de diversos metabólitos em grandes quantidades, como ácidos orgânicos, poliois, óleos, proteínas extracelulares e outros. Cepas de *Y. lipolytica* são capazes de transformar glicerol em eritritol e manitol (Figura 5), e, quando NaCl é adicionado ao meio de produção esse rendimento é aumentado, pois a pressão osmótica causada no processo fermentativo, desencadeia a produção de eritritol como uma forma de resposta ao estresse osmótico.

Figura 5 - Via de biossíntese de eritritol a partir de glicerol em *Yarrowia lipolytica* (MIRONKZUK et al., 2015).



Além disso, o glicerol também tem sido usado por *Y. lipolytica* como fonte de carbono para produção de biossurfactantes. Fontes (2008), utilizou glicerol bruto (proveniente da produção de biodiesel) como substrato para o crescimento celular e produção de biossurfactante e obteve resultados satisfatórios, com uma redução da tensão superficial de 22mN/m e um índice de emulsificação de 70,22%.

Y. lipolytica já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de microrganismos unicelulares, *flavour* de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como GRAS (*Generally Regarded As Safe*). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico. A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose) (NICAUD et al., 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, p. 5-48, 2012.

AOKI, Y. A. M. Transformação microbiana de sacarose e glicose em eritritol por *Trichosporonoides* sp. Tese apresentada a faculdade de engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1993.

BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.

Barth, G.; Gaillardin, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiol**, v 19, p. 219–237, 1997.

BAUCHART, D.; AUROUSSEAU, B.; AUCLAIR, E. Addition of sorbitol to a milk substitute for veal calves. – I. Effects on health, growth and feed conversion. **Reproduction Nutrition, Développement**, Paris, v. 25, n. 2, p. 339-410, 1985.

CANDIDO, L. M.; CAMPOS, A. M. Alimentos para fins especiais: dietéticos. **Livraria Varela**, São Paulo, 1996.

CALORIE CONTROL COUNCIL. **Polyols**. Disponível em: <http://www.polyol.org/> Acesso em 13 ago. 2015.

CHOI, J.; MOON, K.; RYU, Y.; SEO, J. Production of xylitol in cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 22, p. 1625- 1628, 2000.

CORTEZ, D. V. Influência dos Produtos de Degradação da Lignina na Bioconversão de Xilose em Xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 39, p. 217-226, 2012

DOMÍNGUEZ, A., DEIVE, F.J., SANROMÁN, M. A. e LONGO, M.A. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Technol. Biotechnol.** v. 78, p. 1166–1170, 2000.

ELBERT, G.; TOLABA, M.P.; SUÁREZ, C. Effects of drying conditions on head rice yield and browning index of parboiled rice. **J. Food Eng.**, Kidlington, v.47, p.37-41, 2001.

ERKAMOVA, I. T.; MORGUNOV, I. G. Pathways of glycerol metabolism in *Yarrowia (Candida) lipolytica* yeasts. **Mikrobiologiya**, v.51, p. 533-537; 1987.

FARIA, L. H. G. B. Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo. 2002. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FICKERS, P.; BENETTI P. H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S. e NICAUD, J. M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 527–543, 2004.

FONTES, G. C. Produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (2008).

GEAY, Y.; RICHET, E.; THIVEND, P. Effects of feeding sorbitol associated with diferente sources and amounts of nitrogen on growth, digestion and metabolism in Young bulls. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 36, n. 3-4, p. 255-273, 1992.

GILFILLAN, G. D.; SULIVAN, D. J.; HAYNES, K.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, Dublin, v. 144, p. 829-838, 1998.

GOMES, R. C.; VISSOTO, Z. F.; FADINI, L. A.; FARIA, V. E.; LUIZ, M. A. Influence of diferente bulk agents in the rheological and sensory characteristics of diet and light chocolate. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 614-623, 2007.

GRIFFIN, W.C.; LYNCH, M. J. Polyhydric alcohols. In FURIA, T. E. (Ed.). **CRC Handbook of food additives**, Cleveland, 2. Ed, v. 1, p. 431–455, 1972.

INÁCIO, J.; PEREIRA, P.; DE CARVALHO, M.; FONCECA, À. Estimation and diversity of phyloplane microbiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 344-353, 2002.

JACQUES, N., CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **Introduce Journal Food Microbiology**, v. 126, p. 321-326, 2008

KAWASSE, F.M., AMARAL, P.F., ROCHA-LEÃO, M.H., AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C., COELHO, M.A. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. **Bioprocess Biosyst**, v. 25, p. 371-385, 2003.

KHAN, A.; BHIDE, A.; GADRE, R. Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. **Bioresource Technol**, v. 68, p. 4911-4913, 2009.

KUSSEROW, B.; SCHIMPF, S.; CLAUS, P. Hydrogenation of glucose to sorbitol over nickel and ruthenium catalysts. **Adv Synth Catal**, v. 345, n 1-2, p. 289-299, 2003.

KURTZMAN, C. P. Molecular taxonomy of the Yeasts. **Yeast**, New York, v. 10 p. 1727-1740, 1994.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MELO, N. T. Guia para a identificação de fungos actinomicetos algas de interesse médico. **Sarvier**, São Paulo, p. 445, 1998.

LE, A.S.; MULDERING, K.B. Sorbitol and mannitol. In: NABORS, L.O'B.; GELARDI, R.C., eds. Alternative sweeteners. **Food science and technology**, New York: Marcel Dekker, v. 2, p. 34-41, 2001

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme Microb Tech**, v. 41, n. 3, p. 292-295, 2007.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technol**, v. 101, p. 2351-2358, 2010.

MIRONEZUK, A. M.; FURGALA, J.; RAKICKA, M.; RYMOWIEZ, W. Enhanced production of erythritol by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated batch cultures. **Biotchnology Methods**. v. 41, p. 57-64, 2014.

MIRONEZUK, A. M.; FURGALA, J.; RAKICKA, M.; RYMOWIEZ, W. New isolated mutante of *Yarrowia lipolytica* MK1 as a proper host for eficiente eruthritol biosyntheses from glycerol. **Process Biochemistry**, p. 61-68, 2015.

NABORS, L.O'B. Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 7, p. 28-34, 2002.

NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; BROEK, P.V.D; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P. e GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, **FEMS Yeast Research**, v. 2(3), p. 371-379, 2002.

OKI, T.; FUKISAWA-SHI, YASHIROSHI, SAYAMA, Y.; TAKEMI, H. Process for production L-glutamic acid by fermentation. **United States Patent Office**, 1971.

PAHFF, H. J., MILLER, M. W., MRAK, E. M. The life of Yeasts. **Harvard University Press**, Cambridge London, n. 2, 1978.

PAZOUKI, M.; FELSE, P. A.; SINHA, J.; PANDA, T. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. **Bioprocess engineering**, New York, v. 22, p. 356-391, 2001.

RODRIGUES, R. C. L. B. Influência da Disponibilidade de O₂ no Processo Descontínuo de Obtenção de Xilitol em Hidrolisado de Bagaço de Cana. **WorldCat**, São Paulo, 2005.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fedbatch cultures of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol Lett**, Poland, v. 3, p. 377-389, 2009.

SILVA, A. B.; OLIVEIRA, D. S. Investigação de leveduras de ocorrência ambiental com o potencial metabólico de consumo do glicerol bruto derivado da produção de biodiesel e caracterização dos produtos gerados. Dissertação e Tese (Biologia celular e Molecular). Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica. Rio Grande do Sul, 2013.

TOMASZEWAK, L.; RYWINSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Production of erithritol and manitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, Poland, v. 39, p. 1333-1343, 2012.

