UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RICARDO DE FREITAS BRANCO

**Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de
regeneração de coenzima como alternativa às
vias química e microbiológica de obtenção**

Lorena-SP

2010

RICARDO DE FREITAS BRANCO

**Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de
regeneração de coenzima como alternativa às
vias química e microbiológica de obtenção**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de concentração: Microbiologia
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva

Lorena-SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Branco, Ricardo de Freitas

Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção / Ricardo de Freitas Branco ; orientador Sílvia Silvério da Silva. – Lorena: 2010.

133 pág. : fig.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Poliálcool 2. Enzimas oxidoredutoras 3. Bagaço de cana-de-açúcar 4. Processos de membrana 5. Biocatálise. I. Título

577.15 - CDU

Dedico esse trabalho,
à minha esposa Maria e meus filhos Rafael e Alice
Eles que são a minha benção e alegria nesse mundo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada nesse mundo é possível.

Agradeço aos meus pais Renato e Raquel que sempre me guiaram, me deram apoio e ajuda e que sempre respeitaram minhas decisões.

Agradeço a minha Tia Regina, minha Avó Odiths, meu Avô José e minha Avó Layse pelo carinho e suporte.

Agradeço ao meu amigo Dr. Júlio César dos Santos que foi o idealizador desse trabalho, a pessoa que me iniciou na carreira científica e me deu a base para ser o que sou hoje.

Agradeço ao Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva, orientador desse trabalho, pelos ensinamentos, oportunidade, amizade e paciência que foram fundamentais para a elaboração desse projeto e crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos companheiros de pós-graduação pelas discussões, sugestões e observações em especial Michel Brienzo que é um grande amigo desde a graduação e colaborou de todos os meios possíveis com esse trabalho.

Agradeço aos meus grandes amigos Roberto, Rodrigo, Fabiano e Lucas pela amizade.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica, pois sempre foram solidários e atenciosos.

Em especial: Thais, Adriano, Rodrigo, Rodolpho, Nathalia e Olivia.

Agradeço a todos os Professores do programa de pós-graduação pelas aulas e conhecimento transmitido.

Agradeço ao Professor Dr. Adalberto Pessoa Jr. que contribuiu para o engrandecimento desse trabalho.

Professora Dra. Inês C. Roberto pela contribuição na análise na etapa de planejamento experimental deste trabalho.

Professor Dr. Walter de Carvalho e Professor Dr. Victor H. Perez pelas sugestões e recomendações no meu exame de qualificação.

Professora Dra. Heizir F. de Castro que sempre foi atenciosa e me ajudou durante o meu doutoramento.

Agradeço ao Professor Dr. Sérgio Cobiañchi que me “acordou” para uma nova etapa na minha vida, sem ele provavelmente nunca teria chegado a esse ponto.

Agradeço aos funcionários do departamento de biotecnologia que foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto: Jussara, Zé (cobrinha), Paulinho, Rita, Djalma, Ismael, André, Cibele, Nicamor, e Fabrício.

Agradeço a Lilian C. M. Robin pelas revisões dos textos em inglês.

Agradeço às funcionárias da escola que me ajudaram de muitas formas: Sandra, Ana Beatriz e Bernadete.

Agradeço à Escola de Engenharia de Lorena e a Universidade de São Paulo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela minha bolsa e apoio financeiro.

RESUMO

BRANCO R.F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como uma alternativa às vias química e microbiológica de obtenção.** 2010. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo Lorena, Lorena, 2010.

Xilitol é um açúcar-álcool com propriedades de interesse para as indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica. É tradicionalmente produzido em processo químico, sendo que a via fermentativa é a forma mais extensivamente estudada, entretanto, ainda possui limitações técnicas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar condições de obtenção de xilitol por via enzimática utilizando a enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* FTI 20037. Numa primeira etapa, esta enzima foi produzida e pré-purificada e em seguida foi realizada a seleção do sistema de regeneração enzimática *in situ* de coenzima NADPH. Foram considerados sistemas hipotéticos com formato desidrogenase, glicose desidrogenase e álcool desidrogenase, sendo determinado o efeito dos possíveis substratos e produtos sobre a xilose redutase pré-purificada. O sistema de regeneração escolhido foi o que utilizou a enzima glicose desidrogenase, sendo o substrato glicose e o produto gluconato. Em seguida, foi realizada a avaliação e seleção de variáveis do processo enzimático segundo planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} . Foi avaliada a influência da concentração de xilose, de NADPH e de glicose, a carga de xilose redutase e de glicose desidrogenase sendo que a variável resposta foi considerada a produtividade volumétrica em xilitol. As duas variáveis selecionadas para otimização foram a concentração de xilose e de NADPH. Para a otimização do processo de produção de xilitol em meio sintético sob regime de batelada empregou-se um planejamento composto central rotacional (estrela) 2^2 . A partir dos resultados pode-se construir um modelo quadrático que relacionou a produtividade com os fatores na região de estudo. De acordo com este modelo, a melhor condição operacional resulta em alto valor de produtividade e eficiência em xilitol, $1,68 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 100 %, respectivamente. Visando a viabilidade econômica do processo foram avaliadas membranas de ultra e nanofiltração para retenção das enzimas e coenzimas no sistema reacional. Foi constatado que a membrana de tamanho de poro de 1 kDa permitiu a retenção de 99 % da coenzima. Adicionalmente, foi avaliado o desempenho da enzima obtida a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, comparando-se os resultados obtidos com aquela obtida pelo cultivo da levedura em meio baseado em xilose comercial. Foi comprovado que a fonte de carbono não teve efeito sob a produção enzimática de xilitol. Finalmente, foram realizados testes preliminares com a produção enzimática de xilitol em meio de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Foi observado que a produção de xilitol não se alterou com meio contendo 20 e 40 % v.v⁻¹ de hidrolisado. Em função dos resultados, foi concluído que a produção enzimática de xilitol é tecnicamente viável e que possui grande potencial como bioprocessos para aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar.

PALAVRAS-CHAVE: Poliálcool. Enzimas oxirredutoras. Bagaço de cana-de-açúcar. Biocatálise. Processos de membrana.

ABSTRACT

BRANCO R.F. **Xylitol enzymatic production using coenzyme regeneration system as an alternative for the chemical and microbial obtainment way.** 2010. 131 p. Thesis (Doctoral in Sciences) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo Lorena, Lorena, 2010.

Xylitol is a sugar-alcohol with proven interesting properties for food, odontological and pharmaceutical industries. It is traditionally produced in chemical process and the fermentative way, the most extensively studied alternative, nevertheless, still has disadvantages. In this context, the present work has as objective to determinate optimal conditions for xylitol attainment by enzymatic way using xylose reductase from *Candida guilliermondii* FTI 20037. Firstly, xylose reductase was produced, pre-purified and then the selection of an *in situ* enzymatic regeneration of coenzyme NADPH was carried out. Hypothetical regeneration systems were considered: formate dehydrogenase, glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, being determined the effect of the possible substrates and products under pre-purified xylose reductase. The glucose dehydrogenase regeneration system, being glucose the substrate and gluconate the product. Afterwards, it was carried out the screening and evaluation of the enzymatic process variables according to a fractioned factorial design 2^{5-1} . It was evaluated the influence of xylose, NADPH and glucose concentrations, xylose reductase and glucose dehydrogenase loads using xylitol volumetric productivity as response. Xylose and NADPH concentrations were selected for further optimization. A rotational central composite design (star) 2^2 was used for optimization of xylitol enzymatic process in synthetic media under batch regime. From the results, a quadratic model could be elaborated which relates the productivity with the factors in the studied region. According to this model, the best operational condition resulted in high productivity and efficiency values, 1,68 g.l⁻¹.h⁻¹ and 100 %, respectively. Aiming economical viability of the process, ultra and nanomembranes were studied for coenzyme and enzymes retention. It was verified that the 1 kDa cut off membrane allowed 99 % retention of the coenzyme. Additionally, it was evaluated the enzyme performance produced from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate, comparing the results attained with the enzyme produced from synthetic media. It was evidenced that the carbon source did not affected xylitol enzymatic production. Finally, xylitol enzymatic production preliminary assays were carried out using media containing sugarcane bagasse hydrolysate. It was observed that xylitol enzymatic production was not altered when compared to the control, in the experiments media containing 20 and 40 % v.v⁻¹ hydrolysate. Based on the results, it was concluded that xylitol enzymatic production is technically viable and has great potential as a bioprocess for sugarcane bagasse use as raw material.

KEYWORDS: Polyalcohol. Oxirreductive enzymes. Sugarcane bagasse. Biocatalysis. Membrane processes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produtos que possuem xilitol na formulação: a) adoçantes; b) produtos para higiene bucal; c) doces, balas e gomas de mascar; d) spray nasal e; e) produto para animais. _____	25
Figura 2. Produção de xilitol por via química. Adaptado de Silva et al. (1994). _____	26
Figura 3. Esquema simplificado do metabolismo de xilose por leveduras: PPP – via pentose fosfato; EMP – via Embden-Meyrhopf-Parnas; Rib5P – ribose 5-fosfato; S7P – sedoheptulose 7-fosfato; Gliceral3P – gliceraldeído 3-fosfato; F6P – frutose 6-fosfato; Eri 4P – eritrose 4-fosfato. Adaptado de Ostergaard, Olsson e Nielson, 2000. _____	29
Figura 4. Esquema da reação de enzimática para produção de xilitol com sistema de regeneração enzimático de NADPH. _____	30
Figura 5. Estrutura da holoenzima xilose redutase encontrada em <i>Candida tenuis</i> proposto por Wilson et al. (2002). _____	33
Figura 6. Mecanismo de ação da enzima xilose redutase do tipo bi-bi ordenado, proposto por Mayr et al. (2001). _____	33
Figura 7. Sistemas enzimáticos de regeneração de coenzimas (KROUTIL et al, 2004). _____	35
Figura 8. Fotografia publicada da reserva de bagaço de cana-de-açúcar da União de Industrias de cana-açúcar (RABELLO; YONEYA, 2008). _____	42
Figura 9. Esquemas dos tipos de modo de condução de processos de separação com membrana a) Tangential crossflow e b) Dead end (SPECTRUMLABS, 2009). _____	44
Figura 10. Classificação dos processos de separação com membranas pelo tamanho do poro da membrana (MIERZWA et al., 2008). _____	45
Figura 11. Fotografia do sistema reacional no módulo adaptado do BIOFLO III. _____	56
Figura 12. Sistema de ultra e nanofiltração montado e pronto para o uso. _____	61
Figura 13. a) Concentração de xilose (▲) e de xilitol (■) b) Crescimento celular e c) Atividade específica de xilose redutase (○) e de xilitol desidrogenase (□) em função do tempo para a fermentação em meio sintético ($K_L a$ 12 h ⁻¹ e pH inicial de 4,0). As curvas representam o ajuste dos pontos experimentais. _____	70
Figura 14. a) Concentração de xilose (▲) e de xilitol (■) b) Crescimento celular e c) Atividade específica de xilose redutase (○) e de xilitol desidrogenase (□) em função do tempo para a fermentação de xilose comercial ($K_L a$ 25 h ⁻¹ e pH inicial de 5,50 - controlado durante o processo). As curvas representam o ajuste dos pontos experimentais. _____	72
Figura 15. Concentração de xilose (▲) e de xilitol (■) b) Crescimento celular e c) Atividade específica de xilose redutase (○) e de xilitol desidrogenase (□) em função do tempo para a fermentação de xilose comercial ($K_L a$ 50 h ⁻¹ e pH inicial de 5,50 - controlado durante o processo). As curvas representam o ajuste dos pontos experimentais. _____	73
Figura 16. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose. A curva representa o ajuste dos dados experimentais a equação de Michaelis-Menten. _____	78
Figura 17. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de coenzima NADPH. A curva representa o ajuste dos dados experimentais a equação de Michaelis-Menten. _____	78

Figura 18. Linearização do tipo Lineweaver-Burk relativa à xilose redutase em relação à xilose. _____ 79

Figura 19. Linearização do tipo Lineweaver-Burk relativa à xilose redutase em relação à coenzima. _____ 79

Figura 20. Atividade específica inicial da xilose redutase em função da concentração de xilose correspondentes a concentração de formato de (♦) 0,50 M, (x) 0,25 M, (●) 0,10 M, (▲) 0,025 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a curva representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten. _____ 82

Figura 21. Linearização do tipo Lineweaver-Burk para os dados de atividade específica inicial de xilose redutase correspondentes a concentração de formato de (♦) 0,50 M, (x) 0,25 M, (●) 0,10 M, (▲) 0,025 M e (■) 0 M. _____ 83

Figura 22. Coeficiente angular das curvas linearizadas mostradas na FIGURA 21 em função da concentração de formato _____ 84

Figura 23. Atividade específica inicial da xilose redutase em função da concentração de xilose correspondentes a concentração de formato de (■) 0,50 M, (x) 0,25 M, (●) 0,10 M, (▲) 0,025 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo acompetitiva segundo o método RNLLS. _____ 85

Figura 24. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de glicose. A curva representa os dados ajustados a equação de Michaelis-Menten. _____ 86

Figura 25. Linearização do tipo Lineweaver-Burk relativa à xilose redutase em relação à glicose. _____ 87

Figura 26. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de gluconato de (■) 0,50 M, (x) 0,40 M, (●) 0,30 M, (▲) 0,20 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten. _____ 88

Figura 27. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de gluconato (■) 0,50 M, (x) 0,40 M, (●) 0,30 M, (▲) 0,20 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo acompetitiva segundo o método RNLLS. _____ 89

Figura 28. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de etanol de (x) 0,1,36 M, (●) 1,02 M, (▲) 0,68 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten. _____ 91

Figura 29. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de etanol, (x) 0,1,36 M, (●) 1,02 M, (▲) 0,68 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo não-competitiva segundo o método RNLLS. _____ 92

Figura 30. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de acetaldeído (x) 0,35 μ M, (●) 0,20 μ M, (▲) 0,15 μ M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten. _____ 93

Figura 31. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de acetaldeído: (x) 0,35 μ M, (●) 0,20 μ M, (▲) 0,15 μ M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo não-competitiva segundo o método RNLLS. _____ 94

Figura 32. Valores observados em função dos valores preditos pelo modelo estatístico. Os pontos representam os dados experimentais e a curva representa o modelo. _____ 103

Figura 33 – a) Superfície de resposta; b) Curvas de contorno e c) Curvas de contorno com os valores de Q_p segundo o modelo estatístico (EQUAÇÃO 21). _____ 104

Figura 34. Concentração de xilose (símbolos em preto) e xilitol (símbolos em branco) em função do tempo de reação para os experimentos com diferentes quantidades de hidrolisado no meio reacional: controle (■); 20 % (◆), 40 % (▲), 80 % (●) e 100 % v.v⁻¹ (▼). As curvas representam o ajuste dos dados experimentais. _____ 111

Figura 35. Concentração de glicose (preto) e gluconato (branco) em função do tempo de reação para os experimentos com diferentes quantidades de hidrolisado no meio reacional: controle (■); 20 % (◆), 40 % (▲), 80 % (●) e 100 % v.v⁻¹ (▼). As curvas representam o ajuste dos dados experimentais. _____ 111

Figura 36. Concentração relativa de NADPH em função do tempo de reação para os experimentos com diferentes quantidades de hidrolisado no meio reacional: controle (■); 20 % (◆), 40 % (▲), 80 % (●) e 100 % v.v⁻¹ (▼). As curvas representam o ajuste dos dados experimentais. _____ 112

Figura 37. Atividade relativa dos extratos em função do tempo de estocagem à 4 °C. (◆) bruto (NP); (■) pré-purificado (PP); (▲) pré-purificado dialisado (PD) e; (●) pré-purificado com tampão TRIS/HCl. Os símbolos representam os pontos experimentais e as curvas representam o respectivo ajuste desses pontos. _____ 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos processos de produção de xilitol. _____	30
Tabela 2 - Relação de microrganismos produtores de xilose redutase _____	32
Tabela 3 – Produção estimada de cana-de-açúcar em 2008 e 2009 por região e estados do Sudeste do Brasil. _____	41
Tabela 4 – Composição média do bagaço de cana-de-açúcar em massa seca _____	43
Tabela 5 – Composição reacional e características operacionais dos ensaios preliminares de produção enzimática de xilitol em bioreator _____	56
Tabela 6 – Planejamento fatorial 2^{5-1} com triplicata no ponto central, variáveis de entrada com valores reais (V.R.) e codificados (V.C.). _____	58
Tabela 7 - Planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central e pontos axiais, variáveis de entrada com valores reais (V.R.) e codificados (V.C.) _____	59
Tabela 8 - Comparação de desempenho do sistema enzimático para produção de xilitol onde a enzima XR é produzida em diferentes meios de cultura _____	63
Tabela 9 – Meio reacional para a determinação da atividade das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e glicose desidrogenase (GDH). _____	65
Tabela 10 – Comparação dos resultados obtidos nos experimentos e em Sene (2000). _____	75
Tabela 11 - Valores de extração e purificação do extrato enzimático obtido no segundo experimento em comparação aqueles obtidos por Cortez (2002). _____	76
Tabela 12-Valores de Km ajustados para a XR comparados aos obtidos em outros trabalhos _____	80
Tabela 13 – Valores de SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo formato na XR. _____	85
Tabela 14 – Valores de K _{ic} , K _{iu} (aparentes), SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo gluconato na XR. _____	88
Tabela 15 – Valores de K _{ic} , K _{iu} (aparentes), SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo etanol na XR. _____	91
Tabela 16 – Valores de SQR, AIC, K _{ic} K _{iu} (aparentes) obtidos pela análise de RNLLS para os modelos de inibição do tipo não-competitiva e mista. _____	91
Tabela 17 – Valores de K _{ic} , K _{iu} (aparentes), SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo acetaldeído na XR. _____	93
Tabela 18 – Tipo de inibição e valor de K _{ic_{ap}} para cada sistema de regeneração enzimática <i>in situ</i> da coenzima NADPH. _____	95

Tabela 19 – VAlores de Qp para os experimentos do planejamento 2^{5-1} para avaliação da produção enzimática de xilitol com valores reais (V.R.) e valores codificados (V.C.).	98
Tabela 20 – Estimativas por pontos e testes de significância para os efeitos principais em relação à resposta Qp.	99
Tabela 21 – Resultados de Qp para os experimentos do planejamento 2^2 com valores codificados (V.C.) e valores reais (V.R.).	100
Tabela 22 – Valor dos efeitos e testes de significância para os fatores	100
Tabela 23 – Valores dos coeficientes calculados para cada fator e testes de significância	102
Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) e valores de variação do modelo quadrático proposto.	102
Tabela 25 – Valores de permeabilidade hidráulica (Lp) e fluxo hidráulico máximo (Jp) para membranas de ultra e nanofiltração de diferentes cortes.	107
Tabela 26 – Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar bruto e tratado	108
Tabela 27 – Parâmetros de processo para a produção enzimática de xilitol para os ensaios comparativos realizados.	109
Tabela 28 – Parâmetros de processo para a produção enzimática de xilitol com diferentes quantidades de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar após 12 horas de reação.	113
Tabela 29 – Resultados de atividade (atv), atividade volumétrica (atv. vol.) e atividade específica (atv. esp.) entre outros do extrato pré-purificado de XR antes e após diálise.	115

LISTA DE SIGLAS

A₀	Atividade volumétrica inicial
A_{esp}	Atividade específica
AIC	Critério de informação de Akaike
AOT	<i>Sodium diethyl hexylsulphosuccinate</i>
Ap	Aumento de pureza
BDBAC	<i>N-Benzyl-N-Dodecyl-N bis(2-hydroxyethyl) ammonium chloride</i>
C	Consumo de xilose
CTAB	<i>Cetyltrimethyl ammonium bromide</i>
CV	Causa de variação
Da	Dalton
EDH	Etanol desidrogenase
EMP	Embden-Mayerhof-Parnas
FAI	Fase aquosa I
FAII	Fase aquosa II
FDH	Formato desidrogenase
g	Aceleração da gravidade (9,8 m.s ⁻²)
GDH	Glicose desidrogenase
GL	Grau de liberdade
K_{ic}	Constante da reação reversível de inibidor com enzima livre
K_{ic}_{ap}	Constante aparente da reação reversível de inibidor com enzima livre
K_{iu}	Constante da reação reversível de inibidor com complexo enzima/substrato
K_{iu}_{ap}	Constante aparente da reação reversível de inibidor com complexo enzima/substrato
K_{La}	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
p	Nível de significância
Qp	Produtividade volumétrica em xilitol
Qs	Taxa de consumo de xilose
Qx	Taxa de crescimento celular
R	Coeficiente de retenção
Ra	Recuperação em atividade enzimática
RNLLS	Mínimos quadrados não-linear rigoroso
Rp	Recuperação de proteína total
SMQF	Soma média quadrática
SQF	Soma média dos fatores
SQR	Soma dos quadrados dos resíduos
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TTN	Número total de <i>turnovers</i>
U	Unidade de atividade enzimática
V_{máx}	Velocidade máxima de reação
XDH	Xilitol desidrogenase
XR	Xilose redutase
Y_{ps}	Fator de rendimento de xilose em xilitol
Y_{xs}	Fator de rendimento de xilose em biomassa
η	Eficiência de conversão de xilose em xilitol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 XILITOL	23
2.1.1 Propriedades e aplicações	23
2.1.2 Produção química	25
2.1.3 Produção microbiológica	26
2.1.4 Produção enzimática	29
2.2 XILOSE REDUTASE (XR)	31
2.3 MÉTODOS DE REGENERAÇÃO DE COENZIMA NAD(P)H EM PROCESSOS ENZIMÁTICOS	34
2.4 RESÍDUOS E SUBPRODUTOS LIGNOCELULÓSICOS	36
2.4.1 Bagaço de cana de açúcar	40
2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANA APLICADOS A BIOTECNOLOGIA	43
2.5.1 Processo de ultrafiltração	46
2.5.2 Processo de nanofiltração	48
3 OBJETIVOS	50
3.1 GERAL	50
3.2 ESPECÍFICOS	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 PRODUÇÃO DE XILOSE REDUTASE	51
4.1.1 Inóculo	51
4.1.2 Produção da xilose redutase em meio sintético e em hidrolisado	51
4.2 PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE	52
4.2.1 Rompimento celular	52
4.2.2 Pré-purificação do extrato enzimático por micelas reversas	53
4.3 SELEÇÃO DO SISTEMA DE RENERAÇÃO ENZIMÁTICA DE NADPH	53
4.3.1 Determinação das constante cinéticas aparentes da xilose redutase pré-purificada	53
4.3.2 Determinação de efeitos de diferentes substâncias sob a xilose redutase pré-purificada	54
4.4 ENSAIOS INICIAIS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL PARA DEFINIÇÃO DA REGIÃO DE ESTUDO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS	55
4.4.1 Ensaios em bioreator	55
4.4.2 Ensaios em tubos	57
4.5 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL	57
4.6 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL EM BATELADA EMPREGANDO MEIO SINTÉTICO	59