TOMASZEWAK, L.; RAKICKA, M.; RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A. A comparative study on glycerol metabolismo to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, Poland, p. 966-976, 2014.

TOMASZEWAK, L.; M. RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A. Mineral supplementation increases erythrose reductase activit in erithritol biosynthesis from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, Poland, p. 3069-3078, 2013.

SCHIFFMAN, S.S.; BOOTH, B.J.; LOSEE, M.L.; PECORE, S.D.; WARWICK, Z.S. Bitterness of sweeteners as a function of concentration. **Brain Res. Bull.**, Lausanne, v. 36, n. 5, p. 505-513, 1995.

SCHIFFMAN, S.S.; BOOTH, B.J.; CARR, B.T.; LOSEE, M.L.; SATTELYMILLER, E.A.A.; GRAHAM, B.G. Investigation of synergism: in binary mixtures of sweeteners. **Brain Res. Bull.**, Lausanne, v. 38, n. 2, p. 105-120, 2001.

SERAFINI, A.; BARROS, M. N; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria. **EDUCS**, Caxias do Sul, p .45-46, 2002.

TALJA, R. A., ROOS, Y. H. Phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. **Thermochemica Acta**, v. 380, n. 214, p. 109-121, 2001.

VAN VELTHUIJSEN, J.A.; BLANKERS, I.H. Lactitol: a new reduced-calorie sweetener. In: NABORS, L.O'B.; GELARDI, R.C., eds. **Alternative sweeteners**, New York: Marcel Dekker, n. 2, p. 68-82, 2001.

WANKENNE, A.M.; WANKENNE, P. J.; FANI, M.; OLIVEIRA, R.; SANTOS, M. S. Poliois: Metabolismo e Aplicações. **Aditivos e Ingredientes**, São Paulo, Ed. Insumos, p. 46-55, 2013

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

WISSELINK, H. W.; WEUSTHUIS, R. A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. J. Manitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 151-161, 2002.

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v. 25, p. 159-160, 1979.

ZORN, H.; CZERMAK, P. Biotchnology of food and feed additives. **Adv Biochem Eng Biotechnol**. p. 1-28, July 2013. Disponível em:

https://books.google.com.br/books?id=GeQkBAAAQBAJ&pg=PA6&dq=eritritol+e+Moniliella+pollinis&hl=ptR&sa=X&ved=0CEgQ6AEwBmoVChMIhI3F_YKwxwIVC4iQCh2kiAO4#v=onepage&q=eritritol%20e%20Moniliella%20pollinis&f=false

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE ERITRITOL POR LEVEDURAS CULTIVADAS EM MEIO CONTENDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

RESUMO

Eritritol é um poliol encontrado naturalmente em frutas, cogumelos, algas e em alguns alimentos fermentados. Possui muitas características físico-químicas que o tornam um produto de alto valor agregado, pois possui um elevado poder adoçante, não é metabolizado pela microbiota bucal evitando assim o desenvolvimento de cáries, é um produto de baixas calorias, o que o torna recomendável para pessoas com doenças relacionadas ao consumo excessivo de açúcar. Neste estudo foram testadas a capacidade de trinta e duas leveduras, pertencentes a coleção de culturas da Microbiologia Agrícola CCMA, de produzirem eritritol em meio contendo 100 g/L de glicerol ou glicose como fontes de carbono. Das leveduras testadas, *Candida rugosa* CCMA 0371 e duas cepas de *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 E CCMA 0357 apresentaram a maior produção de eritritol com $10,6987 \text{ g/L} \pm 0,01$, $5,1894 \text{ g/L} \pm 0,58$ e $4,6039 \text{ g/L} \pm 0,63$ respectivamente. Foi observado um maior número de leveduras que apresentaram viabilidade em glicerol do que em glicose. Observou-se a presença de outros polióis como manitol e arabitol. Pode-se destacar que essas leveduras apresentam potencial para produção de eritritol em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Palavras-chave: Eritritol. Manitol. Arabitol. Glicerol. Glicose.

ABSTRACT

Erythritol is a polyol found naturally in fruits, mushrooms, algae and some fermented foods. It has many physico-chemical characteristics that make it a product of high added value, because it has a high sweetening power, it is not metabolized by the oral microbiota thus avoiding the development of caries, it is a low calorie product, which makes it recommendable for people With diseases related to excessive consumption of sugar. In this study, the capacity of thirty-two yeasts belonging to the CCMA Agricultural Microbiology cultures collection to produce erythritol in medium containing 100 g / L of glycerol or glucose as carbon sources were tested. Of the yeasts tested, *Candida rugosa* CCMA 0371 and two strains of *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 and CCMA 0357 showed the highest production of erythritol with $10.6987 \text{ g / L} \pm 0.01$, $5.1894 \text{ g / L} \pm 0.58$ and $4, 6039 \text{ g / L} \pm 0.63$ respectively. A greater number of yeasts were observed that showed viability in glycerol than in glucose. The presence of other polyols such as mannitol and arabitol was observed. It is possible to emphasize that these yeasts present potential for the production of erythritol in medium containing glycerol as carbon source

Keywords: Erythritol. Mannitol. Arabitol. Glycerol. Glucose.

1 INTRODUÇÃO

Os polióis integram um grupo de carboidratos de digestão lenta derivados da hidrogenação de sua fonte de açúcar ou xarope. Um poliól é um álcool que contém múltiplos grupos hidroxila, são amplamente utilizados em indústrias químicas e de alimentos. Nas indústrias alimentícias esses edulcorantes possuem sabor agradável e vantagens excelentes. Os principais polióis para esses fins são: o manitol, o xilitol, o eritritol, o isomalte, o lactitol, o sorbitol e hidrolisados de amido hidrogenado (BAUCHART; AUROUSSEAU; AUCLAIR, 1985; GEAY; RICHET; THIVEND, 1992)

O eritritol é um açúcar utilizado como aditivo alimentar, no Brasil produtos com eritritol já se encontram disponíveis no mercado na área de comestíveis. Também conhecido por eritrol, eritoglucina ou eritromanite, este poliálcool encontra-se naturalmente presente em alguns frutos e alimentos fermentados. Industrialmente eritritol é produzido por processos biotecnológicos utilizando substratos como glicose e sacarose (RAKICKA et al., 2016; WANKENNE et al., 2013)

A importância econômica e social do eritritol que o insere como produto de alto valor agregado, está em seu alto poder adoçante, seu baixo teor calórico, sua propriedade anticariogênica e seu metabolismo insulina-dependente que garantem sua aplicação nas indústrias alimentícias (AOKI, 1993; WANKENNE et al., 2013)

O eritritol é provavelmente o açúcar álcool melhor tolerado, existem poucos testes em humanos, mas estes, mostram que aumentando-se gradualmente a quantidade consumida em doses espalhadas ao longo do dia, a maior parte das pessoas podem tolerar grandes quantidades de eritritol sem desconforto (KROGER; MEISTER; KAVA, 2006)

Do ponto de vista químico, o eritritol é um sólido cristalino de cor branca, tem doçura semelhante à da sacarose, cerca de 60 à 70%, entretanto, não é calórico e apresenta sabor refrescante. É muito solúvel em água e possui elevada estabilidade térmica e química o que o torna resistente em meio ácido e alcalino podendo se manter estável por longos períodos (WANKENNE et al., 2013).

No corpo humano a maior parte do eritritol ingerido é absorvido pela corrente sanguínea no intestino delgado e excretado pelo trato urinário, como a maior parte não entra no intestino grosso, normalmente não ocorrem efeitos laxativos (TOMASZEWAK; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2012).

Processos fermentativos têm sido relatados para promover a formação de diferentes polióis utilizando leveduras osmofílicas e fontes de carbono como glicose e glicerol. O glicerol é uma molécula abundante e de composição simples podendo ser absorvida pela célula microbiana através de difusão facilitada. Alguns microrganismos são descritos pela literatura como sendo capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono, podendo convertê-lo a diferentes intermediários metabólicos (DUARTE et al., 2003).

Este estudo teve por objetivo avaliar o crescimento de trinta e duas leveduras pertencentes a Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola CCMA em meio contendo glicose e glicerol e avaliar a capacidade que essas leveduras possuem de utilizar essas fontes de carbono para produção de eritritol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram trinta e duas linhagens de leveduras provenientes da coleção de culturas da Microbiologia Agrícola CCMA. As linhagens estudadas encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Leveduras obtidas junto a Coleção de culturas da Microbiologia Agrícola CCMA utilizadas no teste para crescimento em glicerol puro e glicose e avaliação da produção de poliois com seus respectivos códigos e origem de coleta.

Código	Espécie	Origem
CCMA 0040	<i>Candida sojae</i>	Solo seco
CCMA 0034	<i>Lindnera saturnus</i>	Solo cerrado
CCMA 0077	<i>Debaromyces pseudopolinaphus</i>	Solo cerrado
CCMA 0377	<i>Candida frijolensis</i>	Solo cerrado
CCMA 0029	<i>Trichosporon loubieri</i>	Solo seco
CCMA 0020	<i>Candida tropicalis</i>	Solo úmido
CCMA 0200	<i>Saccharomyces cerevisae</i>	Cana-de-açúcar
CCMA 0486	<i>Candida glabatra</i>	Grão de café
CCMA 0051	<i>Pichia kudriavzeir</i>	Silagem da cana
CCMA 0378	<i>Candida ethanolica</i>	Bebida indígena Tarubá
CCMA 0141	<i>Debaromyces polymorphus</i>	Solo cerrado
CCMA 0384	<i>Candida paralopsis</i>	Kefir (leite)
CCMA 0035	<i>Debaromyces hansenii</i>	Solo seco
CCMA 0382	<i>Pichia sp.</i>	Cacau
CCMA 0465	<i>Pichia fermentans</i>	Grão de café (processamento úmido)
CCMA 0371	<i>Candida rugosa</i>	Bebida indígena Tarubá
CCMA 0468	<i>Debaromyces hansenii</i>	Grão de café
CCMA 0026	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Solo úmido
CCMA 0023	<i>Candida neerlandica</i>	Solo úmido

CCMA 0027	<i>Candida labiduridarum</i>	Solo úmido
CCMA 0019	<i>Pichia guilhermondi</i>	Bebida indígena
CCMA 0045	<i>Debaromyces etchellsii</i>	Silagem de cana
CCMA 0037	<i>Cryptococcus flavecens</i>	Solo seco
CCMA 0022	<i>Candida tetragidarum</i>	Solo úmido
CCMA 0016	<i>Pichia membranifaciens</i>	Bebida indígena Caxiri
CCMA 0043	<i>Candida glabrata</i>	Solo seco
CCMA 0047	<i>Candida ortolopsis</i>	Solo cerrado
CCMA 0038	<i>Candida railensis</i>	Solo cerrado
CCMA 0024	<i>Candida glabrata</i>	Solo úmido
CCMA 0379	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Bebida indígena
CCMA 0242	<i>Yarrowia lipolytica 25</i>	Kefir
CCMA 0357	<i>Yarrowia lipolytica 9.4</i>	Solo Amazônia

Todos os microrganismos foram inicialmente reativados transferindo-se 200 μ do estoque para tubos de ensaio contendo 2 mL de meio de cultivo YEPG (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose) por 24 horas em temperatura de 28 °C e agitação de 120 rpm.

2.2 Meios de cultivo, condições e preparo do inóculo

O meio de cultivo utilizado para produção de eritritol foi composto por, em g/L: glicose 100 ou glicerol puro 100; NH₄Cl, 2,0; KH₂PO₄, 0,2; MgSO₄ . 7H₂O, 1,0; extrato de levedura, 1,0; NaCl 2,5; Água de torneira (TOMASZEWAK; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2012).

Na realização do experimento em glicose ou glicerol puro, foi inoculada uma população de 10⁸ cél/mL em frascos de 500 mL contendo 120 mL de meio de cultivo acima mencionado, que foi submetido a agitação de 240 rpm, a 28°C, pH 5,0, por 12 dias. O crescimento das leveduras foi monitorado pela contagem de células em câmara de Neubauer e medida da densidade óptica em leitor de microplacas (Multiskan FC – Thermo Scientific) à 595 nm a cada 24 horas.

A biomassa foi analisada gravimetricamente após secagem em um secador à 75 °C até

obtenção de um peso constante.

A cada 24h foram retirados 1 mL de amostra para posterior análise em HPLC para avaliação da produção de polióis e consumo de glicose e glicerol, o experimento foi realizado em triplicata.

Os tempos finais de cada levedura que apresentou viabilidade após 24 horas de fermentação foram analisados em HPLC.

2.3 Métodos analíticos

A análise do consumo de glicerol, glicose e produção de eritritol, manitol, maltitol, dulcitol, sorbitol, arabitol, ribitol e xilitol foram mensuradas por HPLC. As amostras do cultivo foram centrifugadas por 10 min, à 4°C, à 5500 rpm e filtradas a 0,22 µm para separação do sobrenadante.

No sobrenadante, a análise da presença de polióis foi realizada em HPLC – Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp.,Japan), equipado com sistema duplo de detecção constituído por detector UV (SPD + 10Ai) e detector de índice de refração (RID – 10A). Uma coluna SCR 101H com respectiva pré-coluna e fase móvel de água MilliQ com pH ajustado para 2,1 com 20 mM de ácido perclórico, foi utilizada. Foram injetados 20µL da amostra com fluxo de 0,6 mL/min, e detecção feita por UV visível 210 nm e temperatura à 65 °C (TOMASZEWAK; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2012).

A quantificação de glicerol, glicose e polióis presentes nas amostras, foi realizada através de curvas padrões com os mesmos P.A. A identificação foi feita pela comparação de seus tempos de retenção.

2.4 Parâmetros de produção

Parâmetros de produção tais como o rendimento de eritritol a partir do consumo de glicerol (YP/S), fator de conversão de glicerol (YX/S), rendimento de eritritol em relação a biomassa formada (YP/X), e a produtividade volumétrica de eritritol (QE), foram analisados e determinados. As equações utilizadas nos cálculos seguem abaixo:

$$Y_{P/S} = \frac{P_E}{S_0 - S_f}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_E}{X_f - X_0}$$

$$Q_E = \frac{P_E}{t_f}$$

Onde,

P_E : concentração de eritritol no tempo t_f (g/L); S_f : concentração do substrato glicerol no tempo t_f (g/L); S_0 : concentração inicial de substrato no tempo t_0 (g/L); t_f : tempo de fermentação (h); X_f : concentração celular no tempo de fermentação t_f (g/L); X_0 : concentração inicial celular no tempo t igual a zero (g/L); V : volume inicial da cultura líquida (L).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de Leveduras

Foi observado que das trinta e duas leveduras testadas apenas 9 permaneceram viáveis durante os 12 dias de fermentação quando o meio foi acrescido de glicose, já em glicerol puro, 24 leveduras apresentaram viabilidade até o tempo final de fermentação de 12 dias (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de absorbância (595 nm) durante crescimento das trinta e duas leveduras em glicerol puro e glicose ao longo de 12 dias de fermentação.