4.7 DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE ULTRA E NANOFILTRAÇÃO PARA RETENÇÃO DE NADPH E ENZIMAS	60
4.8 OBTENÇÃO, CONCENTRAÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	61
4.9 TESTES COMPARATIVOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM DIFERENTES ORIGENS DE XR E MEIOS REACIONAIS	62
4.10 ENSAIOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	63
4.11 ESTRATÉGIAS DE AUMENTO DA ESTABILIDADE À ESTOCAGEM DO EXTRATO PRÉ-PURIFICADO DE XILOSE REDUTASE	64
4.12 MÉTODOS ANALÍTICOS	64
4.12.1 Determinação das atividades enzimáticas e de proteínas totais	64
4.12.2 Determinação de concentração celular, de açúcares e demais componentes reacionais e provenientes do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	65
4.13 PARÂMETROS FERMENTATIVOS E DE PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 PRODUÇÃO DE XILOSE REDUTASE (XR) EM BIORREATOR	69
5.2 OBTENÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA XILOSE REDUTASE	76
5.3 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES DA XR PRÉ-PURIFICADA	77
5.4 INFLUÊNCIA DOS POSSÍVEIS SUBSTRATOS E PRODUTOS DOS SISTEMAS DE REGENERAÇÃO ENZIMÁTICA SOBRE A XR PRÉ-PURIFICADA	80
5.4.1 Sistema formato desidrogenase	82
5.4.1.1 Formato	82
5.4.2 Sistema glicose desidrogenase	86
5.4.2.1 Glicose	86
5.4.2.2 Gluconato	87
5.4.3 Sistema etanol desidrogenase	90
5.4.3.1 Etanol	90
5.4.3.2 Acetaldeído	92
5.5 DETERMINAÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE REGENERARAÇÃO IN SITU DA COENZIMA NADPH	94
5.6 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL	96
5.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL EM REGIME DE BATELADA EMPREGANDO MEIO SINTÉTICO	99
5.8 DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE ULTRA E NANOFILTRAÇÃO PARA RETENÇÃO DE NADPH E ENZIMAS	105
5.8.1 Determinação de Membrana para Retenção da Coenzima	105
5.8.2 Avaliação das membranas para retenção dos demais componentes	106
5.8.3 Caracterização das membranas	106
5.9 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	107

5.10 TESTES COMPARATIVOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM DIFERENTES ORIGENS DE XR E MEIOS REACIONAIS _____	109
5.11 ENSAIOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR _____	110
5.12 ESTRATÉGIAS DE AUMENTO DA ESTABILIDADE À ESTOCAGEM DO EXTRATO PRÉ-PURIFICADO DE XILOSE REDUTASE _____	114
6 CONCLUSÕES _____	117
REFERÊNCIAS _____	119

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho visou de forma geral à ampliação da linha de pesquisa “*Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção biotecnológica de xilitol*”, em desenvolvimento dentro do Grupo de Microbiologia Aplicada e de Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo. O Grupo vem nos últimos anos desenvolvendo esforços para a implantação da tecnologia de produção de xilitol por via fermentativa, uma vez ser este um produto de alto valor agregado e em virtude da ampla aplicação deste composto em diversos segmentos industriais. Visando propor uma opção à via fermentativa, em estudo, teve-se como objetivo neste trabalho o desenvolvimento do processo enzimático de produção de xilitol empregando-se hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, um abundante subproduto lignocelulósico no Brasil. O aproveitamento do resíduo é de fundamental importância para o nosso país, reduzindo a contaminação ambiental e gerando produtos de alto valor agregado.

Neste contexto, nos últimos anos, diversos trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos objetivando a viabilização de processos de aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, visando à obtenção de produtos de valor econômico e social. Entre estes trabalhos, tem sido estudado o desenvolvimento de um processo técnica e economicamente viável para a obtenção de xilitol.

O xilitol é um poliálcool que possui poder adoçante semelhante ao da sacarose, possuindo também propriedades anticariogênicas. Também há estudos demonstrando possíveis benefícios do uso de xilitol por pessoas obesas e para pacientes portadores de deficiência de glicose-6-P-desidrogenase. O xilitol é produzido, atualmente, em escala industrial por via química a partir de xilose pura obtida de hidrolisados hemicelulósicos, sob condições operacionais de elevada pressão e temperatura.

A via microbiológica de produção tem sido estudada como uma alternativa para a síntese química de xilitol. Acredita-se que a via microbiológica resulta em custos menores de produção quando comparada à via atualmente utilizada e no consequente aumento no uso do xilitol e de seus benefícios.

Atualmente, os trabalhos de pesquisa têm sido direcionados ao uso de microrganismos, especialmente leveduras, para a produção de xilitol por via fermentativa a partir de hidrolisados. Neste caso, o biocatalisador é o microrganismo, o qual, através de complexos sistemas multienzimáticos integrados, utiliza a xilose presente em hidrolisados

hemicelulósicos para obtenção de energia e, sob determinadas condições, possibilita o acúmulo deste poliálcool no meio de fermentação. Neste processo, entretanto, a perda de parte do substrato em vias alternativas, como crescimento e manutenção celular, é inevitável. Há ainda problemas relacionados à transferência de substratos e produtos, o que resulta ainda em baixas produtividades.

Uma alternativa que resulta em maiores rendimentos e produtividades é a substituição da via fermentativa pela biotransformação usando a enzima xilose redutase (XR). De fato, alguns estudos realizados visando à produção de xilitol por processo enzimático usando como substrato xilose comercial apresentaram uma eficiência de conversão de 100 %. Uma limitação, entretanto, para o uso da via enzimática refere-se à necessidade de regeneração da forma reduzida da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) requerido pela XR.

De fato, a regeneração de coenzimas reduzidas pode ser feita por método químico, eletroquímico ou enzimático. Destes, os dois primeiros métodos apresentam como desvantagens baixa seletividade e reações paralelas indesejáveis. Assim, nos últimos anos, especial atenção tem sido dada ao uso de enzimas na regeneração de coenzimas reduzidas. Há necessidade, entretanto, da busca de um substrato para a enzima de regeneração que apresente baixo custo para possibilitar a viabilização econômica do processo.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar as condições de obtenção de xilitol por via enzimática a partir de extrato enzimático pré-purificado contendo xilose redutase de *Candida guilliermondii* FTI 20037.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 XILITOL

2.1.1 Propriedades e aplicações

Sintetizado e descrito pela primeira vez por Emil Fisher e sua equipe em 1891 (BÄR, 1991), o xilitol é um composto orgânico de fórmula molecular $C_5H_{12}O_5$ (penta-hidroxi-pentano) que se apresenta como um cristal rômbico branco altamente solúvel em água. É produzido em pequena quantidade por mamíferos, sendo um produto intermediário do metabolismo de carboidratos (5 a 15 g por dia – PEPPER; OLINGER, 1988). Devido ao seu calor de dissolução ($34,8 \text{ cal.g}^{-1}$ - endotérmico) promove um prazeroso efeito refrescante, o que o torna adequado para uso em gomas de mascar. O poder adoçante do xilitol é semelhante ao da sacarose, sendo que trabalhos estão sendo realizados visando à substituição da sacarose por polióis, adoçante ou sua combinação em produtos como bolos, pães e sorvete (MAIA et al., 2008; RONDA; BLANCO; CABALLERO, 2005). Todos os outros da mesma classe, como sorbitol, arabitol e manitol apresentam poder adoçante inferior (GLIEMMO et al., 2008) e por isso devem ser utilizados em conjunto com outros adoçantes para alcançar o grau de dulçor desejado. Sua boa estabilidade física e biológica o torna uma substância adequada para aplicações alimentícias e farmacêuticas (AGUIAR; OETTERER; MENEZES, 1999; MUSSATO; ROBERTO, 2002). Existem várias características que fazem do xilitol um produto atrativo e de valor comercial. Seu uso como substituinte de açúcar (adoçante), o qual é o seu maior mercado, é indicado para pessoas diabéticas uma vez que seu metabolismo é independente de insulina (GRILLAUD et al., 2005), sendo que seu uso reduz o nível de ácidos graxos livres no sangue (tanto de pessoas saudáveis quanto diabéticos), contribuindo pouco para a formação de tecidos gordurosos (MÄKINEN, 1976). O mesmo também é indicado para pacientes portadores de deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (BÄR, 1991). Entre as principais propriedades deste adoçante, entretanto, destaque deve ser dado ao seu poder anti e não cariogênico (AUTIO, 2002; MASSOTH, 2006). É não cariogênico, uma vez que os microrganismos normalmente encontrados na cavidade oral não são capazes de usá-lo como fonte de energia, o que impede que os mesmos produzam ácidos que ataquem o esmalte dos dentes provocando as lesões que levam a cárie. Além disso, estudos têm demonstrado que o xilitol auxilia na remineralização de lesões iniciais, fenômeno ainda não completamente explicado e que parece estar relacionado a

efeitos do uso de xilitol no fluxo e na composição da saliva e no equilíbrio entre desmineralização e remineralização do esmalte (AUTIO, 2002; LOVEREN, 2004). Uma explicação adicional que tem sido apontada para o efeito anticariogênico do xilitol é a redução da quantidade de *Streptococcus mutans* (principal agente patogênico responsável pela cárie) na saliva, obtida através do uso regular de gomas de mascar contendo este poliálcool (AUTIO, 2002). Em outro trabalho (IWATA et al., 2003), é relatada a redução na retenção de glicose na boca devida ao uso de dentrífcios contendo xilitol e flúor. Mäkinen e Isokangas (1988) relatam diversos estudos realizados em diversos países e que comprovaram a eficácia do uso de xilitol na prevenção de cáries em crianças. Outra característica do xilitol que se destaca é a sua propriedade de inibir a aderência de células microbianas na região laringo-faringial (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2001). De fato, em um estudo recente, foi observado uma inibição de 67 a 85 % na adesão de células bacterianas pelo xilitol (SAJJAN et al., 2004). Embora o mecanismo de inibição da adesão ainda não seja totalmente conhecido, os autores relataram que o xilitol diminui a espessura do muco superficial, sugerindo, desta maneira, que possa estar removendo uma camada de muco de características mais aderentes a células bacterianas. Essa propriedade também foi observada para a pele (epiderme), sendo que trabalhos estão sendo desenvolvidos para produção de uma pomada tópica contendo xilitol indicada para pequenas escoriações (FERREIRA; BARBOSA; SILVA, 2009).

A produção anual de xilitol na China (maior produtor) é de cerca de 35 mil toneladas, sendo que é previsto uma aumento na produção de polióis de 2,7 % ao ano (ANNIES, 2009).

Comercialmente são encontrados vários produtos que contêm xilitol em sua formulação. No Brasil, observa-se um crescente interesse no uso de xilitol em diversos produtos. Na área de dentífricos podem ser destacados os cremes dentais e existem também guloseimas formuladas à base de xilitol como, por exemplo, o chiclete Trident, à bala Smints Valda. Alguns produtos estão apresentados na FIGURA 1.

Figura 1. Produtos que possuem xilitol na formulação: a) adoçantes; b) produtos para higiene bucal; c) doces, balas e gomas de mascar; d) spray nasal e; e) produto para animais.

2.1.2 Produção química

Em larga escala, este poliálcool é produzido por redução química a partir de xilose, derivada principalmente de hidrolisados de madeira, com auxílio de um catalisador metálico (Níquel de Raney). Este processo apresenta várias desvantagens como o uso de altas temperaturas (70 a 120 °C) e pressões (10 a 50 atm) (JAFÉ et al., 1974; MIKKOLA et al., 2003), as quais elevam o custo do produto final, além da necessidade de um alto nível de purificação tanto nas etapas de *upstream* quanto de *downstream* (CARVALHO et al., 2003; SILVA et al, 1993; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). Um esquema simplificado deste processo está apresentado na FIGURA 2.

Figura 2. Produção de xilitol por via química. Adaptado de Silva et al. (1994).

2.1.3 Produção microbiológica

A existência de desvantagens no processo convencional de produção de xilitol motivou pesquisadores a buscar vias alternativas. Outra motivação certamente foi o uso de recursos naturais e a necessidade de tratamento dos resíduos inerentes à rota química que são compostos por metais pesados (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). A alternativa mais extensivamente estudada nas últimas décadas foi a via microbiológica a qual apresenta vantagens como o uso de condições amenas de pressão e temperatura (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 1997), a não necessidade de utilização de xilose pura, uma vez que os

microrganismos são capazes de converter xilose em xilitol a partir do hidrolisado tratado de modo simplificado (BRANCO et al., 2007; CUNHA et al., 2006; ROSEIRO et al., 1991) e o fato de que a via biológica não leva à formação de resíduos tóxicos que necessitam ser removidos nas etapas de purificação.

Em geral, entre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol, sendo que as do gênero *Candida* têm se destacado, permitindo a obtenção dos melhores resultados (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). No entanto, na literatura encontram-se trabalhos sobre fungos capazes de produzir xilitol (PANAGIOTOU; CHRISTAKOPOULOS, 2004), assim como de outras leveduras, por exemplo, *Debaromyces hansenii* (SAMPAIO et al., 2006). Atualmente outros microrganismos são capazes de promover a bioconversão de xilose em xilitol graças à evolução da engenharia genética. Encontra-se, nos últimos anos, um número crescente de trabalhos voltados para a alteração genética de microrganismos principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, visando à produção de xilitol (KIM et al., 2002; NYSS et al., 2005).

A via metabólica utilizada por estes microrganismos na qual o xilitol é produzido está apresentada na FIGURA 3. A via pode ser esquematizada da seguinte forma: a xilose transportada para o interior da célula através da membrana celular é inicialmente reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase NADH-dependente ou NADPH-dependente (XR, E.C. 1.1.1.21), na presença de NADH e/ou NADPH. Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH, E.C. 1.1.1.19). NAD-dependente ou, mais raramente, NADP-dependente. A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, molécula esta que pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via hexose monofosfato, em intermediários da via EMP (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato), os quais podem então ser metabolizados por esta via, a qual está conectada a outras como o ciclo de Krebs e às reações de fermentação alcoólica. A especificidade das enzimas XR e XDH as coenzimas reduzidas e oxidadas, respectivamente, varia de acordo com a levedura (BRUINENBERG et al., 1984; SILVA et al., 1996; WILSON et al., 2003). Em *Candida guilliermondii* FTI 20037, por exemplo, a XR é NADPH-dependente e a XDH é NAD-dependente. Em *Pichia stipitis* a XR é NADPH-dependente e a XDH é principalmente NAD-dependente.

Há uma íntima relação entre a especificidade da XR as coenzimas NADH ou NADPH e o acúmulo de xilitol no citoplasma do microrganismo, com sua posterior excreção para o meio. Quando a atividade da XR de determinado microrganismo depende de NADH ou

NADPH, o cofator NAD utilizado na redução da xilose a xilitol pode ser recuperado na etapa seguinte, seja em condições anaeróbias ou de limitação de oxigênio. Neste caso e sob tais condições, o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol (não há acúmulo de xilitol). Quando, entretanto, a atividade da XR de um dado microrganismo depende apenas de NADPH, sob condições de limitação de oxigênio observa-se acúmulo de xilitol, uma vez que, nestas condições, a capacidade da cadeia respiratória de recuperação do cofator oxidado é baixa, o que acarreta diminuição da atividade da XDH, diminuindo a taxa de transformação de xilitol a xilulose. Deste modo, um dos fatores importantes para a produção microbiológica de xilitol é a espécie do microrganismo empregado. Destaca-se, entretanto, que quando microrganismos são empregados para a produção de xilitol por fermentação, usando-se de seus complexos sistemas metabólicos multienzimáticos integrados, parte da xilose é necessariamente utilizada em vias como formação de biomassa e manutenção celular. Mesmo quando as condições são direcionadas para acúmulo de xilitol no meio, parte deste será transformado em xilulose e conseqüentemente utilizada em outras vias. De fato, para a levedura *Candida guilliermondii*, por exemplo, Barbosa et al. (1988) calcularam um fator de rendimento teórico de $0,917 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$, sendo que, na prática, pode-se alcançar valores bem próximos desse, cerca de 90-95%, do mesmo.

Figura 3. Esquema simplificado do metabolismo de xilose por leveduras: PPP – via pentose fosfato; EMP – via Embden-Meyrhopf-Parnas; Rib5P – ribose 5-fosfato; S7P – sedoheptulose 7-fosfato; Gliceral3P – gliceraldeído 3-fosfato; F6P – frutose 6-fosfato; Eri 4P – eritrose 4-fosfato. Adaptado de Ostergaard, Olsson e Nielson, 2000.

2.1.4 Produção enzimática

Tendo em vista os processos descritos anteriormente, suas vantagens e desvantagens, uma nova tecnologia para produção de xilitol foi proposta no presente trabalho no qual a tecnologia enzimática de produção de xilitol resultou em maiores fatores de rendimento e produtividade. A TABELA 1 apresenta a comparação de características entre cada processo de produção de xilitol mencionado. Nesse processo, são empregadas a enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.2.1) e a coenzima NAD(P)H as quais promovem a redução de xilose a xilitol.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos processos de produção de xilitol.

Tipo de processo	Vantagens	Desvantagens
Químico	Otimizado	Alto custo
	Maior produtividade	Uso de recursos naturais
Microbiológico	Menor custo	
	Sustentável	Baixa produtividade
	Maior eficiência	
Enzimático	Sustentável	
	Máxima eficiência	Custo*
	Maior produtividade	

*Como se trata de um processo novo ainda não foram realizados análises de custo.

Como pode ser observado na TABELA 1, o processo de produção enzimática de xilitol é a união sinérgica das vantagens das outras duas vias. Contudo, por se tratar de uma tecnologia em início de estudo ainda há dúvidas sobre sua viabilidade econômica, principalmente associada aos custos das enzimas e da coenzima.

Neste trabalho empregou-se a enzima xilose redutase proveniente de *Candida guilliermondii* FTI 20037 a qual é NADPH-dependente com sistema de regeneração enzimático *in situ* da coenzima. Um esquema da reação com sistema de regeneração é apresentado na FIGURA 4.

Figura 4. Esquema da reação de enzimática para produção de xilitol com sistema de regeneração enzimático de NADPH.

Além disso, o emprego da XR isolada possibilitou aumento na produtividade comparando-se ao processo fermentativo, uma vez que limitações na transferência de massa

são diminuídas em reatores enzimáticos. Entretanto, a redução enzimática da xilose pela XR requer como coenzima o NAD(P)H, o que limita o emprego da mesma em um processo de síntese de xilitol. As coenzimas são usualmente caras e disponíveis apenas em pequenas quantidades (CHEETAM, 1985). Este fato indica a necessidade de regeneração *in situ* dos mesmos durante o processo. De fato, trabalhos sobre diferentes métodos de regeneração das coenzimas NAD(P)H, e de outros, foram encontrados na literatura, os quais serão detalhados nesta revisão.

Para a produção enzimática de xilitol, uma alternativa é o uso da XR de *Candida guilliermondii* FTI 20037, uma levedura que tem sido bastante relatada para a produção de xilitol por via fermentativa (FARIA; PEREIRA; NÓBREGA, 2002; SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2003). Destaca-se que recentemente foi desenvolvida uma técnica para a purificação desta enzima, com ótimos rendimentos, usando-se a técnica de extração líquido-líquido por micelas reversas (CORTEZ, 2002; CORTEZ et al., 2004). Neste trabalho, as células foram rompidas por sonicação e a XR foi separada por extração em micelas reversas, usando-se como tensoativos BDBAC, CTAB e AOT. Observou-se que a XR foi recuperada com rendimentos superiores a 90% na fase aquosa de reextração, tendo sido também caracterizados parâmetros como temperatura ótima para atividade e estabilidade enzimática. Considerando-se estes resultados incluiu-se também como objetivo do presente trabalho a aplicação desta enzima na produção de xilitol.

2.2 XILOSE REDUTASE (XR)

A enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21) pertence à superfamília das aldo-ceto redutases, sendo que é uma oxirredutase NAD(P)H-dependente. A XR proveniente da *Candida guilliermondii* FTI 20037, levedura usada neste projeto, tem uma afinidade maior pela coenzima na forma de NADPH conforme já demonstrado (SILVA et al., 1996).

Esta enzima está presente em algumas linhagens de leveduras e fungos, sendo que uma relação de alguns microorganismos capazes de sintetizar a xilose redutase (XR) é representada na TABELA 2, adaptada de Kitpreechavanich et al. (1984).

Tabela 2 - Relação de microrganismos produtores de xilose redutase

Microrganismo	Atividade da Xilose Redutase (U.mg ⁻¹ de proteína)
<i>Candida pelliculosa</i>	1,73
<i>C. pelliculosa</i> var. <i>acetaetherius</i>	0,09
<i>C. utilis</i>	0,26
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	1,10
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,16
<i>Hansenula anomala</i> Y1	0,09
<i>Hormoacus platypoides</i> AM 93	0,43
<i>Pichia nakazawae</i>	0,24

Adaptado de Kitpreechavanich et al. (1984)

A enzima xilose redutase tem um papel fundamental no metabolismo microbiano, uma vez que ela permite o aproveitamento de xilose como fonte de energia. A XR realiza o primeiro passo metabólico para a utilização da xilose em diversos microrganismos, catalisando a reação de redução da xilose (aldose) a xilitol (álcool) com auxílio da coenzima NAD(P)H, como doador de elétrons.

A massa molar da xilose redutase pode variar muito dependendo do microrganismo de origem, sendo que pode alcançar valores de 30 a 70 kDa. Segundo Cortez (2002), a xilose redutase presente na *Candida guilliermondii* FTI 20037 é composta por uma ou duas subunidades de 30-60 kDa. Em outro trabalho, Kratzer et al. (2004) verificaram que a xilose redutase de *Candida tenuis* tem por volta de 36 kDa. Estudos recentes comprovaram que são possíveis diversos tipos de xilose redutase quanto à estrutura, podendo ser monomérica ou dimérica (WILSON et al., 2002), dependendo do microorganismo.

No trabalho de Wilson et al. (2002) foi proposta uma estrutura tridimensional para a enzima xilose redutase proveniente de *Candida tenuis*, conforme apresentado na FIGURA 5. Em relação ao ponto isoelétrico, a XR de *Candida tropicalis* apresenta este valor em torno de 4,00 (YOKOYAMA et al., 1995).

Para estudos cinéticos, é comum considerar a XR uma enzima que se liga a dois substratos distintos, xilose e coenzima. Neste caso, seu mecanismo de ação é mais complexo do que o de enzimas que utilizam apenas um substrato. Alguns autores investigaram este

mecanismo. Rawat e Rao (1996) verificaram que para a XR de *Neurospora crassa*, o mecanismo de ação é do tipo bi-bi iso-ordenado, no qual a XR precisa se ligar primeiramente com a coenzima para somente depois se ligar a xilose e completar a reação. O mesmo mecanismo foi encontrado por Mayr et al. (2001), para XR de *Candida tenuis*. O mecanismo proposto por estes autores pode ser observado na FIGURA 6, na qual o primeiro passo da reação não é mostrado (ligação da coenzima com a enzima XR).

Figura 5. Estrutura da holoenzima xilose redutase encontrada em *Candida tenuis* proposto por Wilson et al. (2002).

Figura 6. Mecanismo de ação da enzima xilose redutase do tipo bi-bi ordenado, proposto por Mayr et al. (2001).

Nos últimos anos com o crescente interesse na busca de energias alternativas e biocombustíveis, a xilose redutase se tornou alvo de pesquisas, não apenas pela produção de xilitol, mas pela possibilidade de incorporá-la em produtores de etanol, tornando estes microrganismos capazes de utilizar a xilose como fonte de carbono para a produção deste álcool. De fato, vários trabalhos têm sido publicados sobre a modificação genética para

possibilitar que os mesmos produzam xilose redutase (BAEA et al., 2004; SUZUKI et al., 1999; WOODYER et al., 2005) visando tanto a produção tanto de xilitol como de etanol.

Contudo, deve-se salientar que a viabilidade de qualquer processo que envolve enzimas redutivas depende de um adequado sistema de regeneração da coenzima correspondente.

2.3 MÉTODOS DE REGENERAÇÃO DE COENZIMA NAD(P)H EM PROCESSOS ENZIMÁTICOS

As coenzimas constituem um fator limitante nas reações de biocatálise. Deste modo, a utilização de enzimas isoladas, especialmente as intracelulares que requerem a adição destas moléculas, tornam estas reações menos atrativas do ponto de vista econômico, caso não haja regeneração *in situ* das coenzimas utilizados.

Segundo Mertens et al. (2003), a regeneração de NADPH pode ser feita por via química, eletroquímica ou enzimática e mais recentemente foi publicado um trabalho (AKSU; ARENDS; HOLLMANN, 2009) envolvendo método químico com enzimático. Os processos químicos e eletroquímicos apresentam como problemas a baixa seletividade e a ocorrência de reações secundárias indesejáveis (CHENAULT; WHITESIDES, 1987; MERTENS et al., 2003). Processos eletroquímicos indiretos podem contornar estes problemas pelo uso de mediadores, os quais, entretanto, dificultam o processo de purificação e recuperação do produto (RUPPERT; HERRMANN; STECKHAN, 1988). Eguchi, Nishio e Nagai (1983) reportaram a utilização de bactérias metanogênicas para a regeneração de NADPH usando formato ou hidrogênio como substrato. Há, neste caso, entretanto, limitações relativas à necessidade de cultivo estritamente anaeróbico das bactérias. Com relação à regeneração enzimática tem sido a mais empregada devido à alta especificidade pelas coenzimas e eficiência. As duas estratégias para regeneração de coenzima por via enzimática são: sistemas acoplados ao substrato (FIGURA 7a) e sistemas acoplados à enzima (FIGURA 7b).

Figura 7. Sistemas enzimáticos de regeneração de coenzimas (KROUTIL et al, 2004).

Segundo Kroutil et al. (2004), o sistema acoplado ao substrato utiliza uma única enzima, com transformação simultânea do substrato e do co-substrato. Entretanto, o co-substrato deve ser adicionado em maior quantidade do que o substrato buscando-se o deslocamento favorável do equilíbrio das reações. Como consequência, estes sistemas são comumente impedidos por inibição pelo co-substrato. Buscando-se contornar este problema, sistemas acoplados à enzima utilizam um segundo biocatalisador para a reação de regeneração do coenzima.

Para a produção enzimática de xilitol, Kitpreechavanich et al. (1984) reportaram a síntese deste poliálcool a partir de xilose comercial pela XR de *Candida pelliculosa* (usando células intactas ou extratos livres de células) acoplado a um sistema de óxido redutase de *Methanobacterium* sp visando à redução do NADP usando H_2 como doador de elétrons. O substrato foi convertido estequiometricamente a xilitol com um consumo equivalente de NADPH, usando-se relações coenzima/xilose acima de 1/30, sendo que a coenzima foi regenerada e retida em um reator de membrana. Em outro trabalho, Nidetzky et al (1996) estudaram a conversão de xilose em xilitol usando uma XR NADH-dependente obtida de *Candida tenuis*. A redução da xilose foi acoplada a uma oxidação enzimática de D-glicose ou D-xilose pela glicose desidrogenase obtida do cultivo de *Bacillus cereus*.

Uma enzima que apresenta potencial para uso em sistemas com regeneração de NADPH é a formato desidrogenase (E.C. 1.2.1.2) de uma espécie recombinante de *Pseudomonas* sp., conforme descrito por Seelbach et al. (1996). Esta enzima, disponível comercialmente, catalisa a oxidação de formato a gás carbônico, usando como coenzima NADP. De fato, a formato desidrogenase tem sido descrita como uma alternativa econômica para recuperação de NADH no meio reacional (ITOH; MIZUGUCHI; MABUCHI, 1999; KULA, 1994). Essa enzima recombinante foi descrita como usando preferencialmente NADP

(SEELBACH et al., 1996), o que proporcionou um aumento nas possibilidades de seu uso. Entretanto, limitações para uso deste sistema de regeneração foram encontradas por Nidetzky et al. (1996). Estes autores observaram que a atividade da xilose redutase utilizada (XR-NADH-dependente de *Candida tenuis*) era fortemente inibida na presença de formato, o que os motivou à busca de um sistema de regeneração alternativo. No caso, foram testados sistemas com glicose desidrogenase, sendo obtido, como subproduto, o gluconato. Também foi testado um sistema usando apenas xilose como substrato, sendo o produto da reação catalisada por glicose desidrogenase, neste caso, o ácido xilônico.

Uma observação importante é que, para tornar o processo de produção de xilitol pela via enzimática com regeneração do coenzima NADPH *in situ* mais atrativo do ponto de vista econômico e ambiental, uma alternativa seria o uso de resíduos lignocelulósicos como fonte de xilose (substrato), tanto na etapa de produção da enzima como na própria reação enzimática. Desta forma, o presente trabalho se insere perfeitamente nos conceitos de sustentabilidade e de biotecnologia aplicada a utilização de fontes renováveis de energia.

2.4 RESÍDUOS E SUBPRODUTOS LIGNOCELULÓSICOS

Materiais lignocelulósicos são fontes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial como matéria prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (BRANCO et al., 2007; CUNHA et al., 2006; CARVALHO et al., 2004; LATIF; RAJOCA, 2001; LEE, 1997; LOUWRIER, 1998; ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2004). Estes materiais são os principais constituintes da biomassa vegetal, como a de resíduos agroflorestais, por exemplo, palha de arroz, eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar, casca de café e sabugo de milho. Quando acumulados no ambiente, podem ocasionar problemas de poluição e representam perda de valiosos recursos (KUHAD; SING, 1993). Assim, é importante que se desenvolvam técnicas para o aproveitamento de lignocelulósicos na obtenção de produtos úteis à humanidade e, com este objetivo, o emprego de processos biotecnológicos tem sido bastante estudado (CARVALHO et al., 2003; FELIPE et al., 1993; FELIPE et al., 1997; MARTINEZ et al., 2002).

A celulose é o composto natural mais abundante na natureza e predomina na madeira de folhosas e resinosas. É um homopolissacarídeo com um grau de polimerização varia de 1000 a 50000, dependendo da origem (FENGEL; WENEGER, 1989; TSAO, 1986), composto

unicamente por unidades de β -D-glucopiranosose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. A unidade estrutural é a celobiose que resulta da união de duas células de β -D-glucopiranosose com libertação de uma molécula de água. A união entre monómeros β e a conformação em cadeira das unidades de β -D-glucopiranosose permite que se formem ligações alinhadas no plano termodinamicamente estáveis. A proximidade entre as moléculas de celulose e a presença de grupos OH na sua estrutura favorecem a formação de ligações de hidrogénio entre as cadeias, que só são possíveis dada a linearidade das moléculas. Estas ligações, juntamente com as forças de van der Waals entre os vários planos, permitem que se forme uma estrutura compacta e ordenada que constitui a estrutura cristalina da celulose. As zonas cristalinas, que alternam com zonas amorfas, correspondem a cerca de dois terços da celulose presente na madeira. Apesar da natureza higroscópica das moléculas individuais de celulose, a absorção de moléculas de água só é possível nas zonas amorfas devido à falta de espaços vazios na estrutura cristalina. A cristalinidade da celulose influencia a sua reactividade ao controlar o acesso de compostos químicos ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nas regiões cristalinas. Os grupos hidroxilo são os grupos mais abundantes na molécula de celulose, seguidos pelas ligações acetal que formam o anel das piranoses. A celulose é bastante sensível à oxidação, por exemplo o dióxido de azoto converte os grupos

Este polímero natural é a substância base de muitos produtos, como papel, filmes, fibras e aditivos (FENGEL; WENEGER, 1989).

As hemiceluloses são heteropolímeros polissacarídeos com cadeias mais pequenas do que as da celulose e com uma estrutura linear ramificada. A hemicelulose age como composto de reserva e sustentação para os vegetais. Os constituintes monoméricos das hemiceluloses são sobretudo pentoses e hexoses, mas também contêm ácidos hexurónicos e desoxihexoses. As hemiceluloses de folhosas e resinosas diferem não só em percentagem mas também em composição química.

As xilanas são a família de hemiceluloses mais importante nos vegetais superiores de madeira dura (*hardwood*), no qual representam entre 15-30%, e são constituídas por uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopiranosose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, com ramificações de ácido 4-O-metilglucurónico unidos à cadeia principal por ligações $\alpha(1\rightarrow2)$. Alguns grupos OH dos carbonos C2 e C3 são substituídos por grupos O-acetil. Além destes açúcares, estas hemiceluloses apresentam pequenas quantidades de ramnose e ácido galacturónico. O grau de polimerização médio destas hemiceluloses varia entre 100-200 (FENGEL; WENEGER, 1989).

As xilanas das madeiras moles (arabino-4-O-metilglucuronoxilanas) correspondem a 10-15% da madeira, não são acetiladas e além das ramificações de ácido glucurónico possuem ainda unidades de α -L-arabinofuranose ligadas à cadeia principal por ligações glicosídicas α -(1 $\rightarrow$ 3).

As madeiras moles contêm 20-25% de mananas que têm uma cadeia principal de β -D-manopirranose e β -D-glucopirranose na proporção de 3:1, à qual estão ligadas unidades de α -D-galactopirranose por ligações glicosídicas α -(1 $\rightarrow$ 6) e grupos acetilo. Estes encontram-se normalmente nos carbonos C2 e C3 das unidades de manose, mas também podem ser encontrados nas unidades de glucose. Em madeira dura, na qual representam cerca de 3-5%, as mananas possuem uma cadeia principal não ramificada, com unidades de β -D-manopirranose e β -D-glucopirranose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), pelo que são chamadas de glucomananas. Em média existem 1,5-2 unidades de β -D-manopirranose por cada unidade de β -D-glucopirranose.

As galactanas são hemiceluloses minoritárias, que correspondem a 0,5-3% da madeira, excepto no larício onde podem atingir cerca de 25%. Normalmente as galactanas apresentam muitas ramificações. No larício, as arabinogalactanas apresentam ramificações de glucose, galactose e arabinose com várias combinações. Nas folhosas, as galactanas (ramnoarabinogalactanas) são menos ramificadas e contém unidades de ramnose. Além das xilanas, mananas e galactanas existem em algumas folhosas e resinosas pequenas quantidades de galacturanas (cerca de 1%) e arabinanas (FENGEL; WENEGER, 1989; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

As hemiceluloses não são cristalinas pelo que as ligações químicas e os grupos funcionais estão mais acessíveis ao ataque químico. Os grupos hidroxilo são os mais abundantes, seguidos das ligações acetal nos anéis dos açúcares e das ligações éster aos grupos acetilo. À semelhança da celulose, os principais processos degradativos são a hidrólise em meio ácido e a oxidação. A hidrólise ataca as ligações acetal e éster, o que em meio ácido leva à formação de ácido acético, aumentando a acidez do meio e conduzindo ao ataque de novos grupos. Oxidantes como cloro, bromo ou iodo convertem os grupos aldeído em ácidos aldónicos. As hemiceluloses são solúveis em bases e algumas, tais como as glucomananas com alto teor em galactose, são solúveis em água. As hemiceluloses são mais susceptíveis à biodegradação que a celulose pois são mais facilmente atacadas pelas enzimas de fungos, sendo atacadas por fungos da podridão branca, castanha e branda. Altas quantidades de pentosanas estão presentes em resíduos agrícolas (FENGEL; WENEGER, 1989; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

Outra fração dos materiais lignocelulósicos é a lignina, uma macromolécula polifenólica amorfa composta principalmente por unidades de fenilpropano, cuja estrutura provém da polimerização oxidativa, iniciada por enzimas, dos seguintes precursores primários: álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-p-cumárico. Na biomassa vegetal, está associada à celulose e hemicelulose, o que dificulta a degradação destes materiais uma vez que a lignina confere rigidez e baixa reatividade ao conjunto de fibras dos vegetais. Além disso, tecidos lignificados resistem ao ataque de microrganismos, impedindo a penetração de enzimas degradantes no tecido vegetal (D'ALMEIDA, 1988; FENGEL; WENEGER, 1989).

Uma das limitações para o aproveitamento integral de todas as frações dos resíduos lignocelulósicos é a própria estrutura da biomassa. Geralmente, é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose ou a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento e deslignificação. Sem este tratamento preliminar a biomassa se torna difícil de ser aproveitada em processos industriais, pois a associação de suas frações constituintes lhe confere grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos (PURI; PEARCE, 1986; FENGEL; WENEGER, 1989). Segundo Parajó et al. (1998), a separação simultânea dos três principais grupos de polímeros da biomassa em sua forma polimérica não é possível com o uso dos procedimentos convencionais de separação, como cristalização, precipitação ou extração. Pelo menos um dos polímeros é degradado por tratamentos baseados nas diferenças em suas propriedades químicas. Celulose e hemicelulose, por exemplo, são menos susceptíveis à oxidação que a lignina, mas em contraste, ambas podem ser hidrolisadas por ácidos, ao contrário do polímero fenólico que permanece como um resíduo sólido no meio ácido.

Diversos métodos têm sido empregados para hidrólise dos componentes dos materiais lignocelulósicos (SUN; CHENG, 2002), tornando-os úteis para uso em bioprocessos. Como exemplo destes métodos, pode-se citar a hidrólise alcalina (FENGEL; WENEGER, 1989); a explosão a vapor (SILVA, 1989), a hidrólise enzimática (TSAO, 1986) e a hidrólise ácida (ALVES et al., 1998).

A fração hemicelulósica, por apresentar uma estrutura aberta, tem a difusão do catalisador facilitada dentro da cadeia polimérica, o que aumenta o rendimento das reações de hidrólise. Este fato, associado a sua estrutura heterogênea e de baixo grau de polimerização, faz com que este constituinte da biomassa seja bastante atrativo para uso em processos fermentativos (JEFFRIES, 1983; MAGGE; KOSARIC, 1985).

Ácidos diluídos podem ser usados como catalisadores de uma hidrólise limitada chamada pré-hidrólise (AGUILAR et al., 2002). Esta consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, permanecendo a celulose e a lignina quase inalteradas (celulignina). A pré-hidrólise ácida tem sido a mais eficiente na obtenção de açúcares a partir da fração hemicelulósica para uso como fonte de carbono em fermentações, sendo os ácidos sulfúrico e clorídrico os mais comumente empregados para este fim (FENGEL; WENEGER, 1989; PESSOA Jr., 1991; PARAJÓ et al., 1998, HERRERA et al., 2003; ROBERTO et al., 2003). A pré-hidrólise é realizada sob condições brandas e é vantajosa não apenas para a obtenção de hidrolisados ricos em xilose, prevenindo a formação de produtos de degradação, mas também porque aumenta a susceptibilidade da celulose à hidrólise subsequente (MAGEE; KOSARIC, 1985; PARAJÓ et al., 1998). É um processo já empregado para preparação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, material alvo desse projeto.

2.4.1 Bagaço de cana de açúcar

No Brasil um dos resíduos/subprodutos lignocelulósicos mais abundantes, para o qual novas tecnologias de aproveitamento são necessárias, é o bagaço de cana-de-açúcar gerado após o processamento da cana-de-açúcar para extração do caldo.

A TABELA 3 apresenta a produção estimada de cana-de-açúcar em 2008 e 2009 para todo o território Brasileiro, subdividido em regiões e estados do sudeste. A safra de cana-de-açúcar de 2009 foi estimada em 629 milhões de toneladas superior em 10 % à da safra passada, que foi de 572 milhões de toneladas. A região sudeste se destaca com 63 % do total da produção nacional, sendo apenas o estado de São Paulo responsável por 342,9 milhões de toneladas (55 % do total). Do total produzido, 347,8 milhões de toneladas (55.3 %) foram destinadas a produção de etanol e o restante para produção de açúcar (sacarose) (CONAB, 2009).

Tabela 3 – Produção estimada de cana-de-açúcar em 2008 e 2009 por região e estados do Sudeste do Brasil.

REGIÃO/Estado	Produção (milhões de toneladas)	
	2008	2009
NORTE	1.468	1.555
NORDESTE	64.416	61.904
CENTRO-OESTE	66.510	88.442
SUL	44.320	53.768
SUDESTE	395.094	423.353
São Paulo	342.910	364.132
Rio de Janeiro	3.556	3.556
Minas Gerais	44.208	51.321
Espírito Santo	4.419	4.343
BRASIL	571.809	629.024

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) 3º Levantamento, Setembro de 2009.

A partir de uma tonelada de cana-de-açúcar processada 135 kg (massa seca) de bagaço é formado (BAUDEL; ZAROR; ABREU, 2005). De acordo com Frollini e Pimenta (1997), metade desse bagaço deve ser queimado para atender a necessidade energética da planta, na verdade, as indústrias de açúcar-álcool brasileiras utilizam cerca de 75-90 % de bagaço de cana-de-açúcar para vender eletricidade para cidades vizinhas. De fato, apenas ano passado, em 2009, foram gerados 84,9 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil e que pelo menos 21,2 milhões de toneladas foram armazenados ou descartados diretamente no meio ambiente. A FIGURA 8 apresenta o empilhamento de bagaço da União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA) ilustra o problema do acúmulo de bagaço.

Figura 8. Fotografia publicada da reserva de bagaço de cana-de-açúcar da União de Indústrias de cana-açúcar (RABELLO; YONEYA, 2008).

O excedente de bagaço por possuir baixo valor econômico acumula-se de tal forma a ser considerado um problema ambiental, sendo que o seu acúmulo por longos períodos pode até mesmo desencadear combustão espontânea, oferecendo riscos à usina e regiões vizinhas (DAWSON; DIXON; INKERMAN, 1990). Além de geração de energia, o bagaço pode ser usado para fabricação de papel, papelão, ração animal e fertilizante (PANDEY et al., 2000) contudo esses produtos não contribuem significativamente para o aproveitamento desse resíduo.

É conhecido que o bagaço de cana-de-açúcar é rico em compostos poliméricos como celulose, hemicelulose e lignina. A TABELA 4 apresenta a composição média do bagaço *in natura* (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009).

De acordo com a TABELA 4 um terço do bagaço de cana-de-açúcar é composto por hemicelulose, predominantemente L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana que é basicamente uma cadeia principal de xilose. Portanto, é importante desenvolver “tecnologias verdes” para o aproveitamento do bagaço para produzir bens úteis para a humanidade e reforçando o conceito de sustentabilidade.

Tabela 4 – Composição media do bagaço de cana-de-açúcar em massa seca

Fração/Componente	% (m.m⁻¹)
Hemicelulose	31,2
Xilose	25,2
Celulose	42,4
Lignina	19,6
Cinzas	1,6
Extrativos	4,1

Fonte: (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009).

Através de um mecanismo de hidrólise química, a fração hemicelulósica é separada e os açúcares como xilose, glicose e arabinose são liberados. Esses açúcares podem ser utilizados em diversos processos biotecnológicos (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER et al., 2005; PANDEY et al., 2000).

Assim, é importante o desenvolvimento de novas técnicas visando ao aproveitamento deste resíduo agroindustrial. Entre as alternativas que têm sido pesquisadas, uma que tem se mostrado bastante promissora é o uso de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilitol (BRANCO et al., 2007; CARVALHO et al., 2004; CUNHA et al., 2006; SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2003; MUSSATO; ROBERTO, 2003; PANDEY et al., 2000) e etanol (KUMAR et al., 2009; ZHAO; XIA, 2009; HUANG et al., 2009).

2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANA APLICADOS A BIOTECNOLOGIA

O campo da biotecnologia vem crescendo cada vez mais gerando novas tecnologias. Com esses avanços a necessidade do desenvolvimento de ciências auxiliares, como os processos de separação com membranas, é de suma importância. Atualmente tais processos são largamente utilizados nesta área em função a sua grande diversidade de aplicações.