Código	Espécie	Glicose	Glicerol Puro
CCMA 0040	<i>Candida sojae</i>	0,9163 ± 0,001 (T2)	1,7206 ± 0,008 (T12)
CCMA 0034	<i>Lindnera saturnus</i>	1,7794 ± 0,017 (T6)	1,8203 ± 0,005 (T12)
CCMA 0077	<i>Debaromyces pseudopolinaphus</i>	2,6066 ± 0,005 (T9)	0,5194 ± 0,003 (T6)
CCMA 0377	<i>Candida frijolensis</i>	0,2076 ± 0,006 (T1)	2,1795 ± 0,068 (T12)
CCMA 0029	<i>Trichosporon loubieri</i>	2,7201 ± 0,007 (T11)	1,4456 ± 0,003 (T12)
CCMA 0020	<i>Candida tropicalis</i>	1,0326 ± 0,002 (T1)	2,1503 ± 0,023 (T12)
CCMA 0200	<i>Saccharomyces cerevisae</i>	2,3076 ± 0,006 (T12)	1,7695 ± 0,018 (T12)
CCMA 0486	<i>Candida glabrata</i>	0,4810 ± 0,001 (T1)	1,7677 ± 0,002 (T12)
CCMA 0051	<i>Pichia kudriavzeir</i>	2,4330 ± 0,007 (T12)	2,3604 ± 0,001 (T12)
CCMA 0378	<i>Candida ethanolica</i>	2,5132 ± 0,006 (T12)	2,2589 ± 0,007 (T12)
CCMA 0141	<i>Debaromyces polimorphus</i>	2,3243 ± 0,007 (T12)	2,2427 ± 0,006 (T12)

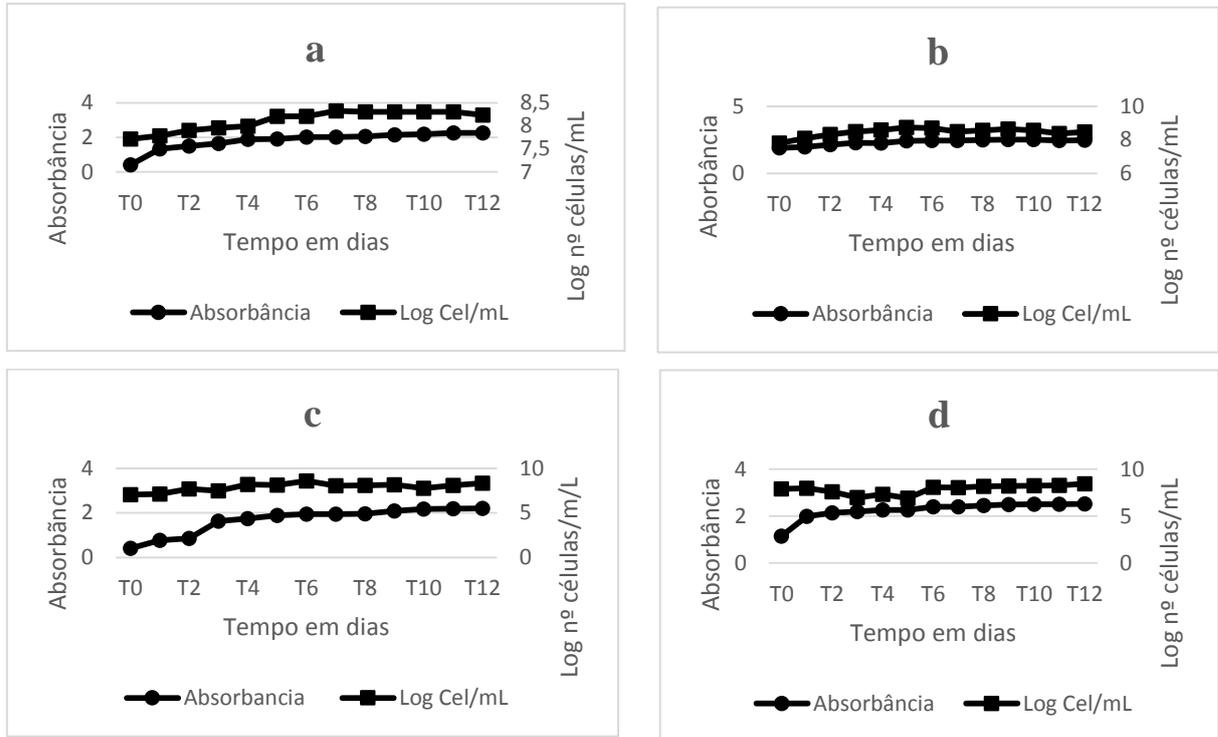
CCMA 0384	<i>Candida paralopsis</i>	2,4594 ± 0,007 (T12)	2,3387 ± 0,004 (T12)
CCMA 0035	<i>Debaromyces hansenii</i>	2,2938 ± 0,102 (T12)	2,008 ± 0,007 (T4)
CCMA 0382	<i>Pichia sp.</i>	2,2222 ± 0,006 (T7)	2,2288 ± 0,002 (T12)
CCMA 0465	<i>Pichia fermentans</i>	0,5698 ± 0,001 (T1)	2,3367 ± 0,004 (T12)
CCMA 0371	<i>Candida rugosa</i>	2,4592 ± 0,009 (T12)	2,2649 ± 0,004 (T12)
CCMA 0468	<i>Debaromyces hansenii</i>	1,9980 ± 0,016 (T4)	2,2856 ± 0,001 (T12)
CCMA 0026	<i>Pichia kudriavzevii</i>	2,4880 ± 0,010 (T8)	1,9878 ± 0,003 (T3)
CCMA 0023	<i>Candida neerlandica</i>	2,3755 ± 0,012 (T8)	2,1484 ± 0,001 (T5)
CCMA 0027	<i>Candida labiduridarum</i>	0,9785 ± 0,010 (T1)	2,4186 ± 0,002 (T12)
CCMA 0019	<i>Pichia guilhermondii</i>	1,8915 ± 0,092 (T7)	2,3672 ± 0,005 (T12)
CCMA 0045	<i>Debaromyces etchellsii</i>	1,9851 ± 0,020 (T9)	2,2781 ± 0,003 (T12)
CCMA 0037	<i>Cryptococcus flarescens</i>	1,7803 ± 0,007 (T9)	2,4381 ± 0,002 (T12)
CCMA 0022	<i>Candida tetrigidarum</i>	0,9854 ± 0,008 (T1)	2,0844 ± 0,028 (T12)
CCMA 0016	<i>Pichia membranifaciens</i>	1,7802 ± 0,008 (T6)	2,2185 ± 0,001 (T12)
CCMA 0043	<i>Candida glabrata</i>	1,2014 ± 0,001 (T2)	2,2964 ± 0,010 (T12)
CCMA 0047	<i>Candida ortolopsis</i>	2,3142 ± 0,005 (T10)	1,9240 ± 0,005 (T3)
CCMA 0038	<i>Candida railensis</i>	1,0231 ± 0,001 (T2)	2,2809 ± 0,004 (T12)
CCMA 0024	<i>Candida glabrata</i>	0,6871 ± 0,020 (T2)	2,0721 ± 0,017 (T12)

CCMA 0379	<i>Pchia kudriavzevii</i>	1,8449 ± 0,007 (T11)	1,7755 ± 0,003 (T7)
CCMA 0242	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2,5362 ± 0,011 (T12)	2,3274 ± 0,004 (T12)
CCMA 0357	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2,3018 ± 0,008 (T12)	2,27964 ± 0,005 (T12)

As leveduras que apresentaram maior produção de eritritol foram *Candida rugosa* CCMA 0371 e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242, em meio contendo glicerol puro como fonte de carbono (Tabela 2). Os valores de absorvância foram de $2,2649 \pm 0,004$ e $2,27964 \pm 0,005$, respectivamente, em glicerol puro. Ambas leveduras sobreviveram os 12 dias de fermentação tanto em glicerol puro como em glicose, e apresentaram crescimento celular semelhante, apresentando valores entre 8 e 9 Log cel/mL após 12 dias de fermentação (Figura 1). Tanto o glicerol puro como a glicose possibilitaram o crescimento celular das leveduras ao longo do período de incubação atingindo a fase estacionária após 24 horas para a maioria das leveduras (Figura 1).