A biotecnologia é uma área do conhecimento multidisciplinar de muito interesse, uma vez que aborda assuntos relacionados com o bem estar da humanidade e de seu ecossistema. Por exemplo, estudos de reaproveitamento de resíduos industriais, tanto na remediação

(tratamentos de efluentes) como na produção de insumos de interesse (bioetanol) e; produção de fármacos em geral.

No entanto, para que estes processos ocorram com sucesso uma ou mais etapas de concentração, purificação e extração são necessárias. Neste ponto é que se destacam os processos de separação por membranas (PSM).

Por definição, processos de separação por membrana é uma operação unitária que tem como objetivo separar um ou mais componentes presentes em um solvente através de um elemento seletivo, a membrana. Deste modo, o principal princípio de separação das partículas é pelo seu tamanho, macro, micro ou molecular. O processo pode ser conduzido de duas maneiras, *dead end* ou *tangential crossflow*, apresentadas na FIGURA 9.

Figura 9. Esquemas dos tipos de modo de condução de processos de separação com membrana a) *Tangential crossflow* e b) *Dead end* (SPECTRUMLABS, 2009).

Para este trabalho foi escolhido trabalhar com o tipo *dead end* uma vez que o modo de operação é mais simples e possui menos variáveis operacionais também. No entanto para evitar o problema de rápido *fouling* (bloqueio da membrana), típico em *dead end*, operou-se com um módulo tipo *stirred cell* (célula de agitação). Esse módulo permite a homogeneização da alimentação justo acima da membrana o que retarda a formação da polarização de concentração e consequentemente o *fouling*.

As membranas, que na sua maioria são feitas de material polimérico podem ser divididas em várias classes dependendo do parâmetro escolhido, a FIGURA 10 apresenta uma classificação segundo Mierzwa et al. (2008).

Figura 10. Classificação dos processos de separação com membranas pelo tamanho do poro da membrana (MIERZWA et al., 2008).

Em biotecnologia, o parâmetro mais adequado para dividir em classes os processos de separação com membrana é pelo tamanho de poro da membrana, uma vez que existe grande distinção dos processos quando se trata de tamanho das partículas (ou resultado) de interesse. Por exemplo, quando se deseja clarificar utilizam-se membranas de microfiltração uma vez que o tamanho das partículas é relativamente grande, entretanto para separação de proteínas as membranas mais adequadas são as de ultrafiltração.

Nesse trabalho foram empregadas membranas de ultra e nanofiltração, uma vez que as moléculas alvo para retenção eram as enzimas XR e GDH e a coenzima NADPH (740 Da).

2.5.1 Processo de ultrafiltração

Este é o tipo de processo de separação por membrana mais usado na biotecnologia, separam moléculas entre 10^6 Da até 1 kDa e utilizam uma pressão de trabalho de até 10 atm. As maiores das moléculas a serem separadas já não podem ser mais vistas em microscópio ótico, a grande parte só pode ser observada por microscópio eletrônico. Exemplos: Proteínas, enzimas, vírus, polissacarídeos, polifenóis, colóides, óleos, lignina, aminoácidos modificados etc.

O material usado para a construção das membranas são praticamente os mesmos que os das membranas para microfiltração, no entanto algumas modificações precisam ser feitas em relação à resistência mecânica, uma vez que estas precisam suportar maiores pressões. Por este motivo tem-se estudado novos materiais mais resistentes como a cerâmica e ligas metálicas. As mais usadas são de celulose, polisulfona e polietersulfona.

Este processo é usado amplamente para na biotecnologia para concentração de soluções enzimáticas. A grande aplicação direta está na purificação ou separação de proteínas e enzimas. São utilizadas também para extração de matérias-primas para a biotecnologia, separação de bioprodutos e em biorreatores de membrana.

No trabalho de Li, Shabazi e Kadzere (2006) utilizou-se uma membrana de ultrafiltração, em escala laboratorial, para a separação de bactérias e proteínas resultante de uma fermentação de soro de queijo. O resultado desejado foi obtido usando uma membrana de 20 kDa (Tamanho médio de poro-TMP), a qual reteu toda massa celular com um bom fluxo e pouca formação de torta. Em outro trabalho Li, Youravang e H-Kittikun (2006) extraíram duas enzimas (Proteases) de interesse para a indústria alimentícia. Estas foram separadas do extrato da bexiga de atum através de uma membrana de celulose de 30kDa. Um resultado interessante, não esperado, foi o aumento na pureza das enzimas cerca de 18 vezes. No entanto, foram retidos muitos componentes indesejados (gordura, células sangüíneas, dentre outros.) na membrana, diminuindo assim o fluxo. Uma solução sugerida pelo o autor, para o uso industrial, seria o uso de etapas anteriores de separação por membrana de maior tamanho de poro de membrana (microfiltração, por exemplo). Existem vários os trabalhos com separação/purificação de proteínas e enzimas.

Vikbjerg et al. (2006) utilizaram a ultrafiltração para purificar fosfolipídios estruturados de ácidos graxos, uma vez que estes fosfolipídios têm muitas utilidades nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica devido as suas características anfótera. Um dos problemas encontrados foi à resistência das membranas a solventes orgânicos (hexano),

dentre as membranas testadas a de polisulfona sobreposta num suporte de politereftalato de etileno foi a que melhor resistiu ao solvente. No trabalho de Nabarlantz et al. (2006) realizou-se a purificação da hidrólise de um resíduo agrícola para obtenção de xilooligosacarídeos, compostos que voltaram ao mercado mundial depois da descoberta de suas propriedades prébióticas. Foram testadas membranas de 1 a 8 kDa de tamanho de poro sob pressões de 2,6 a 9 atm. Os autores concluíram que para uma boa purificação dos xilooligosacarídeos é necessário o uso da membrana de menor corte sob um baixo fluxo.

No artigo seguinte Wallberg et al. (2006) promoveu a separação da lignina do licor do processo Kraft através da ultrafiltração. Foram utilizadas membranas de cerâmica devido à necessidade de resistência a temperatura do caldo (135-145°C). Dois cortes foram testado 5 e 15 kDa. Sendo que o melhor resultado foi obtido com a membrana de 5 kDa na qual obteve-se uma retenção de 30% de lignina.

Membranas de ultrafiltração são comumente utilizadas em processos envolvendo reações catalisadas por enzimas uma vez que ao final do processo ou durante pode-se separá-las facilmente do meio reacional. No trabalho de Grześkoiwak-Przywecka e Słomińska (2006) a hidrólise enzimática da maltodextrina para obtenção de um caldo de maltose foi realizada em um reator de tanque agitado sob regime contínuo. Um módulo com membranas tubulares de cerâmica foi acoplado para que o produto fosse retirado do meio reacional, sem perda da enzima, já que o mesmo funciona como inibidor da reação. Foram usadas membranas de 3 a 15 kDa sob diversas pressões e fluxos. O máximo nível de maltose foi obtido utilizando a membrana com corte de 5 kDa.

Existem outras aplicações pra estas membranas, no entanto não sejam o foco das pesquisas atuais. Por exemplo: A ultrafiltração também é usada em de sucos de frutas (CASSANO et al., 2006) com a finalidade de concentrar o mesmo; no tratamento de efluentes (LOBO et al., 2006; IQBAL et al., 2006) é utilizada para a separação de moléculas menores, como o arsenato.

Pode-se dizer que os processos de ultrafiltração já se estabeleceram na biotecnologia, principalmente no ramo da enzimologia, sendo que em alguns casos se torna indispensável, tanto técnica como economicamente, o seu uso. A ultrafiltração é a classe dentro dos processos de separação com membrana que tem e sempre terá, devido às inovações e necessidades de novos produtos, espaço em bioseparações.

2.5.2 Processo de nanofiltração

Esta classe de processo de separação com membrana possui ainda pouca utilização na biotecnologia, por se tratar da mais nova. No entanto, vem encontrando espaço em processos tradicionais e vem viabilizando tecnicamente outros, uma vez que sua faixa de atuação compreende moléculas do tamanho de mono (açúcares), di, tri e polissacarídeos, assim como produtos de redução de alguns monossacarídeos (alcoóis: sorbitol, manitol e xilitol) de grande interesse industrial. Entram nessa classe também ácidos orgânicos de baixa massa molecular produzidos pela fermentação de certos microorganismos (acético, butírico e cítrico). Produtos já bem conhecidos e de difícil separação, por terem características físico-químicas bem semelhantes à de sua matéria-prima.

Na nanofiltração é possível separar moléculas entre 100 Da e 1 kDa, altas pressões de trabalho são empregadas (até 30 atm).

O material mais usado continua sendo o polimérico, no entanto a busca de compósitos e outros materiais como a cerâmica e ligas metálicas com a finalidade de aumentar a resistência mecânica, consequentemente o tempo de vida da mesma, é incessante.

A maior parte literatura sobre nanofiltração em bioprocessos trata do *downstream* de bioprodutos. Os demais trabalhos, não menos importantes, são em tratamento de efluentes, indústria de sucos e extração/concentração de soluções.

No trabalho realizado por Tessier et al. (2005) a benzilpenicilina, um dos antibióticos mais usados no mundo, obtido por fermentação de fungos foi separada e purificada (concentrada) por membranas de ultra e nanofiltração. Um excelente valor de antibiótico foi recuperado 97,4%, sendo o rendimento de extração de 92,4%. Outro resultado importante foi a não formação de emulsão, pois esta dificulta as etapas finais de purificação.

Ácido láctico é um produto de muito interesse, atualmente indispensável, para as indústrias alimentícias (flavorizante e conservante) e farmacêuticas. Bouchoux et al. (2006) investigou o uso do processo de nanofiltração antes da última etapa de purificação do ácido láctico produzido por fermentação. A última etapa (eletrodialise bipolar) sofre interferências (Queda na eficiência) e tem suas membranas danificadas (Diminuição do tempo de vida) devido a íons bivalentes (Cálcio e magnésio). Por este motivo a utilização de membranas de nanofiltração pode: promover uma pré-purificação, uma vez que tem pouca afinidade pelo ácido láctico e pode reter os mono e dissacarídeos residuais da fermentação e; reduzir a quantidade de íons bivalentes devido a grande rejeição por essas espécies (Efeito Donnan). Os resultados demonstram o potencial uso da nanofiltração como opção tanto de pré-

purificação como para a retirada de cátions bivalentes (cerca de 70%) no processo de purificação do ácido láctico.

Outras substâncias de muito interesse para a área alimentícia, como aditivos, são os aminoácidos, uma vez que são essenciais para a dieta humana e animal. No entanto o processo fermentativo gera uma mistura de quatro ou mais aminoácidos, tornando difícil a purificação de um de ou mais, e ainda temos o problema da similaridade de características físico-químicas. No trabalho de Hong e Bruening (2006) utilizam-se membranas de nanofiltração para a obtenção de glicina a partir de uma mistura de cinco aminoácidos resultante de um processo fermentativo. Este trabalho se destaca por servir como exemplo de importância de , devido a não possibilidade da separação dos mesmos por métodos convencionais uma vez que estes aminoácidos são substâncias de muita similaridade físico-química. Sendo assim, o único modo de separá-los seria pelo seu tamanho molecular. Ao final do trabalho os autores concluíram que, em princípio, aminoácidos neutros podem ser imediatamente separados por nanofiltração de acordo com seu tamanho molecular.

Outros trabalhos encontrados se referem a tratamentos de efluentes, nos quais a nanofiltração é utilizada para retirada de pequenas partículas e íons, visando sua reutilização (MÄNTÄRRI et al., 2006). Trabalhos na área de concentração de soluções de matéria-prima (MURTHY et al., 2005) ou produtos (XU et al., 2005; XU; WANG 2005) de interesse também foram encontrados.

Apesar de ser uma técnica nova dentro dos PSM a nanofiltração já traz consigo a inovação e novas possibilidades em processos que exigem a separação de moléculas, uma vez que pode promover a purificação de compostos de massa molecular intermediária a ultrafiltração e osmose inversa. Deve-se ressaltar que a nanofiltração é, atualmente, o processo de separação por membrana de maior potencial de crescimento na área biotecnológica, tendo em vista que este proporciona a substituição de operações de separação de baixo rendimento e agressivas e a viabilidade de separar produtos até o momento de complexa purificação.

Deste modo, pode-se concluir que os processos de separação de membrana são ferramentas úteis e cada vez mais empregadas na biotecnologia.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Gerar contribuição científica nos estudos de processos multienzimáticos e regeneração enzimática de coenzima e estabelecer base de conhecimento para a viabilização técnica e econômica de produção de xilitol pela via enzimática a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de xilose redutase por *Candida guilliermondii* FTI 20037 em meio sintético sob regime de batelada;
- Pré-purificar o extrato enzimático empregando a técnica de micelas reversas;
- Selecionar um sistema de regeneração enzimático *in situ* de coenzima NADPH para ser utilizado em conjunto com a produção enzimática de xilitol;
- Definir uma região de estudo adequada para o estudo da produção enzimática de xilitol;
- Avaliar e selecionar variáveis na produção enzimática de xilitol;
- Otimizar a produção enzimática de xilitol em meio sintético sob regime de batelada;
- Selecionar membranas de ultra e nanofiltração para retenção de coenzima NADPH e enzimas envolvidas visando à viabilidade econômica do processo;
- Avaliar o desempenho de xilose redutase produzida em meio de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em comparação com a obtida em meio sintético;
- Utilizar o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de xilose e glicose na produção enzimática de xilitol e comparar com os resultados em meio sintético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE XILOSE REDUTASE

4.1.1 Inóculo

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, proveniente da coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL-USP) e mantida em meio ágar extrato de malte à 4°C.

O inóculo foi preparado por cultivo da levedura em frascos tipo *Erlenmeyer* de 125 ml contendo 50 ml de meio sintético composto de 30 g.l⁻¹ de xilose, 3 g.l⁻¹ de sulfato de amônio, 0,1 g.l⁻¹ de cloreto de cálcio e 10 % v.v⁻¹ de extrato de farelo de arroz. As células cultivadas em incubadora com movimento rotatório de 200 rpm e 30 °C por 24 horas foram recuperadas por centrifugação a 2000 x g por 20 min, lavadas e ressuspensas em água destilada de modo a se obter uma suspensão celular com elevada densidade.

4.1.2 Produção da xilose redutase em meio sintético e em hidrolisado

As fermentações para a obtenção da enzima XR foram realizadas em sistema descontínuo em fermentador BIOFLO III de 1,5 l (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, E.U.A.). O volume foi de 1,25 l sendo que a composição do meio foi a mesma do inóculo, a não ser a concentração de xilose 50 g.l⁻¹ e a adição de 0,1% v.v⁻¹ de antiespumante (SQ 4010, ADONEX, São Paulo, Brasil). A concentração inicial celular (massa seca) foi de 1,0 g.L⁻¹. A temperatura e o pH foram mantidos constantes durante o processo a 30 °C e 5,5, respectivamente. Foi empregado um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) de 50 h⁻¹.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foi determinado pela metodologia de *gassing-out* (PIRT, 1975), descrita em Lima et al., (2001): inicialmente, o oxigênio do meio de fermentação (isento de células) foi retirado através do borbulhamento com nitrogênio até que a concentração de oxigênio dissolvido fosse reduzida à zero. O meio líquido foi então aerado com a vazão de ar desejada, sendo que o aumento na concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo foi monitorado com eletrodo de oxigênio e os dados obtidos foram aplicados à EQUAÇÃO 1 em sua forma integrada. O valor de K_{La} foi

determinado como sendo o inverso do coeficiente de regressão linear e transformado para a unidade h^{-1} .

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L a \cdot (C^* - C_{O_2}) \quad (1)$$

Na qual:

C_{O_2} = Concentração de oxigênio dissolvido (%); C^* = concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio (%); e t = tempo (h).

Para as fermentações em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de XR foi empregado hidrolisado concentrado (3x) e tratado, sendo que os demais componentes do meio de cultivo e condições experimentais foram as mesmos que para as fermentações em meio sintético, descritas acima.

4.2 PRÉ-PURIFICAÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE

4.2.1 Rompimento celular

Após cultivo, as células de *Candida guilliermodii* FTI 20037 foram coletadas e separadas para rompimento para obtenção de extrato enzimático. As células microbianas foram rompidas sob agitação em vórtice com auxílio de pérolas de vidro em tubos cônicos de 15 ml de volume útil. As condições utilizadas foram aquelas determinadas por Gurpilhares, (2004) e Gurpilhares et al. (2006). Colocou-se em tubo tipo *falcon* (fundo cônico, 15 ml) 3,0 ml de esferas de vidro (diâmetro médio de 0,50 mm) e adicionou-se o mesmo volume de suspensão celular contendo $11,6 \text{ g.l}^{-1}$, suspensas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Após o resfriamento da mistura em banho de gelo, levou-se o tubo para a agitação em vórtice. Foram realizados 5 ciclos de rompimento, sendo que cada ciclo correspondeu a 1 minuto de agitação seguido da imersão do tubo em banho de gelo por 30 segundos. Ao final, os fragmentos celulares (debris) foram removidos por centrifugação a $10000g$ por 15 min, a 4°C . O sobrenadante foi retirado para os ensaios de atividade enzimática e purificação.

4.2.2 Pré-purificação do extrato enzimático por micelas reversas

A XR foi extraída em sistema com micelas reversas, conforme metodologia pré-estabelecida (CORTEZ, 2002; CORTEZ et al., 2004). A extração foi realizada pela adição de 3 mL do extrato enzimático com o mesmo volume da solução micelar em tubo de fundo cônico. A solução micelar foi composta por 78% v/v de uma solução de Isooctano/Hexanol (95 e 5% v/v, respectivamente), 22% v/v de butanol e a concentração de tensoativo (CTAB) de 0,15 M. Durante todo o processo a temperatura foi mantida a 5 °C ou inferior, com a finalidade de se preservar as enzimas. A mistura foi centrifugada a 1677 x g por 10 minutos, resultando no aparecimento de duas fases distintas em equilíbrio. A fase inferior foi denominada fase aquosa inicial (FAI), a qual foi analisada quanto à atividade enzimática da XR e XDH. A fase superior do tubo (fase orgânica) foi retirada e submetida à re-extração. Esta foi realizada com a mistura de 2,0 mL da fase orgânica com 2 ml de tampão acetato de sódio 1,0 M (pH 5,5), adicionado de NaCl 1,0 M. Após a homogeneização, o mesmo procedimento foi adotado para obter e analisar a nova fase aquosa (FAII). Posteriormente, foi empregado o tampão TRIS/HCl 71mM (pH 7,2) para substituir o tampão acetato de sódio 1,0 M (pH 5,5) na etapa de reextração, pois foi demonstrado que essa mudança resultou no aumento de estabilidade, no estoque a 4 °C, da enzima xilose redutase.

4.3 SELEÇÃO DO SISTEMA DE RENERAÇÃO ENZIMÁTICA DE NADPH

4.3.1 Determinação das constantes cinéticas aparentes da xilose redutase pré-purificada

As constantes cinéticas aparentes foram calculadas conforme Peter et al. (1987) e Nidetzki et al. (1996). Para determinação das constantes cinéticas aparentes ($K_{m_{ap}}$ e $V_{máx_{ap}}$) relativas ao substrato e coenzima, os cálculos foram baseados em dados experimentais sobre a taxa de reação sob concentração de saturação de um dos reagentes, com a concomitante variação na concentração do outro em valores adequados. Foi utilizada a equação de Michaelis-Menten extendida para dois substratos (considerando-se a xilose e o coenzima NADPH como substratos, conforme EQUAÇÃO 2 (NIDETZKI et al., 1996). Os cálculos para a determinação das constantes cinéticas aparentes foram realizados utilizando o método “simplex” e linearização do tipo Lineweaver-Burk com auxílio do programa “Enzymes Kinetic ProTM” versão 2.36 (ChemSW, E.U.A.).

$$v = V_{\text{máx}}_{\text{ap}} \cdot \frac{[\text{xilose}]}{(K_{\text{m}}_{\text{ap xilose}} + [\text{xilose}])} \cdot \frac{[\text{NADPH} + \text{H}^+]}{(K_{\text{m}}_{\text{ap NADPH} + \text{H}^+} + [\text{NADPH} + \text{H}^+])} \quad (2)$$

Na qual:

v = Velocidade de reação, $\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $V_{\text{máx}}_{\text{ap}}$ = Velocidade máxima de reação aparente, $\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$; K_{m}_{ap} = Constante de Michaelis-Menten aparente relativo tanto a xilose como a coenzima NADPH, mmol.l^{-1} ; $[\text{xilose}]$ = concentração de xilose (M) e; $[\text{NADPH}]$ = concentração da coenzima (mM).

4.3.2 Determinação de efeitos de diferentes substâncias sob a xilose redutase pré-purificada

Para a determinação dos efeitos dos possíveis substratos e produtos sob a cinética da XR pré-purificada foram realizados ensaios para determinação da velocidade de reação em diferentes condições reacionais. Para todos os ensaios a atividade da XR foi a mesma (120 U.g^{-1}), a concentração inicial do coenzima foi constante e em excesso, para que fosse apenas constatada a influência da substância em estudo na XR pré-purificada em relação a xilose. Para isto, fixou-se uma concentração da substância a ser estudada e variou-se a concentração de xilose e para cada concentração desta foi medida uma velocidade de reação. Esses ensaios foram realizados usando diferentes concentrações fixas do possível inibidor. Com esses dados experimentais de velocidade de reação pôde-se determinar o tipo de efeito de cada substância, assim como a constante de inibição aparente, sobre a XR pré-purificada em relação à xilose. Os cálculos para a determinação do efeito de inibição foram realizados utilizando-se o método “simplex”, sendo que a escolha do melhor modelo de inibição foi baseada nos valores da soma dos quadrados dos resíduos (SQR) e do “Akaike’s information criterion” (critério de informação de Akaike, AIC). Neste caso, o melhor modelo foi o que apresentou os menores valores destes parâmetros. A EQUAÇÃO 3 descreve o cálculo do AIC.

$$AIC = N \cdot \ln(SQR) + 2 \cdot M \quad (3)$$

Na qual:

N = Número de pontos experimentais; SQR = soma dos quadrados dos resíduos e;

M = Número de parâmetros estimados

Após a determinação do tipo de inibição realizou-se a determinação das constantes cinéticas e de inibição, as quais foram determinadas pelo método de *rigorous nonlinear least square* (mínimos quadrados não-linear rigoroso, RNLLS). Todos os cálculos foram realizados com auxílio do programa “Enzymes Kinetic ProTM” versão 2.36 (ChemSW, E.U.A.).