As leveduras *Candida frijolensis* CCMA 0377, *C. tropicalis* CCMA 0020, *C. glabrata* CCMA 0486, *C. labiduridarum* CCMA 0027, *C. tetragidarum* CCMA 0022 e *Pichia fermentans* CCMA 0465, não sobreviveram as primeiras 24 horas de incubação quando o meio foi acrescido de glicose, o mesmo não foi observado em relação ao glicerol, já que todas as trinta e duas leveduras testadas sobreviveram mais do que 24 horas (Tabela 2).

Figura 1 Crescimento das leveduras (a) *Candida rugosa* CCMA 0371 em glicerol puro e (b) glicose, e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 em (a) glicerol puro e (b) glicose.



3.2 Produção de Polióis

Com relação a produção de eritritol, as leveduras que apresentaram maior produção foram *Candida rugosa* CCMA 0371 e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242, que após 12 dias de fermentação apresentaram uma produção de 10,6987 e 5,1894 g/L de eritritol respectivamente. Essas mesmas leveduras apresentaram níveis mínimos de eritritol quando o meio possuía glicose como fonte de carbono (Tabela 3). Pode-se relacionar a produção de eritritol com o tamanho da população, uma vez que a maior produção foi observada na maior população de leveduras. Na menor população também foi encontrada menor produção (Figura 2).

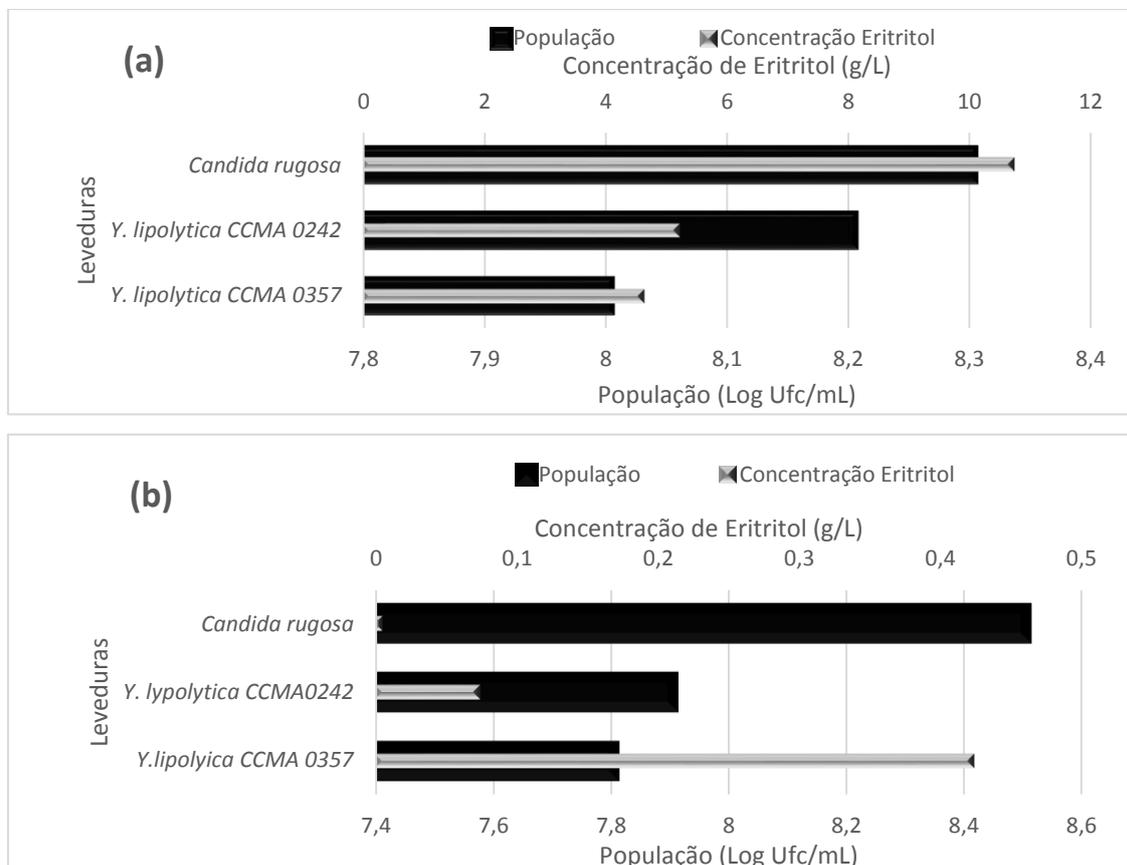
Tabela 3 - Comparação da produção de açúcares álcoois pelas leveduras *Candida rugosa* CCMA 0371, *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0357 em glicerol puro e glicose.

Espécie	Tempo (dias)	Biomassa (g l⁻¹)	Eritritol (g l⁻¹)	Manitol (g l⁻¹)	Arabitol (g l⁻¹)
Glicerol Puro					
<i>Candida rugosa</i> 0371	12	8,1	10,6987	8,3655	3,9588
<i>Yarrowia lipolytica</i> 0242	12	6,5	5,1894	5,0205	0,0359
<i>Yarrowia lipolytica</i> 0357	12	7,0	4,6039	8,4743	3,4813
Glicose					
<i>Candida rugosa</i> 0371	12	9,0	0,0034	ND	5,1923
<i>Yarrowia lipolytica</i> 0242	12	7,4	0,0725	ND	0,0471
<i>Yarrowia lipolytica</i> 0357	12	8,0	0,4225	7,5674	2,4927

❖ ND – Nada Detectado

No experimento de Tomaszewak, Riwisnka e Gladkowski (2012) foram analisadas nove estirpes de *Yarrowia lipolytica* quanto a sua capacidade de produzir eritritol em meio contendo 100 g/L de glicerol durante dez dias de fermentação. Para essas nove estirpes testadas a concentração de biomassa variou entre elas de 5,8 g/L a 10,5 g/L. Foi observada a produção de eritritol para todas as estirpes investigadas, essa produção variou com concentrações de 20,0 a 35,5 g/L para a melhor produtora, o que corresponde a rendimentos variando de 0,33 a 0,42 g/L. No presente estudo, a biomassa produzida utilizando glicerol puro como fonte de carbono variou de 6,5 a 8,1 g/L para as três leveduras que apresentaram maior concentração de eritritol produzido e a produção de eritritol variou entre concentrações de 4,6039 a 10,6987 g/L. Nesse mesmo experimento de Tomaszewak, Riwisnka e Gladkowski (2012), também foram detectadas a presença de manitol e arabitol ao final do processo, porém em concentrações que variaram de 0,2 a 2,63 g/L de manitol produzido, e 0,3 a 2,43 g/L de arabitol produzido. No presente trabalho foram geradas grandes concentrações de manitol variando de 5,0205 a 8,4743 g/L, e também de arabitol variando de 3,4813 a 3,9588 para as três leveduras que apresentaram maior produção de eritritol.

Figura 2 - Concentração de Eritritol produzido pelas leveduras *Candida rugosa* CCMA 0371 e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 em meio de crescimento contendo (a) Glicerol Puro e (b) Glicose após 12 dias de fermentação.



Existem muitos estudos que abordam a produção de eritritol por via fermentativa fazendo uso de diversas cepas da levedura *Yarrowia lipolytica* mutadas ou não, utilizando glicerol como fonte de carbono. Já se tem conhecimento de muitas estratégias adotadas para se conseguir uma alta produção deste poliól desde a utilização de salinidade para que seja causado um estresse osmótico, até diferentes processos como bateladas e bateladas alimentadas. A salinidade é um dos fatores que afetam o crescimento de microrganismos, pois induzem alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas para que os microrganismos tenham capacidade de responder a esse estresse. Uma das respostas mais observadas é o acúmulo intracelular de polióis como arabitol, manitol e eritritol. Neste estudo foram observadas a presença de arabitol e manitol, além de eritritol (MIRONKZUC et al., 2014; RYMOWICZ; RYWINSKA; MARCINKIEWICZ, 2009; TOMASZEWAK; RYWINSKA; GLADKOWSKI, 2012).

Em seus estudos Kim et al. (1999), observaram que para produção de eritritol a partir de glicose utilizando *Torula sp.* em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de NaCl e KCL o crescimento celular e o consumo de glicose diminuíram quando a concentração aumentou de 0,0 para 0,5 M. A medida em que aumentou-se a pressão osmótica o rendimento de eritritol também aumentou independente da fonte salina utilizada, sendo o rendimento de eritritol em torno de 49% na osmolalidade de 2,4 g/L.

Rakicka et al. (2016) avaliou a produção de eritritol pela cepa da levedura *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 em glicerol puro e bruto, utilizando diferentes fontes de nitrogênio. A maior produção de eritritol foi de 103,4 g/L com um rendimento de 0,52 g/g, utilizando uma fonte inorgânica de azoto (4,6 g/L de sulfato de amônia). No presente trabalho foi encontrado um rendimento de 0,14 g/g de eritritol em relação ao glicerol consumido.

O eritritol é um poliól produzido em processos biotecnológicos utilizando leveduras osmofílicas, algumas espécies como *Trichosporonoides sp*, *Monilella sp*, *Candida magnoliae* são conhecidas por apresentarem boa produção de eritritol em meio utilizando glicose como fonte de carbono (RYMOWICZ; RYWINSKA; MARCINKIEWICZ, 2009). Neste trabalho a levedura *Candida rugosa* CCMA 0242 apresentou a melhor produção de eritritol em meio com glicerol, e não em glicose.

Uma estirpe de levedura pertencente a espécie *Pseudozyma tsukubaensis* cultivada aerobicamente em um meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono, produziu 245 g/L de eritritol, o que corresponde a uma produção de 2,86 g/L/h e um rendimento de 61 % (JEYA et al., 2009).

Neste trabalho, verificou-se que a produção obtida foi de $10,6987 \pm 0,73$ de eritritol com rendimento de eritritol em relação ao glicerol consumido (YP/S) de 0,14 para *Candida rugosa* CCMA 0371, e a produção para *Yarrowia lipolytica* 25 CCMA 0242 foi de $5,1894 \pm 0,58$ com rendimento de eritritol em relação ao glicerol consumido (YP/S) de 0,08 (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos no ponto de máxima produção de eritritol (12 dias) por *Candida rugosa* CCMA 0371 e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242

	PE (g/L)	QE (g/L.h)	YP/S (g/g)	YP/X (g/g)	YX/S (g/g)
<i>Candida rugosa</i> CCMA 0371	10,6987 ± 0,73	0,037	0,14	0,24	0,55
<i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0242	5,1894 ± 0,58	0,018	0,08	0,37	0,23

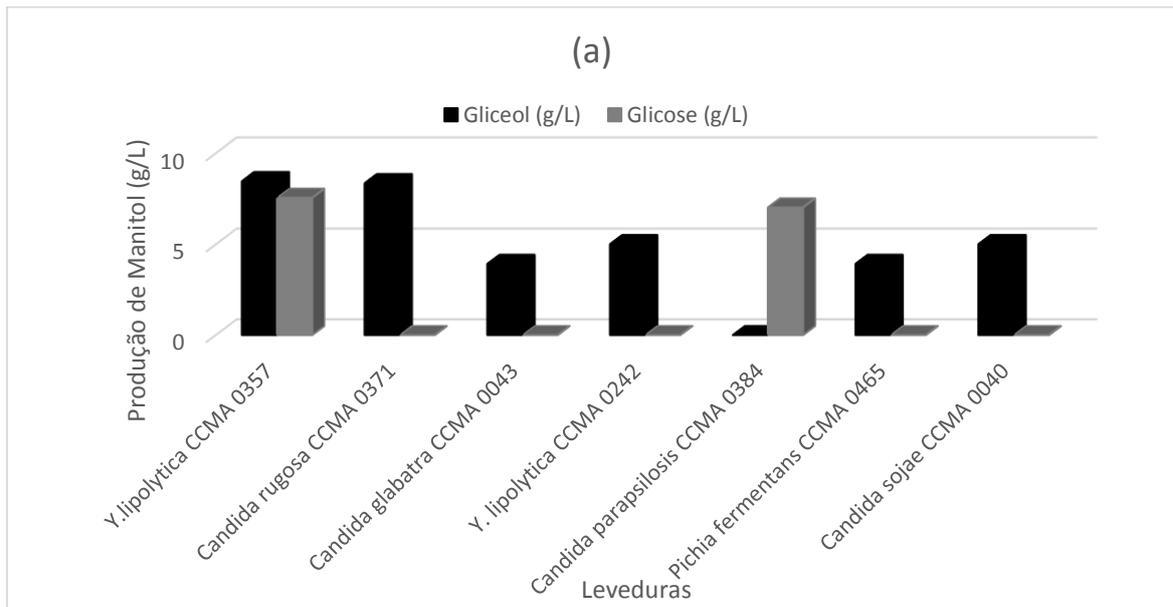
No trabalho de Savergave et al. (2011), foram gerados mutantes de *Candida magnoliae* a partir de ultravioleta e mutagênese química com o objetivo de obter-se um maior rendimento de eritritol. A glicose e o extrato de levedura foram identificados como sendo componentes determinantes para a produção de polióis produzidos, especialmente eritritol e manitol. Eles observaram que a composição ótima do meio para produção de eritritol possuía glicose (238 g/L) e extrato de levedura (9,2 g/L) e concluíram que a levedura foi capaz de produzir 87,8 g/L de eritritol em processos de batelada alimentada com um rendimento de 31,1 %, sendo que um dos mutantes designados como R23 foi capaz de produzir 60,3 g/L em comparação com 14 g/L da estirpe progenitora.