4.4 ENSAIOS INICIAIS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL PARA DEFINIÇÃO DA REGIÃO DE ESTUDO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Foram realizados ensaios iniciais de produção enzimática de xilitol para a determinação da região de estudo e avaliação do efeito de diferentes condições operacionais. Em todos os ensaios a temperatura foi mantida a 25 C°.

4.4.1 Ensaios em bioreator

As condições experimentais empregadas nos ensaios no bioreator testadas estão apresentadas na TABELA 5. Para todas as reações foi empregado 0,24 mM da coenzima NADPH 0,1 % de azida sódica, para evitar contaminação, e 0,3 M de glicose. O pH foi mantido a um valor de 7,0. O hidrolisado usado no quarto teste, após concentrado e tratado, possuía a seguinte composição em: 5,4 g.l⁻¹ de glicose, 33,3 g.l⁻¹ de xilose, 3,0 g.l⁻¹ de arabinose, 2,9 g.l⁻¹ de ácido acético, 2,3 mg.l⁻¹ de hidroximetilfurfural e 2,0 mg.l⁻¹ de furfural.

Tabela 5 – Composição reacional e características operacionais dos ensaios preliminares de produção enzimática de xilitol em bioreator

Ensaio	Composição				Características operacionais	
	Xilose (M)	XR (U.ml ⁻¹)	GD (U.ml ⁻¹)	Tampão TRIS/HCl (mM)	Controle do pH	Vol. de reação (mL)
1	0,3	0,2	0,6	70	NaOH 0,5 M	25
2	0,3	0,2	0,6	3000	NaOH 0,5 M	25
3	0,6	0,5	1,2	70	TRIS 1,0 M	5
4*	0,6	0,5	1,2	70	TRIS 1,0 M	7,5

*Neste ensaio 20 % v/v do meio reacional (1,5 mL) foi composto por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar duas vezes concentrado e tratado.

Para possibilitar o controle de pH e temperatura das reações foi necessário realizar adaptações do sistema reacional ao módulo do bioreator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA). Na FIGURA 11 observar-se o sistema reacional adaptado ao módulo.

Figura 11. Fotografia do sistema reacional no módulo adaptado do BIOFLO III.

4.4.2 Ensaios em tubos

O segundo grupo de testes realizados em tubos tipo *Eppendorf* de 2 ml foi proposto para: Definir a concentração inicial do tampão TRIS/HCl a ser empregado nos experimentos do planejamento, uma vez que a concentração de sais em meios reacionais enzimáticos podem influenciar grandemente na catálise (NIDETZKY et al., 1996) e para verificar a viabilidade técnica da realização dos experimentos de produção enzimática de xilitol em tubos do tipo *Eppendorf*, pois a execução dos ensaios nesses frascos é mais simples do que em bioreator, sendo que também podem ser feitos vários ensaios ao mesmo tempo. Foram realizados quatro ensaios em Eppendorf de 2,0 ml sob diferentes concentrações iniciais de tampão TRIS/HCl (pH 7,2): 0,07; 0,25; 0,50; e 1,0 M. As demais condições reacionais foram as seguintes: Concentração de xilose 10 g.l⁻¹, glicose 10 g.l⁻¹, e NADPH 0,24 mM; 0,5 U.ml⁻¹ de xilose redutase e 0,5 U.ml⁻¹ de glicose desidrogenase.

4.5 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL

As variáveis selecionadas para esse estudo foram as concentrações de xilose (M), de glicose (M), e de NADPH (mM), carga de XR (U.ml⁻¹) e de glicose desidrogenase (U.ml⁻¹). Na TABELA 6 estão apresentados os experimentos realizados, os quais foram conduzidos em meio baseado em xilose comercial. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central, sendo que estes níveis foram definidos para cada variável com base em experimentos preliminares. Foi proposto um planejamento fatorial 2⁵⁻¹, o qual permitiu a seleção dos níveis das variáveis que foram empregados na produção enzimática de xilitol. Como variáveis-resposta foi considerado a produtividade volumétrica de xilitol. Todos os ensaios foram realizados em tampão TRIS/HCl 0,22 M pH 7,2 a 25°C e o volume reacional de 5 mL no bioreator adaptado.

A análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do programa STATGRAPHICS versão 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) e o Design-Expert versão 6.0.6. (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EUA).

Tabela 6 – Planejamento fatorial 2^{5-1} com triplicata no ponto central, variáveis de entrada com valores reais (V.R.) e codificados (V.C.).

Exp.	Conc. de xilose		Conc. de glicose		Carga de GDH		Carga de XR		Conc. de NADPH	
	V.C.	V.R. (M)	V.C.	V.R. (M)	V.C.	V.R. (U.mL ⁻¹)	V.C.	V.R. (U.mL ⁻¹)	V.C.	V.R. (mM)
1	-1,0	0,033	-1,0	0,033	-1,0	0,20	-1,0	0,20	1,0	0,60
2	1,0	0,100	-1,0	0,033	-1,0	0,20	-1,0	0,20	-1,0	0,20
3	-1,0	0,033	1,0	0,100	-1,0	0,20	-1,0	0,20	-1,0	0,20
4	1,0	0,100	1,0	0,100	-1,0	0,20	-1,0	0,20	1,0	0,60
5	-1,0	0,033	-1,0	0,033	1,0	0,60	-1,0	0,20	-1,0	0,20
6	1,0	0,100	-1,0	0,033	1,0	0,60	-1,0	0,20	1,0	0,60
7	-1,0	0,033	1,0	0,100	1,0	0,60	-1,0	0,20	1,0	0,60
8	1,0	0,100	1,0	0,100	1,0	0,60	-1,0	0,20	-1,0	0,20
9	-1,0	0,033	-1,0	0,033	-1,0	0,20	1,0	0,60	-1,0	0,20
10	1,0	0,100	-1,0	0,033	-1,0	0,20	1,0	0,60	1,0	0,60
11	-1,0	0,033	1,0	0,100	-1,0	0,20	1,0	0,60	1,0	0,60
12	1,0	0,100	1,0	0,100	-1,0	0,20	1,0	0,60	-1,0	0,20
13	-1,0	0,033	-1,0	0,033	1,0	0,60	1,0	0,60	1,0	0,60
14	1,0	0,100	-1,0	0,033	1,0	0,60	1,0	0,60	-1,0	0,20
15	-1,0	0,033	1,0	0,100	1,0	0,60	1,0	0,60	-1,0	0,20
16	1,0	0,100	1,0	0,100	1,0	0,60	1,0	0,60	1,0	0,60
17	0	0,066	0	0,066	0	0,40	0	0,40	0	0,40
18	0	0,066	0	0,066	0	0,40	0	0,40	0	0,40
19	0	0,066	0	0,066	0	0,40	0	0,40	0	0,40

4.6 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL EM BATELADA EMPREGANDO MEIO SINTÉTICO

Para a otimização do processo em batelada de produção enzimática de xilitol foram realizados experimentos segundo um planejamento completo 2^2 , com triplicata no ponto central. As variáveis determinadas a partir da análise de resultados anteriores foram: concentração de xilose e de NADPH. Os níveis empregados foram: concentração de xilose 0,10 M (-1) e 0,40 M(+1) e de NADPH 0,6 mM (-1) e 2,4 mM (+1). O sinal (+1) representa o nível máximo; o sinal (-1) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central, o qual é o resultado da média aritmética desses valores. As variáveis estudadas anteriormente do planejamento 2^{5-1} foram mantidas no nível (-1), carga de XR e GDH 0,20 U.ml⁻¹ e concentração de glicose de 0,033 M. As demais condições experimentais foram as mesmas que para o planejamento anterior. Na TABELA 7 está apresentada a matriz do planejamento com os valores, reais e codificados, das variáveis de entrada. Como variável-resposta foi considerada a produtividade volumétrica de xilitol (Qp, g.l⁻¹.h⁻¹). As demais condições experimentais foram as mesmas utilizadas nos ensaios do planejamento anterior (item 4.5).

Tabela 7 - Planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central e pontos axiais, variáveis de entrada com valores reais (V.R.) e codificados (V.C.)

Exp.	Conc. de xilose		Conc. de NADPH	
	V.C.	V.R. (M)	V.C.	V.R. (mM)
1	-1,0	0,10	-1,0	0,60
2	1,0	0,40	-1,0	0,60
3	-1,0	0,10	1,0	2,4
4	1,0	0,40	1,0	2,4
5	$-\sqrt{2}$	0,039	0	1,5
6	$+\sqrt{2}$	0,46	0	1,5
7	0	0,25	$-\sqrt{2}$	0,23
8	0	0,25	$+\sqrt{2}$	2,8
9	0	0,25	0	1,5
10	0	0,25	0	1,5
11	0	0,25	0	1,5

A análise dos testes estatísticos foi realizada com auxílio do programa STATISTICA versão 6.0 e DESIGN EXPERT versão 6.0. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão, graus de liberdade (GL), teste t de Student's e nível de significância (p). Modelos foram determinados e aplicados aos resultados experimentais obtidos, assim como respectiva análise de variância (ANOVA).

4.7 DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE ULTRA E NANOFILTRAÇÃO PARA RETENÇÃO DE NADPH E ENZIMAS

A retenção da coenzima NADPH no meio reacional para posterior reutilização é de fundamental importância para o desenvolvimento da produção enzimática de xilitol. Para isto foram propostos processos de separação com membranas e devido ao tamanho da coenzima NADPH (700-800 Da ou g.mol^{-1}) e enzimas xilose redutase e glicose desidrogenase foram selecionadas membranas de tamanho de poro na região da ultra e nanofiltração.

Foram testadas membranas de corte de 100, 30, 10, 5, 3 e 1 kDa quanto a retenção de coenzima NADPH, e adicionalmente foram realizados testes para os demais componentes da reação: XR, GDH, xilose, glicose, ácido glucônico e xilitol. Como parâmetro de escolha da membrana para retenção da coenzima foi empregado o fator de retenção (R, %), em relação à massa ou atividade enzimática, definido na EQUAÇÃO 4.

$$R = \frac{C}{T} \times 100 \quad (4)$$

Na qual:

R = fator de retenção, %.

C = Massa ou atividade enzimática retida (concentrado), g ou U.

T = Massa ou atividade enzimática total, retida somada a permeada, g ou U.

Para os experimentos de determinação de retenção dos componentes a temperatura foi mantida a 25 °C e a pressão manométrica de 3 atm. A concentração empregada nos ensaios de coenzima foi de 0,2 mM, de xilose, xilitol, glicose, ácido xilônico e ácido glucônico de 10 g.l^{-1} , a carga de XR e de GDH de 1 U.ml^{-1} . Os experimentos foram realizados em duplicata

Foi realizada, também, a caracterização das membranas em relação as suas propriedades hidráulicas. Determinou-se a permeabilidade hidráulica (L_p , $\text{l.h}^{-1}.\text{atm}^{-1}.\text{m}^{-2}$) e fluxo hidráulico máximo (J_p , l.min^{-1}). O fluxo máximo foi determinado variando-se a pressão manométrica sob a membrana e para cada pressão mediu-se o fluxo, quando um aumento na pressão não resultou em aumento no fluxo, sendo esse determinado como fluxo hidráulico máximo. A permeabilidade hidráulica é numericamente igual ao valor do coeficiente angular da reta formada pelos dados de pressões manométricas e seus respectivos valores de fluxo. A água empregada nos ensaios foi previamente deionizada e filtrada em filtro de corte de $0.22\ \mu\text{m}$, para total remoção de sólidos em suspensão. Os experimentos foram realizados em duplicata.

A FIGURA 12 apresenta o sistema de filtração do tipo *stirred cell*, (Stirred ultrafiltration cell, modelo 8050, Millipore Corporation, Bedford, MA, E.U.A.) que é um sistema de filtração do tipo *dead end*, com membrana plana (disco) provido de agitação magnética sob a membrana. A agitação logo acima da membrana adia a formação do *fouling*, o qual é o principal, e inevitável, problema nos processos de separação por membrana.

Figura 12. Sistema de ultra e nanofiltração montado e pronto para o uso.

4.8 OBTENÇÃO, CONCENTRAÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Foram utilizadas amostras de bagaço de cana-de-açúcar provenientes da Companhia Açucareira Vale do Rosário localizada na cidade de Orlandia, São Paulo. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido em reator de aço inox com capacidade de 250 litros. O bagaço foi

percolado com H_2SO_4 98 % de pureza como catalisador em uma razão de 100 mg H_2SO_4 por g de matéria seca durante 10 minutos à temperatura de 121° C, utilizando-se uma proporção de 1:10 entre massa de bagaço e volume da solução de H_2SO_4 . Após resfriado, o hidrolisado foi centrifugado e estocado em câmara fria à 4° C. O hidrolisado foi então concentrado sob pressão reduzida em um concentrador com capacidade volumétrica de 30 litros a 70 ° C. Após a etapa de concentração o hidrolisado foi caracterizado e tratado conforme metodologia estabelecida por Alves et al. (1998). Este tratamento consiste nas seguintes etapas:

1. Adição de óxido de cálcio até pH 7,0;

2. Adição de H_3PO_4 até pH 5,5;

3. Adição de carvão ativo 2,5% massa de carvão/volume de hidrolisado, e manutenção sob agitação em incubadora de movimento rotatório por uma hora sob 200 rpm e 30°C.

Entre as etapas o hidrolisado foi filtrado sob vácuo e o permeado foi usado para a etapa seguinte. Ao final do tratamento o hidrolisado será autoclavado sob 0,5 atm (110 °C) durante 15 min.

4.9 TESTES COMPARATIVOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM DIFERENTES ORIGENS DE XR E MEIOS REACIONAIS

Foram realizados testes de produção de xilitol com a XR obtida a partir de meio sintético e em hidrolisado, assim como a produção de enzimática de xilitol empregando os respectivos extratos enzimáticos em meio sintético e em hidrolisado. As diferentes combinações de ensaios estão apresentadas na TABELA 8. Os experimentos foram conduzidos no módulo adaptado do bioreator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) em um volume total de 5 mL. Em todos os ensaios a temperatura e o pH foram mantidos constantes a 25° C e 7,0, respectivamente. O pH foi controlado pela adição de tris-hidroximetil-aminometano 0,2 M. Para todos os ensaios a concentração de xilose e glicose foi de 18,6 e 5,6 g.l⁻¹, respectivamente, concentração de NADPH 0,2 mM, carga de XR e GDH foi de 0,2 U.ml⁻¹. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 8 - Comparação de desempenho do sistema enzimático para produção de xilitol onde a enzima XR é produzida em diferentes meios de cultura

Etapa	Meio de cultivo para a obtenção da enzima	Meio reacional para a produção de xilitol
1	Xilose Comercial	Xilose Comercial
2	Xilose Comercial	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar
3	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	Xilose Comercial
4	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

4.10 ENSAIOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Experimentos com meio reacional contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foram realizados para comparação com resultados de produção em meio sintético. As reações enzimáticas foram realizadas no módulo adaptado do bioreator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) em um volume total de 5 mL. Em todos os ensaios a temperatura e o pH foram mantidos constantes a 25° C e 7,0, respectivamente. O pH foi controlado pela adição de tris-hidroximetil-aminometano 0,2 M. Para todos os ensaios a concentração de xilose e glicose foi de 18,6 e 5,6 g.l⁻¹, respectivamente, concentração de NADPH 0,2 mM, carga de XR e GDH foi de 0,2 U.ml⁻¹. A produção de xilitol foi avaliada em meios de reação contendo diferentes porcentagens do volume contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e tratado. As quantidades de hidrolisado no meio foram as seguintes: 20, 40, 80 e 100 % (v.v⁻¹). Uma reação controle foi realizada, a qual foi empregada apenas meio sintético e foi conduzido nas mesmas condições experimentais descritas acima. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.11 ESTRATÉGIAS DE AUMENTO DA ESTABILIDADE À ESTOCAGEM DO EXTRATO PRÉ-PURIFICADO DE XILOSE REDUTASE

Duas opções foram propostas buscando a melhoria da estabilidade a estocagem do extrato de XR. A primeira foi realizar uma diálise do extrato pré-purificado, a qual resulta na remoção de íons da solução e a segunda foi a troca do tampão acetato pelo TRIS/HCl em concentração menor (70 mM) e no pH próximo do ótimo da enzima (7,2).

A diálise foi realizada em sacos de 33 mm (largura) por 21 mm (diâmetro) com corte de 1 kDa. A amostra foi colocada no saco e o mesmo foi imerso em um recipiente com água deionizada, mantidos sob leve agitação e a temperatura de 4 °C. A água foi trocada periodicamente até que se atingisse um valor baixo de condutividade, menor que 100 µS. Foi medido o volume inicial e final da amostra, assim como a atividade de xilose redutase.

Foram realizados ensaios periódicos de atividade da enzima xilose redutase estocada a 4 °C do extrato enzimático inicial (antes da pré-purificação), após a pré-purificação (amostra não dialisada), do extrato dialisado e do extrato pré-purificado no qual se empregou o tampão TRIS/HCl 70 mM pH 7,2 somado ao NaCl 1 M como a segunda fase de extração ao invés do tampão acetato 1,0 M pH 5,5 adicionado de NaCl 1,0 M.

4.12 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.12.1 Determinação das atividades enzimáticas e de proteínas totais

Preparou-se, em uma cubeta de quartzo, uma mistura cuja composição é apresentada na TABELA 9. Esta cubeta foi inserida em espectrofotômetro (BECKMAN 640B), e a atividade de XR foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a 340 nm, devido à oxidação do NADPH, sendo que o substrato limitante empregado foi xilose. A atividade de GDH e XDH foram determinadas de forma similar, pelo aumento da absorbância a 340 nm devido à redução do NADP e NAD, respectivamente, sendo que o substrato limitante empregado foi glicose e xilitol, respectivamente. Uma Unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução/oxidação de 1 µmol de coenzima por minuto, à temperatura de 25 °C. As atividades específicas foram expressas em U.mg_{proteína}⁻¹. As análises de proteínas totais foram realizadas pelo método de Lowry et al. (1951).

Tabela 9 – Meio reacional para a determinação da atividade das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e glicose desidrogenase (GDH).

Reagentes	XR (μl)	Reagentes	XDH (μl)	Reagentes	GDH (μl)
Tampão		Tampão		Tampão	
TRIS/HCl 71 mM pH 7,2	350	TRIS/HCl 71 mM pH 8,6	350	TRIS/HCl 71 mM pH 7,2	350
Solução de NADPH 1,2 Mm	50	Solução de NAD 1,2 mM	50	Solução de NADP 1,2 mM	50
Solução de Xilose 2M	50	Solução de Xilitol 0,5M	50	Solução de Glicose 2M	50
Extrato Enzimático	150	Extrato Enzimático	150	Extrato Enzimático	150
Volume final	600	Volume final	600	Volume final	600

*O branco da reação foi determinado antes da adição do extrato enzimático.

As atividades enzimáticas foram calculadas conforme EQUAÇÃO 5.

$$A = \frac{\Delta I \cdot 10^6}{Co \cdot L} \cdot f \cdot D \quad (5)$$

Na qual:

A = Atividade Enzimática, U.l⁻¹; ΔI = Inclinação da curva Absorbância x Tempo, min⁻¹. Dado fornecido pelo equipamento; Co = Coeficiente de extinção do NADPH e NAD= 6220 M⁻¹. cm⁻¹ a 30 °C ; L = Caminho Ótico = 1 cm; f = Fator de diluição do meio reacional = Volume de total da reação por Volume de extrato e; D = Diluição do extrato enzimático.

4.12.2 Determinação de concentração celular, de açúcares e demais componentes reacionais e provenientes do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

A concentração de células livres no meio de fermentação foi medida pela leitura da densidade óptica (DO) a 640 nm em espectrofotômetro, a DO medida pode ser então utilizada

para a determinação da massa celular seca por unidade de volume através de curva de calibração.

As concentrações de xilose e xilitol foram determinadas por cromatógrafo líquido de alta performance (modelo SHIMADZU LC-10-AD, SHIMADZU, Kioto, Japão). As amostras foram previamente filtradas em filtro *Sep Pak* C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6ª e detector UV a 210nm; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6 ml.min⁻¹.

4.13 PARÂMETROS FERMENTATIVOS E DE PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Os parâmetros fermentativos, enzimáticos e de purificação enzimática foram calculados segundo as equações a seguir:

a) Fator de rendimento de xilose em xilitol (Y_{ps} , g_{xilitol}·g_{xilose}⁻¹).

$$Y_{ps} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (6)$$

Na qual:

P_f = concentração final de xilitol; P_i = concentração inicial de xilitol; S_f = concentração final de xilose e; S_i = concentração inicial de xilose.

b) Fator de rendimento de xilose em biomassa (Y_{xs} , g_{xilose}·g_{biomassa}⁻¹).

$$Y_{xs} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (7)$$

Na qual:

X_f = concentração final de células (g.l⁻¹) e; X_i = concentração inicial de células (g.l⁻¹)

c) Eficiência de conversão de xilose em xilitol (η , %)

$$\eta = \frac{Y_{ps}}{Y_{ps_{teórico}}} \cdot 100 \quad (8)$$

Na qual:

$Y_{ps_{teórico}} = 0,917 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$ (BARBOSA et al, 1988).

d) Produtividade volumétrica em xilitol (Q_p , $\text{g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

$$Q_p = \frac{\Delta P}{t} \quad (9)$$

Na qual:

t = tempo de fermentação.

e) Taxa de consumo de xilose (Q_s , $\text{g}_{\text{xilose}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

$$Q_s = -\frac{\Delta S}{t} \quad (10)$$

f) Xilose consumida (C , %).

$$C = -\frac{\Delta S}{S_i} \cdot 100 \quad (11)$$

g) Atividade específica (A_{esp} , $\text{U} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1}$)

$$A_{esp} = \frac{A_0}{P} \quad (12)$$

Na qual:

A_0 = Atividade volumétrica, $\text{U} \cdot \text{l}^{-1}$ e; P = Concentração de proteína total, $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

h) Aumento de Pureza (A_p)

$$A_p = \frac{A_{esp_2}}{A_{esp_1}} \quad (13)$$

Na qual:

A_{esp1} = Atividade específica inicial do extrato enzimático, $U \cdot mg_{proteína}^{-1}$ e; A_{esp2} = Atividade específica do extrato enzimático após uma etapa de purificação, $U \cdot mg_{proteína}^{-1}$.

i) Recuperação de proteína total (R_p , %)

$$R_p = \frac{P_2}{P_1} \cdot 100 \quad (14)$$

Na qual:

P_1 = Proteína total do extrato enzimático anterior à purificação, mg e; P_2 = Proteína total do extrato após uma etapa de purificação, mg. As massas P_1 e P_2 foram calculadas pela multiplicação da concentração de proteína pelo volume da fase correspondente.

j) Recuperação em atividade enzimática (R_a , %)

$$R_p = \frac{A_2}{A_1} \cdot 100 \quad (15)$$

Na qual:

A_1 = Atividade do extrato enzimático anterior à purificação, U e; A_2 = Atividade do extrato após uma etapa de purificação, U. As atividades A_1 e A_2 foram calculadas pela multiplicação da atividade volumétrica pelo volume da fase correspondente.