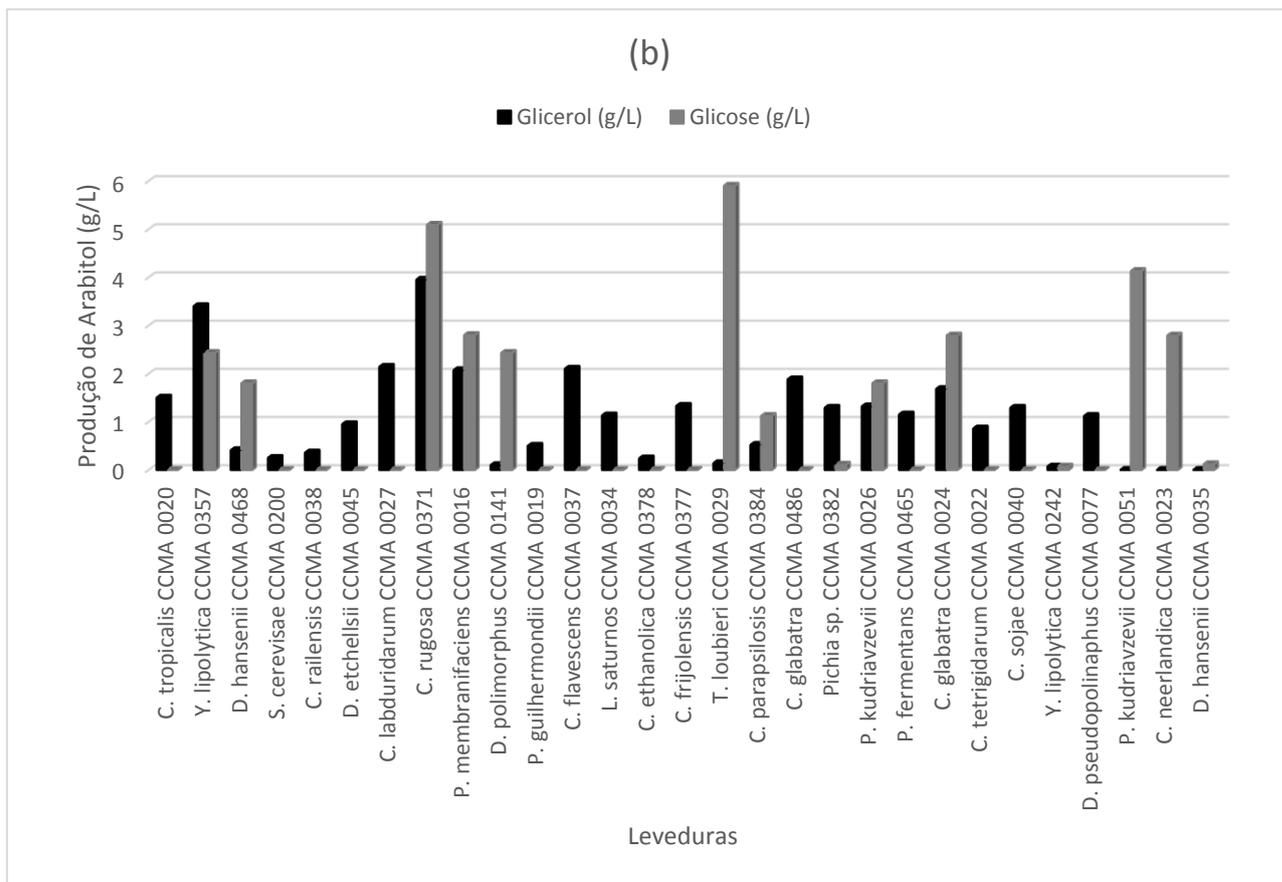
Durante o cultivo foi detectada a produção de Manitol e Arabitól (Figura 3). Das leveduras testadas 7 delas apresentaram produção de Manitol especialmente em glicerol puro: *Yarrowia lipolytica* CCMA 0357, *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242, *Candida glabrata* CCMA 0043, *Candida rugosa* CCMA 0371, *Candida parapsilosis* CCMA 0384, *Pichia fermentans* CCMA 0465 e *Candida sojae* CCMA 0040. Dessas leveduras as que apresentaram maior produção de manitol em glicerol puro foram *Yarrowia lipolytica* CCMA 0357 e *Candida rugosa* CCMA 0242, com 8,4743 e 8,3655 g/L de manitol produzido respectivamente. Em glicose a maior produção foi observada para as leveduras *Yarrowia lipolytica* CCMA 0357 que produziu 7,5674 g/L de manitol e para *Candida parapsilosis* CCMA 0384 que produziu 7,9021 g/L, sendo que esta última produziu manitol apenas em glicose como fonte de carbono (Figura 3).

Onishi e Suzuki (1968), relataram em seu trabalho o efeito de vários substratos para a produção de manitol utilizando várias fontes de carbono. De todas as fontes testadas, a que apresentou melhor resultado para produção de manitol, foi a glicose, o mesmo não foi

observado no presente trabalho, já que as leveduras apresentaram maior produção quando o meio possuía glicerol como fonte de carbono. Os resultados obtidos no presente estudo são divergentes ao descrito pela literatura.

Figura 3 - Leveduras que apresentaram produção de (a) manitol e (b) arabitol em glicerol puro e glicose após 12 dias de fermentação.





A produção de arabitol foi observada em 29 das trinta e duas leveduras testadas (Figura 2). Houve um maior número de leveduras que produziram Arabitol em glicerol puro, sendo a maior produtora a levedura *Candida rugosa* CCMA 0371 que produziu 3,9588 g/L de Arabitol. Em glicose a maior produtora foi *Trichosporon loubieri* CCMA 0029 que apresentou uma produção de 5,8569 g/L de Arabitol seguida pela levedura *Candida rugosa* CCMA 0371 que produziu 5,1923 g/L (Figura 2). As maiores concentrações de Arabitol foram observadas em glicose.

De acordo com Nobre e Costa (1990), o acúmulo de polióis está diretamente relacionado com a fase de crescimento, sendo esse acúmulo proporcional a quantidade de solutos osmoticamente ativos concentrados externamente. O arabitol é acumulado em concentrações consideradas significativas principalmente quando está em ocorrência a fase exponencial. Na levedura *Geotrichum candidum* é o arabitol que representa o papel de soluto compatível principal sendo acumulado durante a fase exponencial de crescimento em meios com glicose, podendo ser também observado um acúmulo de manitol durante a fase estacionária, sendo que neste fungo o glicerol não é acumulado intracelularmente quando este é utilizado como única

fonte de carbono. Em meios com NaCl o arabitol continua a ser produzido desempenhando as funções de substância osmorreguladora principal.

Não foi detectada a presença de outros polióis como maltitol, dulcitol, sorbitol, ribitol e xilitol por nenhuma das leveduras testadas, usando cromatografia líquida.

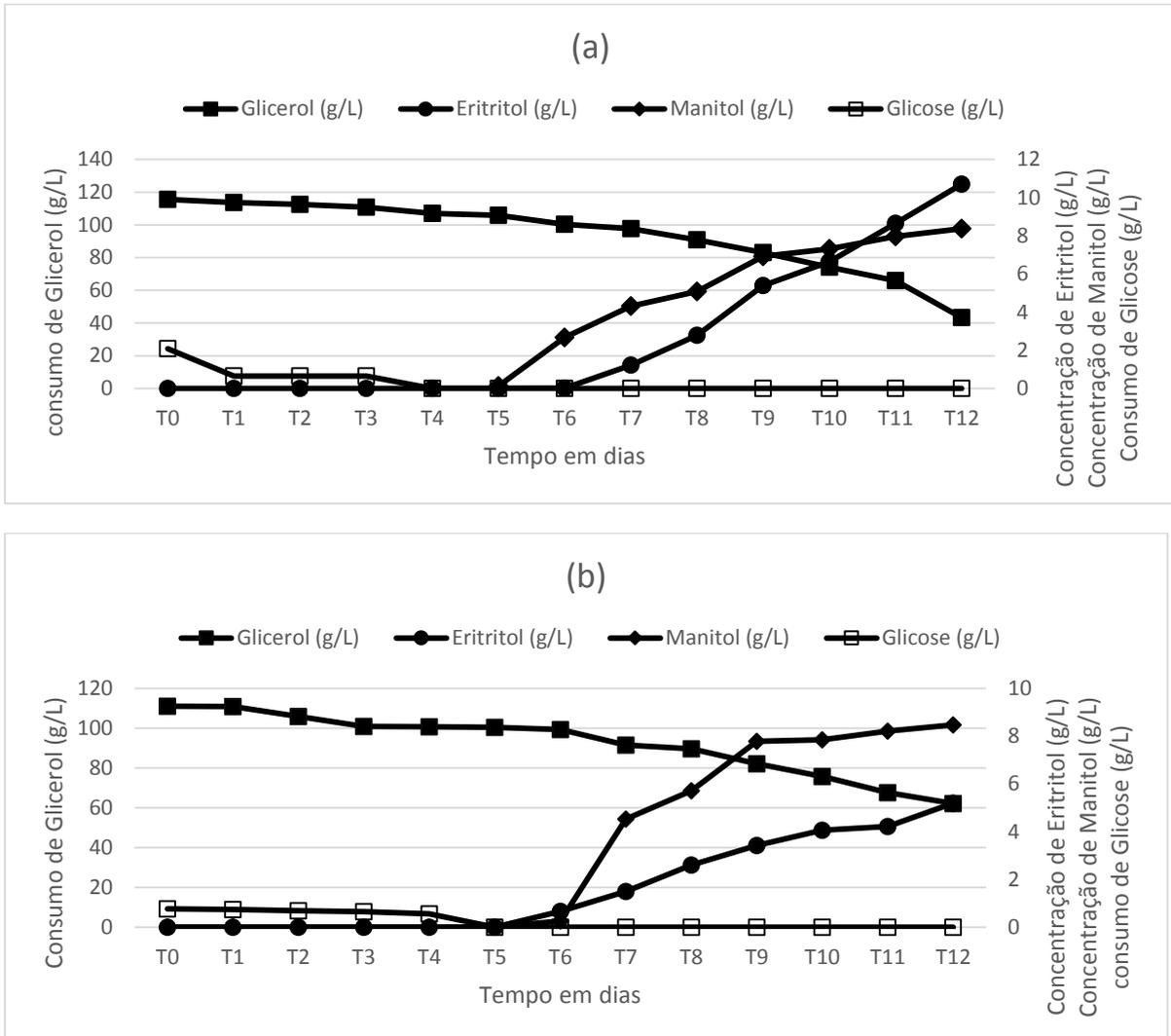
3.3 Consumo de glicerol e glicose

De acordo com a Figura 4 pode-se observar que a produção de eritritol e manitol tem início apenas quando a glicose residual proveniente do inóculo, se esgota no meio, isto, para ambas as leveduras. No caso da levedura *Candida rugosa* CCMA 0371 essa glicose residual é consumida totalmente após o terceiro dia de fermentação, no quinto dia já tem início a produção de manitol e no sexto dia pode ser observado o início da produção de eritritol. O consumo de glicerol acontece de forma gradativa desde o primeiro dia de fermentação. Para a levedura *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 foi observado o consumo total da glicose residual após quatro dias de fermentação, o eritritol começa ser produzido logo em seguida, no quinto dia, e manitol aparece a partir do sexto dia de fermentação. Para ambas as leveduras foi observado que a produção de eritritol e manitol acontece de forma exponencial desde o momento em que se esgota a glicose residual do meio até o fim da fermentação em doze dias.

O maior consumo de glicerol foi observado para a levedura *Candida rugosa* CCMA 0371 que iniciou a fermentação com 115,5 g/L e terminou ao final de doze dias com 43,3 g/L. *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 deu início a fermentação com 111,3 g/L de glicerol e após doze dias apresentava 62,09 g/L. Devido a presença de glicerol observado ao final do processo fermentativo e a produção ascendente de eritritol e manitol, pode-se supor que um tempo maior de fermentação resultaria em uma maior produção de eritritol e manitol, até que todo glicerol fosse então consumido.

Tomaszewska, Rywinska e Gladkowski (2012) avaliaram a capacidade de nove estirpes de *Yarrowia lipolytica* quanto a capacidade de consumir glicerol. E observaram que o consumo do glicerol durou de 63 a 148 horas de acordo com a levedura avaliada. No presente trabalho após 288 horas de fermentação o glicerol não havia ainda sido totalmente consumido.

Figura 4 - Cinética do consumo de glicerol em relação a produção de eritritol e manitol para *Candida rugosa* CCMA 0371 (a) e *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 (b) ao longo dos 12 dias de fermentação.



CONCLUSÃO

Após testes utilizando meios de cultivo acrescidos de glicose ou glicerol, foi observado um melhor crescimento e maior viabilidade pelas leveduras nos meios suplementados com glicerol.

Conclui-se que as duas cepas testadas de *Yarrowia lipolytica* CCMA 0242 e CCMA 0357 e especialmente a levedura *Candida rugosa* CCMA 0242, apresentaram capacidade de produzir eritritol utilizando glicerol como fonte de carbono, sendo que o mesmo não foi observado para glicose.

Uma grande quantidade de outros metabólitos produzidos, especialmente manitol e arabitol, podendo em estudos posteriores ser detectada uma forma de diminuir a quantidade de subprodutos formados, para que seja aumentada a produção de apenas eritritol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, Y. A. M. Transformação microbiana de sacarose e glicose em eritritol por *Trichosporonoides* sp. Tese apresentada a faculdade de engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1993.

BAUCHART, D.; AUROUSSEAU, B.; AUCLAIR, E. Addition of sorbitol to a milk substitute for veal calves. – I. Effects on health, growth and feed conversion. **Reproduction Nutrition Développement**, Paris, v. 25, n. 2, p. 339-410, 1985.

DUARTE, S.H., ANDRADE, C.C.P., GHISELLI, G., MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresources Technol**, v. 138, p. 377-381, 2013.

GEAY, Y.; RICHEL, E.; THIVEND, P. Effects of feeding sorbitol associated with different sources and amounts of nitrogen on growth, digestion and metabolism in Young bulls. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 36, n. 3-4, p. 255-273, 1992.

JEYA, M.; LEE, K. M.; TIWARI, K. M.; KIM, J. S.; GUNASEKARAN, P. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 225-231, 2009.

KIM, K. A.; NOH, B. S.; KIM, S. Y.; OH, D. K. Effect of osmotic pressure of salts on growth of *Torula* sp. and erythritol production. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1999

KROGER, M.; MEISTER, K.; KAVA, R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. **In food Science and food safety**, v. 5, p. 35-47, 2006.

MIRONKZUC, A. M.; FURGALA, J.; RAKICKA, M.; RYMOWICZ, W. Enhanced production of erythritol by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated batch cultures. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, p. 57-64, 2014

NOBRE, M. F. P. N. G.; COSTA, M. S. Efeito da fonte de carbono e da concentração de solutos na acumulação intracelular de poliois em *Debaromyces hansenii*, *Candida farmata*, *Pichia farinosa* e *Geotrichum candidum*. Tese de doutorado apresentada a Faculdade de ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra, 1990.

ONISHI, H.; SUZUKI, T. Production of D-mannitol and glycerol by yeasts. **Appl Microbiol**, v. 16, p. 1847-1952, 1968.

RAKICKA, M.; RUCOWICZ, B.; RIWINSKA, A.; LAZAR, Z.; RIMOWICZ, W. Technology of efficient continuous erythritol production from glycerol. **Journal of Cleaner Production**, v. 139, p. 905–913, 2016.

RYMOWICZ, W.; RYWIN´SKA, A.; MARCINKIEWICZ, M. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol Lett**, v. 31 p. 377–380, 2009

SEVERGAVE, L. S.; GADRE, R.V.; VAIDYA, K.; NARAYANAN, K. Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from *Candida magnoliae* mutant R23. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 92-100, 2011.

TOMASZEWAK, L.; RYWINSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Production of erithritol and manitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 39, p. 1333-1343, 2012.

WANKENNE, A.M.; WANKENNE, P. J.; FANI, M.; OLIVEIRA, R.; SANTOS, M. S. Poliois: Metabolismo e Aplicações. **Aditivos e Ingredientes**, São Paulo, Ed. Insumos, p. 46-55, 2013