* OBSERVAÇÃO: O final do processo, momento no qual foram calculados os parâmetros fermentativos, foi considerado quando a concentração de xilose (substrato) atingiu um valor menor ou igual a 10% do valor inicial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE XILOSE REDUTASE (XR) EM BIORREATOR

Inicialmente, decidiu-se por utilizar as condições de processo utilizadas por Sene (2000) para obtenção de XR que foram: temperatura 35 °C; pH inicial 4,0 (não controlado ao longo do processo); Agitação de 300 rpm e K_{La} de 12 h⁻¹ (aeração de 0,2 vvm). No entanto, no trabalho mencionado foi utilizado como fonte de xilose o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e tratado.

Os resultados referentes à produção de xilose redutase, xilitol desidrogenase, a concentração de xilose, a concentração de xilitol e o crescimento celular em função do tempo estão apresentados na FIGURA 13. Verificou-se o consumo de 34 g.l⁻¹ de xilose (74 % da quantidade inicial) assim como a produção de 26 g.l⁻¹ de xilitol (FIGURA 13a), após 72 horas de cultivo. A baixa taxa de consumo de xilose (Q_s de 0,44 g.L⁻¹h⁻¹), assim como a baixa produtividade volumétrica em xilitol (Q_p de 0,35 g.l⁻¹h⁻¹) obtidas, foi provavelmente devida à baixa condição de aeração empregada. No entanto, o metabolismo celular estava direcionado para a produção de xilitol, uma vez que se observou um alto valor de eficiência de conversão de xilose em xilitol (86 %). A baixa disponibilidade de oxigênio também foi responsável pelo baixo valor de conversão de xilose em biomassa (Y_{xs}) de 0,03 g.g⁻¹, gerando ao final da fermentação uma concentração celular de 1,60 g.l⁻¹ (FIGURA 13b). A máxima atividade enzimática de XR obtida foi de 0,230 U.mg_{prot}⁻¹ (FIGURA 13c). Embora empregando as mesmas condições, os valores desses parâmetros obtidos nesse trabalho não foram semelhantes aos reportados por Sene (2000), provavelmente por se tratar de um meio de cultivo diferente, o qual foi composto, principalmente, de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Este resultado induziu a uma maior investigação sobre as condições experimentais, buscando-se determinar condições para produzir uma quantidade maior da enzima XR em meio sintético.

Figura 13. a) Concentração de xilose (▲) e de xilitol (■) b) Crescimento celular e c) Atividade específica de xilose redutase (○) e de xilitol desidrogenase (□) em função do tempo para a fermentação em meio sintético ($K_L a$ 12 h^{-1} e pH inicial de 4,0). As curvas representam o ajuste dos pontos experimentais.

No segundo experimento realizado, decidiu-se pela utilização de uma condição experimental a qual promovesse um aumento no fluxo metabólico e com maior valor inicial de pH. Uma alternativa para se aumentar o fluxo metabólico é aumentar disponibilidade de oxigênio (aeração). Contudo, um aumento inadequado na aeração acarreta uma diminuição na eficiência de conversão de xilose em xilitol (SANTOS et al., 2005). É reportado na literatura também que quando o metabolismo celular é direcionado para produção de xilitol tal condição induz a obtenção de XR (MATOS, 2004; RODRIGUES, 1997). Tendo em consideração estes fatos, foram empregadas condições experimentais visando aumentar o fluxo metabólico sem comprometer a produção de xilitol, para que deste modo a produtividade e atividade de XR fosse maior. Para isto, com base na literatura, foi utilizado um maior coeficiente de transferência de volumétrica de oxigênio ($K_L a$) de 25 h^{-1} , apontado como adequado para a

produção de xilitol (SILVA et al., 1994). Além disso, fez-se a mudança do valor inicial de pH para 5,5, indicado como ótimo para crescimento da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 (MORITA, 1998), mantendo-se o controle deste parâmetro durante toda a fermentação pela adição de NaOH 3M.

A FIGURA 14 apresenta o consumo de xilose, produção de xilitol, crescimento celular e o comportamento da XR e xilitol desidrogenase em função do tempo. De acordo com a FIGURA 14a observa-se que 90% da xilose foi consumida após 48 h de processo, em comparação com o experimento anterior no qual o consumo de substrato ao final de 72h foi de 74%. Neste experimento observou-se um aumento nos valores dos parâmetros fermentativos, exceção feita à eficiência do processo, a qual normalmente reduz com o aumento da aeração (FELIPE et al., 1997; SILVA et al., 1997). Este fenômeno pode ser explicado, uma vez que a formação de xilitol é muito influenciada pelo oxigênio disponível, sendo que quanto maior a disponibilidade deste nutriente para o microrganismo maior será a velocidade de formação da coenzima oxidada (NAD), devido à ativação da cadeia respiratória, o que promoverá a formação de biomassa com pouco ou nenhum acúmulo de xilitol. A partir destes dados pode-se confirmar que as condições de processo para obtenção de XR estão interligadas aqueles de produção de xilitol. Com a finalidade de se verificar esta afirmação e do aprofundamento da avaliação do comportamento da XR durante a fermentação de xilose por *Candida guilliermondii* em reator de mistura sob regime de batelada, foi realizado novos experimentos. Nestes ensaios a aeração foi aumentada para um valor acima da faixa normalmente empregada para produção de xilitol e, nesta condição, esperou-se obter aumento considerável na biomassa. Nestes experimentos utilizaram-se as condições: temperatura 30 °C; pH inicial 5,5 (controlado ao longo do processo) e K_{La} de 50 h⁻¹, correspondente a uma aeração de 1,2 vvm e uma agitação de 500 rpm.

Os resultados obtidos referentes à concentração de xilose, a formação de xilitol, o crescimento celular e a atividade de XR e xilitol desidrogenase em função do tempo são apresentados na FIGURA 15, respectivamente.

Pode-se observar que foram apresentados resultados correspondentes aos tempos superiores ao final da fermentação, que pode ser considerado como tendo ocorrido por volta das 18 horas de processo (concentração de xilose a baixo de 10% da inicial), FIGURA 15.

Figura 14. a) Concentração de xilose (▲) e de xilitol (■) b) Crescimento celular e c) Atividade específica de xilose redutase (○) e de xilitol desidrogenase (□) em função do tempo para a fermentação de xilose comercial (K_{La} 25 h^{-1} e pH inicial de 5,50 - controlado durante o processo). As curvas representam o ajuste dos pontos experimentais.

A alta aeração empregada neste experimento, resultando em alta disponibilidade de oxigênio para as células (sem limitação) proporcionou uma alta taxa de consumo de xilose (Q_s , 2,50 $g.l^{-1}.h^{-1}$), sendo que esse experimento foi o único em três que se verificou a velocidade específica de crescimento máxima (0,29 h^{-1}). Pode ser observado também um grande aumento tanto na taxa de crescimento celular (Q_x , 0,28 $g.l^{-1}.h^{-1}$) como no fator de conversão de xilose em massa celular (Y_{xs} , 0,090 $g.g^{-1}$). No entanto, dois fenômenos observados neste experimento merecem atenção. O primeiro refere-se a o comportamento das atividades de XR e xilitol desidrogenase em função do tempo de fermentação (FIGURA 15c). Pode-se observar que a atividade de XR se mantém sempre acima de 0,50 $U.mg_{proteína}^{-1}$, tendo

o máximo valor de $0,88 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ em torno de 24 horas de fermentação. Entretanto, a xilitol desidrogenase tem seu valor de atividade específica praticamente constante durante a fermentação e inferior a $0,10 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ (FIGURA 15c), correspondendo a uma razão de atividades xilose redutase e xilitol desidrogenase sempre superior a 5. Este fato indica que, sob estas condições (alta aeração), pode-se produzir um extrato enzimático rico em XR e pobre em XDH. Esta observação, aliada aos diferentes valores ótimos de temperaturas e pH para a XR e xilitol desidrogenase (CORTEZ, 2002), sugere a possibilidade de uso do extrato bruto, sem prévia purificação, para a produção enzimática de xilitol.

Figura 15. Concentração de xilose (▲) e de xilitol (■) b) Crescimento celular e c) Atividade específica de xilose redutase (○) e de xilitol desidrogenase (□) em função do tempo para a fermentação de xilose comercial (K_{La} 50 h^{-1} e pH inicial de 5,50 - controlado durante o processo). As curvas representam o ajuste dos pontos experimentais.

O segundo fenômeno observado está relacionado à produção de xilitol. Esta é muito influenciada pela aeração e segundo a literatura quanto maior a aeração empregada menor será a produção de xilitol, uma vez que o metabolismo microbiano se direciona para a formação de biomassa.

Na TABELA 10 estão apresentados os parâmetros fermentativos relativos aos experimentos realizados em comparação aos de Sene (2000).

No entanto, os resultados apresentados neste último experimento não estão de acordo com o esperado, ou seja, o aumento na aeração (de 25 para 50 h⁻¹) resultou em um aumento na produtividade volumétrica de 2,9 vezes, sem grande decréscimo na eficiência (TABELA 10). Este fenômeno foi observado, também, por Aguiar Jr. et al. (2002). Estes autores utilizaram condições de aeração, inóculo e meio de cultivo similares às empregadas no presente trabalho e observaram, ao final do experimento com maior aeração (100 h⁻¹) e inóculo (4 g.l⁻¹) uma produtividade de 1,52 g.l⁻¹.h⁻¹ e uma eficiência de 84%. Ainda neste trabalho os autores concluíram que, no processo de produção de xilitol, o valor de aeração empregado está fortemente relacionado à concentração inicial de inóculo.

Observando-se os resultados apresentados na TABELA 10 verifica-se que, apesar do uso de condições similares correspondentes aos experimentos 1 e 4, os resultados obtidos foram bastante distintos. No caso destes experimentos, o maior valor de Y_{xs} obtido por Sene (2000) foi, provavelmente, devido à presença de glicose no meio de cultura, o que pode ter promovido o crescimento de biomassa (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998) e alguma influência nas atividades de XR e XDH. Esta diferença de resultados pode ser explicada pelo uso de diferentes meios de cultura nos dois experimentos. O fato de se utilizar diferentes meios de cultura dificulta a comparação entre as fermentações, pois mesmo após a caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar realizada por vários autores (CARVALHO, 2004; SANTOS, 2005) pouco se conhece ainda sobre o mecanismo de ação dos componentes do hidrolisado sob o metabolismo celular.

Tabela 10 – Comparação dos resultados obtidos nos experimentos e em Sene (2000).

Exp.	Condições	Eficiência (%)	Qp (g.l ⁻¹ h ⁻¹)	Yxs (g.g ⁻¹)	Aesp XR (U.mg _{prot} ⁻¹)	Aesp XDH (U.mg _{prot} ⁻¹)
1	K _{La} de 12 h ⁻¹ pH inicial 4,0 não controlado, meio baseado em xilose comercial	85	0,35	0,027	0,220	0,155
2	K _{La} de 25 h ⁻¹ pH inicial 5,5 controlado durante o processo, meio baseado em xilose comercial	70	0,55	0,066	1,410	0,391
3	K _{La} de 50 h ⁻¹ pH inicial 5,5 controlado durante o processo, meio baseado em xilose comercial	69	1,58	0,090	0,880	0,080
4	Estabelecidas por Sene (2000)	63	0,55	0,036	0,660	0,330

A TABELA 10 apresenta também que um desempenho satisfatório sob o ponto de vista da produção de enzimas correspondeu ao uso das condições do experimento n° 2 empregando-se meio baseado em xilose comercial. O maior valor obtido foi devido à indução do crescimento celular (maior valor Y_{xs}), o que está diretamente relacionado à maior produção de enzimas. Pode-se observar ainda que o maior crescimento celular não resultou em prejuízo da produção de xilitol, pois a eficiência diminuiu apenas 10% enquanto que a produtividade aumentou em 57%. Foi obtido, no experimento 2 (TABELA 2), uma atividade de XR cerca de 7 vezes mais maior que no experimento 1, sendo que a concentração celular foi 2,5 vezes maior (aumentando de 1,60 g.l⁻¹ para 3,83 g.l⁻¹). Estes dois fatores são os mais importantes neste trabalho, uma vez que se deseja obter uma elevada quantidade de XR.

No entanto, os resultados obtidos no experimento 3 superaram os demais, uma vez que foi possível a obtenção de um extrato enzimático com uma razão de atividades XR:XDH de cerca de 11 ao final do processo (TABELA 10), ao contrário dos experimentos 1 e 2 e os aqueles realizados por Sene (2000), que corresponderam às razões de 1,4; 3,6 e 2 vezes (TABELA 10), respectivamente. Observou-se também que o último experimento foi o que apresentou os melhores resultados para produção de xilitol, principalmente em relação à

produtividade, a qual foi 4,5, 2,9 e 2,9 vezes maior que nos experimentos 1 e 2 e aqueles realizados por Sene (2000) (TABELA 10), respectivamente.

Desta forma, escolheram-se as condições experimentais de fermentação para a produção da XR que foram utilizadas para dar continuidade dos experimentos correspondentes a: pH 5,5 (controlado); temperatura de 30 °C e um K_{La} de 50 h⁻¹.

5.2 OBTENÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DA XILOSE REDUTASE

O extrato enzimático obtido nas condições selecionadas anteriormente foi utilizado para a extração e purificação da XR, segundo a metodologia descrita no item 4.4.2. Os resultados da purificação estão apresentados na TABELA 11, assim como a comparação dos resultados obtidos por Cortez (2002).

Tabela 11 - Valores de extração e purificação do extrato enzimático obtido no segundo experimento em comparação aqueles obtidos por Cortez (2002).

Ref.	Etapa de purificação	Atv. total (U)		Aesp (U.mg _{prot} ⁻¹)		Ap		Ra (%)		Rp (%)
Este trabalho:		XR	XDH	XR	XDH	XR	XDH	XR	XDH	
	Extrato enzimático cru	3,67	0,45	1,33	0,16	1	1	100	100	100
	Extração (FAI)	n.d.*	0,18	n.d.	0,16	n.d.	1	n.d.	40	40
	Re-extração (FAII)	1,76	n.d.	3,6	n.d.	2,7	n.d.	48	n.d.	18
CORTEZ (2002)		XR	XDH	XR	XDH	XR	XDH	XR	XDH	
	Extrato enzimático cru	1,32	0,83	0,29	0,19	1	1	100	100	100
	Extração (FAI)	n.d.	0,79	n.d.	0,34	n.d.	1,80	n.d.	95	52
	Re-extração (FAII)	1	n.d.	1,68	n.d.	5,60	n.d.	76	n.d.	20

* Não detectado. Aesp = Atividade específica; Ap = Aumento de pureza; Ra = Recuperação em atividade enzimática e; Rp = Recuperação em proteínas totais

A técnica de micelas reversas utilizada permitiu, além da purificação, a separação da enzima XR da xilitol desidrogenase, como observado na TABELA 11 pelos valores de aumento de pureza e pelo fato de que não foi detectada atividade de XDH na fase aquosa II (FAII) e de XR na fase aquosa I (FAI). Os resultados encontrados não apresentaram o mesmo comportamento daqueles reportados por Cortez (2002), uma vez que o mesmo obteve um aumento de pureza e recuperação enzimática para XR 2 e 1,8 vezes maior que o obtido no presente trabalho, respectivamente. O mesmo foi constatado para XDH, com um aumento de pureza e de recuperação enzimática 1,8 e 2,4 vezes maiores, respectivamente. Estas diferenças de valores foram, provavelmente, causadas pelo uso de extrato enzimático proveniente de células cultivadas em diferentes meios de cultura e, também pelo fato que os dois extratos apresentavam diferentes atividades enzimáticas iniciais, tanto para XR como para XDH. Um dado importante foram os resultados de recuperação em proteína, os quais foram semelhantes apesar da concentração inicial de proteínas totais empregado ter sido diferentes, ou seja, $0,92 \text{ mg}_{\text{prot.}} \cdot \text{ml}^{-1}$ (neste trabalho) e $1,48 \text{ mg}_{\text{prot.}} \cdot \text{ml}^{-1}$ (CORTEZ, 2002).

Pode-se dizer que o resultado final desejado, separação da XR da XDH, foi alcançado, uma vez que não foi encontrado nenhum traço de atividade de XDH na FAII, sendo que este extrato foi empregado para todas as demais etapas.

5.3 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES DA XR PRÉ-PURIFICADA

As FIGURAS 16 e 17 apresentam o comportamento da atividade específica inicial da XR (A_{esp}) em função da concentração de xilose e coenzima (NADPH), respectivamente.

Observa-se que os pontos se ajustam ao modelo cinético de Michaelis-Menten. A partir destes resultados foi possível também a construção de gráficos de linearização da equação de Michaelis-Menten. Os resultados foram ajustados por linearização do tipo Lineweaver-Burk, conforme apresentado nas FIGURAS 18 e 19, em relação à xilose e a coenzima, respectivamente.

Figura 16. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose. A curva representa o ajuste dos dados experimentais a equação de Michaelis-Menten.

Figura 17. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de coenzima NADPH. A curva representa o ajuste dos dados experimentais a equação de Michaelis-Menten.

Figura 18. Linearização do tipo Lineweaver-Burk relativa à xilose redutase em relação à xilose.

Figura 19. Linearização do tipo Lineweaver-Burk relativa à xilose redutase em relação à coenzima.

A partir da linearização, foi possível determinar os valores das constantes cinéticas aparentes, K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Em relação à xilose, os valores ajustados foram $0,074 \pm 0,008$ M e 650 ± 30 U.g⁻¹, respectivamente, e em relação à coenzima foram $0,011 \pm 0,002$ mM e 570 ± 22 U.g⁻¹, respectivamente. A TABELA 12 apresenta uma comparação entre valores de K_m aparente calculados, assim como os encontrados por outros autores para a XR.

Observa-se na TABELA 12 que os resultados obtidos estão na mesma ordem de grandeza daqueles reportados por outros autores. Entretanto, pode-se verificar que os

resultados do valor de K_m deste trabalho diferem, relativamente, dos apresentados por CORTEZ (2002), embora tenha sido utilizada a mesma técnica de pré-purificação nas mesmas condições. Este autor afirma que teve dificuldades experimentais na determinação das constantes cinéticas da XR, em relação à coenzima e este fato pode explicar a grande diferença entre o K_m obtido por este em relação aos outros autores e ao presente trabalho. Outra observação pertinente é que o extrato enzimático pré-purificado utilizado por CORTEZ (2002) foi proveniente de um meio de cultivo celular diferente do presente trabalho e, desta maneira, substâncias contidas ou originadas deste cultivo podem ter influenciado na ação da XR, fazendo com que o valor de K_m , frente à xilose e ao co-substrato, fossem alterado.

Tabela 12 – Valores de K_m ajustados para a XR comparados aos obtidos em outros trabalhos

Microrganismo	K_m (mM) (xilose)	K_m (mM) (Coenzima)	Ref.
<i>C. guilliermondii</i>	74	0,011	Este trabalho*
<i>C. guilliermondii</i>	17	0,085	Cortez (2002)*
<i>C. guilliermondii</i>	64	0,010	Sene (2000)**
<i>C. tenuis</i>	72	0,005	Nidetzky et al. (1996)***
<i>C.tropicalis</i>	34	0,014	Yokoyama et al. (1995)***

* XR pré-purificada pela técnica de micelas reversas usando tensoativo CTAB ** XR não purificada *** XR purificada

5.4 INFLUÊNCIA DOS POSSÍVEIS SUBSTRATOS E PRODUTOS DOS SISTEMAS DE REGENERAÇÃO ENZIMÁTICA SOBRE A XR PRÉ-PURIFICADA

A determinação do sistema enzimático de regeneração *in situ* da coenzima a ser empregado no desenvolvimento deste trabalho foi baseada na determinação das constantes cinéticas e de inibição aparentes, conforme a metodologia descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente. Após as determinações de K_m e $V_{máx}$ aparentes, para a XR pré-purificada em relação à xilose e à coenzima NADPH, a enzima foi submetida a ensaios na presença de glicose, gluconato, etanol, acetaldeído e formato. Essas substâncias foram empregadas por se tratarem dos substratos e produtos dos três possíveis sistemas de regeneração enzimático *in situ* da co-enzima NADPH durante a produção enzimática de xilitol. A reação bioquímica de cada sistema pode ser observada nas EQUAÇÕES 16, 17 e 18.

Enzima: Formato desidrogenase

Enzima: Glicose desidrogenase

Enzima: Etanol desidrogenase

O método escolhido para tratar os dados experimentais gerados para a determinação do tipo de inibição foi a regressão não-linear (simplex), a qual ajusta os pontos experimentais à equação de Michaelis-Menten este método consistiu em ajustar os dados experimentais na equação de Michaelis-Menten, e apresentou adequada convergência mesmo quando os valores iniciais para os parametros diferem dos valores finais convergidos.

Esse método é apontado pela literatura como sendo o mais adequado para o ajuste de dados relacionados com a cinética enzimática (CORNISH-BOWDEN, 1995), uma vez que os métodos de linearização da equação de Michaelis-Menten (Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf e Eisentahl e Cornish-Bowden) podem acarretar em diversos tipos de erros devidos, principalmente, à necessidade de manipulação dos dados experimentais. (COPELAND, 2000). Deste modo, a confiabilidade nos valores das constantes cinéticas calculadas por um método não-linear é maior do que de um método de linearização (BISSWANGER, 2002).

Após a determinação do tipo de inibição, foi aplicado o método dos mínimos quadrados não-linear rigoroso (RNLLS) para o cálculo dos parâmetros cinéticos aparentes. Esse método é usado para dados experimentais que são sujeitos a diversos erros, sendo o termo “rigoroso” usado para indicar que o método considera fortemente a influência dos desvios padrões para ambas as variáveis, dependentes e independentes. Deve-se salientar que foram consideradas duas constantes de inibição, a primeira (K_{ic}) é a constante relacionada com a reação reversível do inibidor com a enzima livre e a segunda constante de inibição (K_{iu}) é a relacionada com a reação reversível entre o inibidor e o complexo enzima/substrato.

5.4.1 Sistema formato desidrogenase

5.4.1.1 Formato

Foram realizados ensaios enzimáticos contendo formato em diferentes concentrações. Este composto, nas condições de pH do ensaio (7,2), apresentou-se na forma de íons formato. A FIGURA 20 apresenta os resultados obtidos para cada concentração de formato em relação à atividade específica inicial da XR.

De acordo com a FIGURA 20 os resultados experimentais se ajustaram ao modelo de Michaelis-Menten. É possível observar também que o formato tem um efeito do tipo inibitório em relação à ação da XR quando a xilose é o substrato, uma vez que a partir de uma concentração de 0,025 M de formato observa-se uma sensível diminuição na atividade volumétrica inicial (FIGURA 20).

Figura 20. Atividade específica inicial da xilose redutase em função da concentração de xilose correspondentes a concentração de formato de (♦) 0,50 M, (x) 0,25 M, (●) 0,10 M, (▲) 0,025 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a curva representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten.

O adequado ajuste da equação de Michaelis-Menten aliado a uma provável inibição reversível tornou possível a utilização da linearização do tipo Lineweaver-Burk para a visualização do tipo de inibição (FIGURA 19).

A partir da linearização dos resultados observou-se uma tendência das curvas a serem paralelas (FIGURA 21). Isto indica que o tipo de inibição exercida pelo formato sob a XR quando xilose é o substrato seria incompetitiva. O tipo incompetitivo de inibição tem a característica de diminuir os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima, uma vez que o inibidor tende a se ligar ao complexo enzima-substrato resultando em uma diminuição na atividade catalítica. Esse fato pode ser confirmado pelo gráfico do tipo Lineweaver-Burk o qual, neste caso, resulta em curvas paralelas (com os mesmos coeficientes angulares).

Figura 21. Linearização do tipo Lineweaver-Burk para os dados de atividade específica inicial de xilose redutase correspondentes a concentração de formato de (♦) 0,50 M, (x) 0,25 M, (●) 0,10 M, (▲) 0,025 M e (■) 0 M.

Em complementação ao gráfico linearizado Lineweaver-Burk, uma forma de demonstrar uma possível inibição incompetitiva é a construção de um gráfico do coeficiente angular de cada uma das curvas apresentadas na FIGURA 22 em função da concentração do inibidor. Este gráfico, para inibições deste tipo, deve possuir como principal característica uma curva que seja paralela ao eixo das abscissas, ou seja, coeficiente angular igual à zero.

A curva obtida pelo ajuste dos pontos apresentados na FIGURA 20 resultou em um coeficiente angular de $6 \cdot 10^{-6}$, valor muito próximo de zero, conferindo o tipo de inibição proposto acima, ou seja, a inibição exercida pelo formato frente à XR usando xilose como substrato é do tipo incompetitiva.

Figura 22. Coeficiente angular das curvas linearizadas apresentadas na FIGURA 21 em função da concentração de formato

Somado a essa constatação, a análise dos dados pelo método simplex (regressão não-linear) mostrou que, de fato, a inibição do tipo acompetitiva seria a que melhor explicaria os dados experimentais, uma vez que os valores de SQR e de AIC foram os menores quando comparados aos dos outros tipos de inibição. A comparação dos valores da soma dos quadrados dos resíduos (SQR) e o critério de informação de Akaike (AIC) para cada tipo de inibição reversível estão apresentados na TABELA 13.

Como se pode observar pela TABELA 13 que o menor valor de SQR e de AIC foi para o modelo da inibição do tipo acompetitiva, 645 e 265, respectivamente. A partir dessas informações pode-se prosseguir para a etapa de cálculo das constantes cinéticas aparentes utilizando o RNLLS para o modelo de inibição do tipo acompetitiva. O valor da constante aparente de inibição ($K_{iu_{ap}}$) foi de $0,15 \pm 0,01$ M. A representação gráfica do modelo pode ser observada na FIGURA 23.

Tabela 13 – Valores de SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo formato na XR.

Tipo de Inibição	SQR	AIC
Competitiva	99487	466
Não-competitiva	2829	324
Acompetitiva	645	265
Mista	807	275

Figura 23. Atividade específica inicial da xilose redutase em função da concentração de xilose correspondentes a concentração de formato de (■) 0,50 M, (x) 0,25 M, (●) 0,10 M, (▲) 0,025 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo incompetitiva segundo o método RNLLS.

A inibição causada pelo formato sobre a enzima xilose redutase de *Candida tenuis* já havia sido reportada em Nidetzky et al. (1996), neste trabalho os autores encontraram uma constante da reação reversível de inibidor com complexo enzima/substrato (K_{iu}) de 0,12 M, valor muito próximo ao obtido neste trabalho. No trabalho destes autores, no entanto, o tipo de inibição observada foi a não-competitiva.

5.4.2 Sistema glicose desidrogenase

5.4.2.1 Glicose

Para a determinação do efeito da glicose quando a XR é empregada utilizando como substrato a xilose, há uma limitação na metodologia de determinação de atividade enzimática. Isto ocorre porque a metodologia de determinação da atividade de XR é baseada na oxidação da coenzima NADPH e a XR também pode utilizar a glicose como substrato, com a correspondente oxidação da mesma coenzima. Assim, não há como quantificar a atividade de XR devida à xilose ou à glicose de forma isolada. Utilizou-se então abordagem similar à de Nidetzky et al. (1996), a qual consistiu em determinar as constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes da XR quando o substrato foi a glicose. Os resultados obtidos estão apresentados nas FIGURAS 24 e 25, as quais apresentam a velocidade inicial da XR em função da concentração de glicose e a respectiva linearização do tipo Lineweaver-Burk, respectivamente.

A partir da linearização foi possível determinar as constantes cinéticas aparentes, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, as quais apresentaram valores de $0,20 \pm 0,02$ M e 42 ± 1 U.l⁻¹, respectivamente. O K_m aparente em relação à glicose é 3,2 vezes maior que em relação à xilose, demonstrando assim que a XR tem mais afinidade pela xilose em relação à glicose. A $V_{m\acute{a}x}$ aparente também diminuiu proporcionalmente ao K_m aparente, ou seja, 15,5 vezes. O trabalho de Nidetzky et al. (1996) apresentou um valor de especificidade de glicose para XR, em relação à xilose de 20%.

Figura 24. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de glicose. A curva representa os dados ajustados a equação de Michaelis-Menten.

Figura 25. Linearização do tipo Lineweaver-Burk relativa à xilose redutase em relação à glicose.

5.4.2.2 Gluconato

Foram realizados ensaios enzimáticos contendo gluconato em diferentes concentrações. Este composto, no pH do ensaio (7,2), apresentou-se na forma de íons gluconato. A FIGURA 26 apresenta os resultados obtidos para cada concentração de gluconato em relação à atividade específica inicial da XR.

Pode-se observar na FIGURA 26 que os resultados experimentais se ajustaram ao modelo de Michaelis-Menten. É possível observar também que o gluconato tem um efeito do tipo inibitório em relação à ação da XR quando a xilose é o substrato limitante, uma vez que a partir de uma concentração de 0,20 M de gluconato observa-se uma crescente diminuição na atividade inicial (FIGURA 26). O tratamento desses dados pelas linearizações da equação de Michaelis-Menten não resultou em informação conclusiva sobre o tipo de inibição exercida pelo gluconato na XR. Assim, a determinação do tipo de inibição foi baseada no cálculo dos valores de SQR e AIC para os diferentes modelos, conforme apresentado na TABELA 14.

Pode-se observar que os valores de SQR e de AIC para os modelos de inibição acompetitiva e mista são muito semelhantes. No entanto, o valor calculado para $K_{ic_{ap}}$ para o modelo misto é de 215 M, valor bastante elevado. Este valor implica que o termo na equação de Michaelis-Menten para inibição do tipo mista tende a zero, uma vez que o valor de $K_{ic_{ap}}$

(divisor) é alto e o valor da concentração de inibidor ([I]) (denominador) é menor que 1 (M) (EQUAÇÃO 19), $1/215 \approx 0$. Desta forma a EQUAÇÃO 19 se torna idêntica a do modelo acompetitivo (EQUAÇÃO 20).

Figura 26. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de gluconato de (■) 0,50 M, (x) 0,40 M, (●) 0,30 M, (▲) 0,20 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten.

Tabela 14 – Valores de K_{ic} , K_{iu} (aparentes), SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo gluconato na XR.

Tipo de Inibição	SQR	AIC	K_{ic} (M)	K_{iu} (M)
Competitiva	5487	363	<0	-
Não-competitiva	1264	270	0,67	-
Acompetitiva	301	217	0,67	-
Mista	299	219	215	0,67

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x_{ap}} \cdot [S]}{K_{m_{ap}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic_{ap}}}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu_{ap}}}\right)} \quad (19)$$

Na qual:

v = velocidade da reação ($U.l^{-1}$); $V_{m\acute{a}x_{ap}}$ = velocidade máxima de reação ($U.l^{-1}$); $[S]$ = concentração do substrato limitante (M); $K_{m_{ap}}$ = constante aparente de Michaelis-Menten (M); $K_{ic_{ap}}$ = constante de inibição aparente, reação entre inibidor e enzima livre (M); $[I]$ = concentração do inibidor (M) e; $K_{iu_{ap}}$ = constante de inibição aparente, reação entre inibidor e complexo enzima/substrato (M).

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x_{ap}} \cdot [S]}{K_{m_{ap}} + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic_{ap}}}\right)} \quad (20)$$

Pode-se, então, descartar o modelo de inibição mista e assumir que a inibição exercida pelo gluconato sob a XR é do tipo acompetitiva. Após a definição do tipo de inibição os dados foram submetidos ao RNLLS. O valor de $K_{iu_{ap}}$ calculado foi de $0,62 \pm 0,05$ M. As curvas representativas do modelo escolhido estão na FIGURA 27.

Figura 27. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de gluconato (■) 0,50 M, (x) 0,40 M, (●) 0,30 M, (▲) 0,20 M e (■) 0 M.. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo acompetitiva segundo o método RNLLS.

Pode-se observar na FIGURA 27 um ajuste adequado do modelo de inibição incompetitiva aos pontos experimentais. Deve-se ressaltar que o ajuste para o modelo do tipo misto resultou em curvas semelhantes às apresentadas na FIGURA 27 o que valida a simplificação proposta do modelo misto para o incompetitivo.

5.4.3 Sistema etanol desidrogenase

5.4.3.1 Etanol

Foram realizados ensaios enzimáticos contendo etanol em diferentes concentrações. A FIGURA 28 apresenta os resultados obtidos para cada concentração de etanol em relação à atividade específica inicial da XR.

Pode-se observar na FIGURA 28 que os resultados experimentais se ajustaram à equação de Michaelis-Menten e que o etanol tem um efeito do tipo inibitório em relação à ação da XR quando a xilose é o substrato limitante. Assim como para o gluconato, as linearizações da equação de Michaelis-Menten não resultaram em informação conclusiva sobre o tipo de inibição exercida pelo etanol na XR. Assim, a determinação do tipo de inibição foi baseada no cálculo dos valores de SQR e AIC para os diferentes modelos, conforme apresentado na TABELA 15.

No entanto, pode-se observar que os valores de SQR e de AIC para os modelos de inibição não competitiva e mista são muito semelhantes. Neste caso, não se pode descartar a hipótese do modelo misto pelo valor calculado de $K_{ic_{ap}}$, pois o mesmo tem as mesmas dimensões que os demais, sendo então realizada a análise do RNLLS para os dois modelos. Os resultados obtidos da análise de RNLLS estão apresentados na TABELA 16.

Figura 28. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de etanol de (x) 0,1,36 M, (●) 1,02 M, (▲) 0,68 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten.

Tabela 15 – Valores de Kic, Kiu (aparentes), SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo etanol na XR.

Tipo de Inibição	SQR	AIC	Kic (M)	Kiu(M)
Competitiva	8200	267	9,0	-
Não-competitiva	286	170	2,44	-
Acompetitiva	2195	229	2,44	-
Mista	254	169	1,620	2,44

Tabela 16 – Valores de SQR, AIC, Kic Kiu (aparentes) obtidos pela análise de RNLLS para os modelos de inibição do tipo não-competitiva e mista.

Tipo de Inibição	SQR	AIC	Kic (M)	Kiu(M)
Não-competitiva	227	163	2,20±0,15	-
Mista	220	164	1,79±0,40	2,52±0,44

Pode-se observar na TABELA 16 que os valores de SQR e de AIC para os modelos propostos são semelhantes e desta forma não se pode indicar o tipo de modelo por esta

informação. Existe também o fato de que os valores de K_{ic} e K_{iu} para o modelo do tipo misto e o valor de K_{ic} para o modelo não competitivo não apresentam diferença significativa entre si. Segundo a literatura (BISSWANGER, 2002; COPELAND, 2000; CORNISH-BOWDEN, 1995) a inibição não-competitiva é um tipo especial de inibição mista na qual K_{ic} é igual à K_{iu} , deste modo sua equação é mais simples (menos termos) e, conseqüentemente, possui menos erro. Por este motivo, definiu-se o tipo de inibição exercida pelo etanol sob a XR como a não-competitiva com um valor de $K_{ic_{ap}}$ de $2,20 \pm 0,15$ (TABELA 16).

As curvas representantes do modelo escolhido estão apresentadas na FIGURA 29. Pode-se observar na FIGURA 29 um ajuste adequado do modelo de inibição não-competitiva aos dados experimentais.

Figura 29. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de etanol, (x) 0,136 M, (●) 1,02 M, (▲) 0,68 M e (■) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo não-competitiva segundo o método RNLLS.

5.4.3.2 Acetaldeído

Foram realizados ensaios enzimáticos contendo acetaldeído em diferentes concentrações. A FIGURA 30 apresenta os resultados obtidos para cada concentração de etanol em relação à atividade específica inicial da XR.

Pode-se observar na FIGURA 30 que os resultados experimentais se ajustaram à equação de Michaelis-Menten e que o acetaldeído tem um efeito do tipo inibitório em relação à ação da XR quando a xilose é o substrato limitante. Assim como para o gluconato e etanol, as linearizações da equação de Michaelis-Menten não resultaram em informação conclusiva sobre o tipo de inibição exercida pelo etanol na XR. Assim, a determinação do tipo de inibição foi baseada no cálculo dos valores de SQR e AIC para os diferentes modelos, conforme apresentado na TABELA 17.

Figura 30. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de acetaldeído (x) 0,35 μM , ($\bullet$) 0,20 μM , ($\blacktriangle$) 0,15 μM e ($\blacksquare$) 0 M. Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa os dados ajustados pela equação de Michaelis-Menten.

Tabela 17 – Valores de K_{ic} , K_{iu} (aparentes), SQR e AIC para os diferentes tipos de inibição possíveis causados pelo acetaldeído na XR.

Tipo de Inibição	SQR	AIC	K_{ic} (M)	K_{iu} (M)
Competitiva	5204	228	9,0	-
Não-competitiva	565	171	2,44	-
Acompetitiva	707	177	2,44	-
Mista	735	180	1,62	2,44

Pode-se observar que os valores de SQR e de AIC para o modelo de inibição não-competitiva foram os menores (TABELA 17) por este motivo escolheu-se esse modelo de inibição para o cálculo mais preciso do $K_{ic_{ap}}$. Com essa finalidade, foi realizado o método de RNLLS para o modelo de inibição do tipo não competitiva e o resultado foi um valor de $K_{ic_{ap}}$ de $1,0 \pm 0,20 \mu\text{M}$. Esse valor de $K_{ic_{ap}}$ foi o menor entre todas as substâncias testadas, demonstrando que o acetaldeído tem um forte caráter inibitório em relação à enzima XR.

Pode-se observar na FIGURA 31 o ajuste do modelo de inibição não-competitiva aos pontos experimentais.

Figura 31. Atividade específica inicial da xilose redutase em relação à concentração de xilose correspondentes a concentração de acetaldeído: (x) $0,35 \mu\text{M}$, (●) $0,20 \mu\text{M}$, (▲) $0,15 \mu\text{M}$ e (■) 0 M . Os símbolos representam os dados experimentais e a linha representa a curva gerada pelo modelo de inibição do tipo não-competitiva segundo o método RNLLS.

5.5 DETERMINAÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO DE REGENERARAÇÃO *IN SITU* DA COENZIMA NADPH

A escolha do sistema de regeneração enzimática *in situ* da coenzima NADPH foi baseada nos tipos de inibição e nos valores de $K_{ic_{ap}}$ para cada possível substrato e produto testados. Os resultados obtidos para os sistemas de regeneração estão apresentados na TABELA 18.

Deve-se mencionar que os produtos do sistema de regeneração utilizando formato desidrogenase, gás carbônico e água, não foram considerados para os cálculos de sua

influência sobre a XR, uma vez que o CO₂ produzido estaria no estado gasoso, devido às condições experimentais, apresentando uma solubilidade baixa em água (pura) de, no máximo, 1,2 mM conforme calculado pela equação de Henry a 1 atm e 30 °C (LIMA et al., 2001). Além disso, como o sistema é aberto, não haveria acúmulo do mesmo na fase líquida.

Outro dado encontrado na TABELA 18 é a informação de que o tipo de inibição causado pela glicose sob a XR seria competitiva. Deve-se ressaltar que essa determinação foi presumida e não a partir de cálculos cinéticos e desta forma não foi possível determinar o seu respectivo K_{ic_{ap}}, como já explicado no item 5.4.2.1.

Tabela 18 – Tipo de inibição e valor de K_{ic_{ap}} para cada sistema de regeneração enzimática *in situ* da coenzima NADPH.

Sistema de regeneração	Substrato/produto	Tipo de inibição	K _{ic_{ap}} (M)
Formato	Formato/	Acompetitiva	0,15±0,01
Desidrogenase	CO ₂ +H ₂ O	-	-
Glicose	Glicose/	Competitiva	N.D.*
Desidrogenase	Gluconato	Acompetitiva	0,62±0,05
Etanol	Etanol/	Não-competitiva	2,20±0,15
Desidrogenase	Acetaldeído	Não-competitiva	(1,0±0,2).10 ⁻⁶

*Não definido

Foi considerado que o processo de produção enzimática de xilitol foi estudado sob o regime de batelada. Com essa condição, pode-se se excluir o sistema de regeneração utilizando etanol desidrogenase, uma vez que a inibição causada pelo produto (acetaldeído) é muito alta, K_{ic_{ap}} 1,0±0,2 μM, embora dentre as demais substâncias testadas, o etanol (substrato) foi o que resultou em uma menor inibição (K_{ic_{ap}} 2,20±0,15 M).

Dentre os dois sistemas de regeneração restantes pode-se destacar duas principais vantagens do utilizando formato desidrogenase sob o que emprega glicose desidrogenase. A primeira é que no sistema de regeneração que utiliza a enzima formato desidrogenase os produtos formados não interferem na ação da XR, sendo que a segunda vantagem é que no processo com a enzima formato desidrogenase não se gastaria com adição de uma base para o controle de pH durante a reação, uma vez que nenhum ácido é produzido. No entanto, os resultados demonstraram que o formato exerce uma inibição mais acentuada que o gluconato

(cerca de 4 vezes maior), embora não se tenha sido possível calcular o grau de inibição da glicose sob a XR. Além desse fato, há outros fatores que indicam ser o sistema glicose desidrogenase mais adequado. Há maior disponibilidade da enzima glicose desidrogenase no mercado e o seu custo também é menor, cerca de 5 vezes menor (SIGMA-ALDRICH, 2010). A produção de gluconato, subproduto do sistema de regeneração empregando glicose desidrogenase, possui diversas aplicações em produtos farmacêuticos e alimentícios (CROGNALÉ et al., 2008), o que torna o processo de obtenção enzimática de xilitol ainda mais economicamente atrativo. Outro fator decisivo é de que a glicose empregada no sistema de regeneração pode ser originada do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar ao contrário do formato que teria de ser adquirido separadamente.

Neste contexto, foi selecionado o sistema que emprega glicose desidrogenase como sistema de regeneração enzimática de coenzima NADPH para ser empregado em conjunto com a produção enzimática de xilitol.

5.6 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL

Dentre as variáveis que influenciam a ação catalítica das enzimas foram escolhidas para o estudo da produção enzimática de xilitol a concentração de xilose, de glicose, de NADPH, carga de XR e de GDH. O estudo da influência desses fatores foi realizado a partir de experimentos segundo um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , com triplicata no ponto central. A matriz do planejamento com os resultados para a variável-resposta produtividade volumétrica em xilitol (Q_p , $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) estão apresentados na TABELA 19. Os resultados foram inseridos no programa STATISTICA, versão 6.0, para se calcular os valores dos efeitos principais e sua respectiva significância. Esses valores estão apresentados na TABELA 20.

Os resultados de Q_p , calculados após 6 h de reação, variou de 0,20 a 1,17 $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (TABELA 19), demonstrando que a região de estudo escolhida foi adequada. A triplicata no ponto central mostrou que o experimento foi reprodutível, uma vez que apresentou um desvio menor de que 0,01. A análise estatística demonstrou que apenas os efeitos dos fatores concentração de xilose e de NADPH, além da média, foram significativos, a um nível de 90 % de confiança. Os dois efeitos foram de valor positivo demonstrando que a resposta, Q_p , é beneficiada pelo uso desses fatores nos níveis superiores (+1) o que pode ser observado pelos resultados de Q_p apresentados na TABELA 19, ensaios 15 e 16. No ensaio 15 os fatores

concentração de xilose e de NADPH estão no nível inferior (-1) o valor de Q_p foi de $0,35 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, no entanto no ensaio 16 quando esses fatores foram empregados no nível superior (+1) o valor de Q_p aumentou 3,3 vezes ($1,17 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Deste modo, esses fatores foram selecionados para otimização da produção enzimática de xilitol em batelada empregando meio sintético.

De acordo com a TABELA 19, o melhor resultado de Q_p ($1,17 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtido quando se empregou todos os fatores no maior nível superior (+1) e o menor resultado foi obtido quando todos os fatores foram empregados no nível (-1), a não ser pela concentração de glicose. Esse resultado demonstra que a velocidade da reação principal foi elevada com o aumento nas quantidades de substratos, xilose e NADPH, quando utilizada a mesma quantidade de enzima. Isso indica que a reação pode, provavelmente, se tornar mais rápida ainda mais com uma elevação da concentração desses dois substratos, uma vez que foi observado que os mesmos ainda estão em concentrações limitantes. Em relação ao sistema de regeneração de coenzima, os resultados demonstraram sua eficácia, uma vez que não foi observada uma eficiência de conversão de xilose a xilitol inferior a 99 %. Esse resultado demonstra que o sistema de regeneração funcionou adequadamente em conjunto com a reação principal de produção de xilitol.

Desta forma, a análise dos resultados demonstra que para a otimização do processo enzimático de produção de xilitol, em batelada, é necessário estudar uma faixa acima daquela que foi utilizada neste planejamento, utilizando como variáveis de entrada a concentração de xilose e de coenzima. Para isto decidiu-se empregar um planejamento completo 2^2 com as variáveis concentração de xilose e de NADPH.

Tabela 19 – VALores de Qp para os experimentos do planejamento 2^{5-1} para avaliação da produção enzimática de xilitol com valores reais (V.R.) e valores codificados (V.C.).

Exp.	Conc. de xilose		Conc. de glicose		Carga de GDH		Carga de XR		Conc. de NADPH		Qp (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
	V.C.	V.R. (M)	V.C.	V.R. (M)	V.C.	V.R. (U.ml ⁻¹)	V.C.	V.R. (U.ml ⁻¹)	V.C.	V.R. (mM)	
1	-1,0	0,033	-1,0	0,033	-1,0	0,20	-1,0	0,20	1,0	0,60	0,46
2	1,0	0,100	-1,0	0,033	-1,0	0,20	-1,0	0,20	-1,0	0,20	0,36
3	-1,0	0,033	1,0	0,100	-1,0	0,20	-1,0	0,20	-1,0	0,20	0,20
4	1,0	0,100	1,0	0,100	-1,0	0,20	-1,0	0,20	1,0	0,60	0,72
5	-1,0	0,033	-1,0	0,033	1,0	0,60	-1,0	0,20	-1,0	0,20	0,43
6	1,0	0,100	-1,0	0,033	1,0	0,60	-1,0	0,20	1,0	0,60	0,57
7	-1,0	0,033	1,0	0,100	1,0	0,60	-1,0	0,20	1,0	0,60	0,53
8	1,0	0,100	1,0	0,100	1,0	0,60	-1,0	0,20	-1,0	0,20	0,35
9	-1,0	0,033	-1,0	0,033	-1,0	0,20	1,0	0,60	-1,0	0,20	0,45
10	1,0	0,100	-1,0	0,033	-1,0	0,20	1,0	0,60	1,0	0,60	0,87
11	-1,0	0,033	1,0	0,100	-1,0	0,20	1,0	0,60	1,0	0,60	0,52
12	1,0	0,100	1,0	0,100	-1,0	0,20	1,0	0,60	-1,0	0,20	0,89
13	-1,0	0,033	-1,0	0,033	1,0	0,60	1,0	0,60	1,0	0,60	0,38
14	1,0	0,100	-1,0	0,033	1,0	0,60	1,0	0,60	-1,0	0,20	0,48
15	-1,0	0,033	1,0	0,100	1,0	0,60	1,0	0,60	-1,0	0,20	0,35
16	1,0	0,100	1,0	0,100	1,0	0,60	1,0	0,60	1,0	0,60	0,87
17	0	0,066	0	0,066	0	0,40	0	0,40	0	0,40	0,93
18	0	0,066	0	0,066	0	0,40	0	0,40	0	0,40	0,89
19	0	0,066	0	0,066	0	0,40	0	0,40	0	0,40	0,86

Tabela 20 – Estimativas por pontos e testes de significância para os efeitos principais em relação à resposta Qp.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t calculado (13 GL)*	p-valor
Média	0,60	0,055	12,0	<0,01
Xilose	0,26	0,110	2,4	0,03
Glicose	0,09	0,110	0,8	0,42
XR	-0,02	0,110	-0,2	0,81
GDH	0,18	0,110	1,7	0,11
Coenzima	0,21	0,110	2,0	0,07

*GL: grau de liberdade; t tabelado = $\pm 1,77$ para nível de confiança de 90% e 13 GL.

5.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL EM REGIME DE BATELADA EMPREGANDO MEIO SINTÉTICO

Foram escolhidas para o estudo da otimização da produção enzimática de xilitol em meio sintético sob regime de batelada a concentração de xilose e concentração de NADPH. Para isto foi realizado um planejamento completo 2^2 do tipo estrela com triplicata no ponto central, sendo que a metodologia de superfície de resposta foi empregada. A matriz do planejamento com os resultados para a variável-resposta produtividade volumétrica em xilitol (Qp, $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) estão apresentados na TABELA 21. Os resultados foram computados no programa STATISTICA e DESIGN EXPERT para se obter os valores dos efeitos principais e sua respectiva significância, coeficientes, modelo estatístico, análise variância (ANOVA) do modelo e superfície de resposta.

Os resultados apresentados na TABELA 21 demonstram que o deslocamento da região de estudo favoreceu a produtividade, uma vez que a média dos valores, comparada com o primeiro planejamento, aumentou de 0,60 para 1,42 $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O maior resultado de Qp (1,63 $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi observado no ensaio 10 (TABELA 21), o qual é uma das replicatas do ponto central, esse resultado apontou que provavelmente se está trabalhando na região de ótimo para esta resposta.

A análise de significância dos efeitos principais, termos lineares e quadráticos e sua interação está apresentada na TABELA 22.

Tabela 21 – Resultados de Qp para os experimentos do planejamento 2² com valores codificados (V.C.) e valores reais (V.R.).

Ensaio	Conc. de xilose		Conc. de NADPH		Qp (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
	V.C.	V.R. (M)	V.C.	V.R. (mM)	
1	-1,0	0,100	-1,0	0,60	1,03
2	1,0	0,400	-1,0	0,60	1,40
3	-1,0	0,100	1,0	2,40	1,33
4	1,0	0,400	1,0	2,40	1,51
5	-√2	0,039	0	1,50	1,20
6	+√2	0,460	0	1,50	1,12
7	0	0,250	-√2	0,23	1,61
8	0	0,250	+√2	2,80	1,52
9	0	0,250	0	1,50	1,59
10	0	0,250	0	1,50	1,68
11	0	0,250	0	1,50	1,63

Tabela 22 – Valor dos efeitos e testes de significância para os fatores

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t calculado (GL 2)*	p – valor
Média	1,63	0,020	80,2	<0,01
Xilose	0,25	0,024	10,0	0,01
Xilose ²	-0,25	0,030	-8,3	0,01
NADPH	0,28	0,025	11,4	<0,01
NADPH ²	-0,35	0,030	-11,8	<0,01
Xilose.NADPH	-0,10	0,033	-3,0	0,09

*GL: grau de liberdade; t tabelado = ±2,92 para nível de confiança de 90% e 2 GL

Os testes de significância demonstraram que todos os efeitos foram significativos a um nível de confiança de 90 %. Os efeitos principais concentração de xilose e NADPH foram positivos, indicando que a produtividade é beneficiada quando os dois fatores são empregados no nível superior (+1) e de fato um dos melhores resultados de Q_p ($1,51 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtido nessa condição. No entanto, o valor da interação dos fatores foi negativo o que contradiz a análise dos efeitos isolados. A interação com valor negativo indica que o melhor seria utilizar estes valores em níveis opostos, um no negativo e ou outro no positivo e vice-versa. Contudo, deve-se salientar duas observações segundo a validade real da significância da interação:

1) Para o cálculo do efeito da interação quatro ensaios são usados, os quatro primeiros (1 ao 4), sendo que o efeito é determinado pela média dos ensaio 1 e 4 menos a média dos ensaios 2 e 3. Como o valor de Q_p do ensaio 1 foi muito baixo ($1,03 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) embora o valor de Q_p do ensaio 4 tenha sido o maior, a média foi menor que a média dos ensaios 2 e 3. Esse fato indica que a produtividade é beneficiada quando os dois fatores são empregados no valor superior e bastante prejudicada quando são empregados nos níveis inferiores, provavelmente devido a menores concentrações desses substratos o que pode diminuir a velocidade de reação. Esse fato é apoiado pela análise, mencionada anteriormente, sobre o valor dos efeitos principais. Assim, o baixo valor do ensaio 1 induziu um sinal negativo, inadequado, a interação.

2) Se o critério de significância fosse mais elevado, 95 % por exemplo, observar-se-ia que o valor do efeito da interação não seria significativo, sendo que os demais efeitos continuariam sendo significativos. Deste modo, poder-se-ia desconsiderar a interação da análise. No entanto, é aconselhado em caso de otimização a empregar-se nível de confiança de 90 %.

Após a decisão de se manter todos os termos partiu-se para o cálculo e análise de significância do modelo quadrático.

Os coeficientes de cada termo do modelo com seus respectivos testes de significância estão apresentados na TABELA 23 e a análise de variância (ANOVA) do modelo está apresentada na TABELA 24.

Tabela 23 – Valores dos coeficientes calculados para cada fator e testes de significância

Fatores	Valor do efeito	Desvio Padrão	t calculado (2 GL)*	p-valor
Média	1,63	0,020	80,2	<0,01
Xilose	0,12	0,012	10,0	<0,01
Xilose ²	-0,12	0,015	-8,4	0,01
NADPH	0,14	0,012	11,4	<0,01
NADPH ²	-0,17	0,015	-11,8	<0,01
Xilose.NADPH	-0,06	0,018	-3,3	0,08

*GL: grau de liberdade; t tabelado = $\pm 2,92$ para nível de confiança de 90% e 2 GL

Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) e valores de variação do modelo quadrático proposto.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	p – valor
Regressão	0,50	5	0,10	60,0	<0,01
Resíduos	0,01	5	0,02	-	-
Total	0,51	10	-	-	-
Falta de ajuste	0,006	3	0,002	1,6	0,42
Erro Puro	0,002	2	0,001	-	-

% de variação explicada: 98,6

% máxima de variação explicada: 99,6

Valor de F tabelado = 5,05 para 5 GL da regressão ,5 GL dos resíduos e 95 % de nível de confiança

Como pode ser observado na TABELA 23 todos os coeficientes foram significativos e segundo ANOVA (TABELA 24) o modelo quadrático é adequado para explicar o comportamento da produtividade em função da concentração de xilose e de NADPH, na região em estudo, uma vez que a falta de ajuste do modelo não foi significativa.

A EQUAÇÃO 21 apresenta o modelo quadrático.

$$Q_p = 1,63 + X_1 \cdot 0,12 - X_1^2 \cdot 0,12 + X_2 \cdot 0,14 - X_2^2 \cdot 0,17 - X_1 \cdot X_2 \cdot 0,006 \quad (21)$$

No qual:

X_1 : Concentração de xilose (valores codificados)

X_2 : Concentração de NADPH (valores codificados)

Este modelo também apresentou um satisfatório valor de variação explicada demonstrando que também é preciso na predição de valores de Q_p na região compreendida. Esse fato pode ser visualizado na FIGURA 32, a qual apresenta os valores de Q_p observados em função dos valores preditos pelo modelo.

Figura 32. Valores observados em função dos valores preditos pelo modelo estatístico. Os pontos representam os dados experimentais e a curva representa o modelo.

Após confirmação da significância do modelo estatístico, realizou-se a otimização do processo enzimático de produção de xilitol empregando meio sintético em regime de batelada utilizando a metodologia de superfície de resposta. A superfície de resposta com suas respectivas curvas de contorno estão apresentadas na FIGURA 32.

Figura 33 – a) Superfície de resposta; b) Curvas de contorno e c) Curvas de contorno com os valores de Q_p segundo o modelo estatístico (EQUAÇÃO 21).

Pode ser observado na FIGURA 33b e 33c uma ampla região que compreende um valor maior ou igual a uma produtividade de $1,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, sendo que a resolução matemática do modelo apontou o valor de $1,68 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ como sendo o máximo, referente à coordenada $0,31 \text{ M}$ e $1,80 \text{ mM}$ para concentração de xilose e de NADPH, respectivamente. Esses resultados superam os valores encontrados na literatura (BRANCO et al., 2009; SAMPAIO et al., 2006) para a produção de xilitol empregando microrganismos em meio sintético em regime de batelada. A ampla região com valor igual a $1,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ é uma vantagem para futuros estudos, pois comprova que o processo é robusto na região de estudo. E desde que a coenzima tem grande contribuição para o custo do processo decidiu-se para futuras

investigações, visando à viabilidade econômica do processo, utilizar-se o menor valor de coenzima possível para se obter $1,60 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, essa coordenada corresponde a 0,34 M e 1,20 mM de concentração de xilose e de NADPH, respectivamente.

O modelo pode ser validado pela realização de ensaios, em duplicata, nas condições descritas acima, concentração de xilose de 0,34 M e concentração de coenzima de 1,20 mM. Foi observado um valor médio de Q_p de $1,58 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, esse valor e erro estão de acordo com os limites de confiança do modelo.

5.8 DETERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE ULTRA E NANO FILTRAÇÃO PARA RETENÇÃO DE NADPH E ENZIMAS

5.8.1 Determinação de Membrana para Retenção da Coenzima

Como já mencionado anteriormente, a retenção da coenzima no sistema de reação representa importante informação e parâmetro para tornar o processo enzimático mais atraente, economicamente, uma vez que permitirá sua reutilização. Para este fim, membranas de ultra e nanofiltração foram testadas visando à retenção do cofator no meio reacional, conforme metodologia apresentada no item 4.7.

As membranas de tamanho de corte de 100, 30 e 10 kDa não reteram a coenzima NADPH, provavelmente pelo tamanho dos poros ser bem maior que o tamanho da coenzima. O melhor valor do fator de retenção ocorreu quando se empregou a membrana de 1 kDa, 98 % em massa, seguida pela membrana de 3 kDa (85 %) e 5 kDa (60 %). Deve-se destacar o resultado de 98 % de retenção para a membrana de 1 kDa, uma vez que a coenzima tem um tamanho de 700-800 Da. Esse fato foi provavelmente devido ao volume espacial ocupado da coenzima que deve ser maior que àquele relacionado com sua massa molecular o que fez com que a mesma não pudesse passar pelos poros de 1 kDa da membrana. Resultados de retenção, empregando membranas, para coenzima NADH foram relatados por Nidetzky et al., (1996). Nesse trabalho os autores conseguiram reter valores superiores a 99 % da coenzima empregando membranas de 0,7-1 kDa. No entanto, houve retenção de glicose pelas membranas e também houve necessidade de modificação de sua superfície.

Deste modo a membrana escolhida para retenção da coenzima foi a de 1 kDa de tamanho de poro uma vez que resultou na melhor retenção de coenzima NADPH.

5.8.2 Avaliação das membranas para retenção dos demais componentes

As membranas de 100, 30, 10, 5, 3 e 1 kDa de poro foram avaliadas para retenção dos demais componentes reacionais: xilose, glicose, xilitol, ácido glucônico (gluconato), XR e GDH. Em nenhum dos experimentos houve retenção de xilose, glicose, xilitol e ácido glucônico, provavelmente devido às suas baixas massas moleculares (150-200 Da) em relação ao tamanho de corte das membranas. Foi possível reter 100 % da enzima XR com a membrana de poro de 10 kDa (e as de corte inferiores), sendo que para a membrana de 30 kDa houve uma retenção de 85 % e para a de 100 kDa houve retenção de 10 %. De acordo com Woodyer et al., (2005), a XR se apresenta, na maioria das vezes, como um dímero de subunidades de 30 a 38 kDa, sendo que a massa molecular nativa pode variar de 33 a 70 kDa. Deve-se salientar que a massa molecular da XR de *Candida guilliermondii* FTI 20037 não está nesta relação, a mesma nunca foi devidamente determinada para a XR mencionada. Em relação à GDH, houve retenção de 80 % para a membrana de 100 kDa e a partir da membrana de 30 kDa houve retenção de 100 %, esses resultados estão de acordo com a literatura (BONETE et al., 1996; SMITH et al., 1989) que apresentam valores de massa molecular para a GDH de 90 e 160 kDa.

Pode-se afirmar que para se reter as enzimas utilizadas na catálise de produção de xilitol visando sua reutilização ou recirculação no meio reacional é adequado o emprego de uma membrana de 10 kDa. Contudo, não se pode excluir a membrana de 30 kDa, uma vez que a mesma apresentou altos valores de retenção e que permitiria um maior fluxo transmembrana.

5.8.3 Caracterização das membranas

Como mencionado anteriormente, foi realizado a caracterização das membranas em relação à permeabilidade hidráulica (L_p) e fluxo hidráulico máximo (J_p). Esses parâmetros são essenciais para se conhecer melhor o processo de separação com membranas e a partir dos mesmos pode-se determinar, por exemplo, as limitações do sistema.

A TABELA 25 apresenta os valores de permeabilidade hidráulica (L_p) e fluxo hidráulico máximo (J_p) para as membranas estudadas.

Tabela 25 – Valores de permeabilidade hidráulica (L_p) e fluxo hidráulico máximo (J_p) para membranas de ultra e nanofiltração de diferentes cortes.

Membrana (kDa)	J_p ($\text{l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$)	L_p ($\text{l.h}^{-1}.\text{atm}^{-1}.\text{m}^{-2}$)
100	129.6	509.3
30	43.2	231.5
10	5.2	18.1
5	3.6	10.6
3	1.8	6.9
1	1.1	3.9

Pode-se observar que quanto menor o tamanho do corte da membrana menor é o valor de J_p e L_p , isso se deve ao fato de quanto menor o poro da membrana maior a resistência oferecida pela mesma.

Atualmente, a literatura reporta valores de permeabilidade e fluxo para membranas de fibra oca e na maioria das vezes em relação a sistemas de filtração tangenciais. Sendo assim, a comparação dos valores de permeabilidade e fluxo valores com a literatura se torna complicado, pois neste trabalho tanto as membranas como o tipo de processo alteram consideravelmente a resistência imposta ao que foi filtrado. Por exemplo, no trabalho de Rodrigues et al., (2003) foi empregado um sistema de fluxo tangencial com duas membranas de ultrafiltração, 10 e 30 kDa, sendo que os autores obtiveram uma permeabilidade hidráulica foi de 51,5 e 173,2 $\text{l.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{atm}^{-1}$, respectivamente, que são valores superiores aos relatados nesse trabalho justamente devido à resistência exercida pela membrana e pelo tipo de condução do processo.

5.9 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou teor médio de umidade de 11%, determinado em detector de umidade (LJ16 Moisture Analyzer, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil) e foi submetido à hidrólise ácida realizada conforme item 4.8.

Os hidrolisados bruto e tratado foram submetidos à caracterização em relação às concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Os resultados da caracterização estão apresentados na TABELA 26.

Tabela 26 – Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar bruto e tratado

Composto	Bruto (g.l ⁻¹)	Tratado (g.l ⁻¹)
Glicose	2,7	2,2
Xilose	19,9	18,5
Arabinose	1,8	1,2
Ácido Acético	2,1	1,6
HMF	0,05	0,002
Furfural	0,68	0,002

Como pode ser observado na TABELA 26, as condições de hidrólise promoveram um hidrolisado rico em xilose, com uma concentração cerca de 8 vezes maior que a de glicose, e cerca de 10 vezes maior que a de arabinose. Este fato demonstra a extração seletiva da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar. A concentração de glicose obtida foi maior que a observada em outros trabalhos, realizados sob condições semelhantes de hidrólise. Nos trabalhos de Cunha (2006) os autores verificaram 1,3 g.l⁻¹ de glicose e Carvalho (2000) verificou 1,66 g.L⁻¹ deste açúcar. Essa diferença pode ser atribuída às diferentes origens do bagaço de cana-de-açúcar utilizado em cada caso. A concentração de xilose obtida está na média dos valores encontrados na literatura.

Após a etapa de tratamento, observou-se diminuição na concentração dos inibidores como esperado. As concentrações de furfural, HMF e de ácido acético reduziram em 96 %; 99 % e 23 %, respectivamente. Esses resultados evidenciam a eficiência do processo de tratamento de, apesar de se ter observado diminuição na concentração dos açúcares também, 20 % em média. Esse fato está associado principalmente à primeira etapa do tratamento, elevação do pH com CaO, pois é formado um precipitado espesso acima da membrana a qual provavelmente adsorve parte dos açúcares. De acordo com Cunha (2006) essas perdas podem ser atribuídas pela ocorrência de arrastes destes compostos durante o tratamento do hidrolisado uma vez que neste processo há intensa variação de pH e formação de precipitados, os quais são removidos por filtração.

Após a preparo, tratamento e caracterização do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar foram realizados testes de produção enzimática de xilitol em meio contendo o hidrolisado tratado.

5.10 TESTES COMPARATIVOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM DIFERENTES ORIGENS DE XR E MEIOS REACIONAIS

Foram realizados experimentos visando à comparação do desempenho da enzima XR, proveniente de meio sintético e de hidrolisado, na reação enzimática de produção de xilitol em meio sintético e em hidrolisado. Deste modo, foram realizados quatro ensaios (duplicata), os quais correspondem às quatro combinações possíveis de origem da enzima e meio reacional de produção enzimática de xilitol, como apresentado na TABELA 9 (item 4.9). A TABELA 27 apresenta os resultados dos parâmetros para os ensaios realizados. Os ensaios foram abreviados por: CC: quando a XR foi proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em meio sintético e produção enzimática de xilitol em meio sintético; CH: quando a XR foi proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em meio sintético e produção enzimática de xilitol em hidrolisado; quando a XR foi proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado e produção enzimática de xilitol em meio sintético e; HH: quando a XR foi proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado e produção enzimática de xilitol em hidrolisado.

Tabela 27 – Parâmetros de processo para a produção enzimática de xilitol para os ensaios comparativos realizados.

Ensaio	Eficiência de conversão (%)	Qp (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Consumo de xilose (%)	Xilitol (g.l ⁻¹)
CC	99±1,3	0,32±0,021	23±1,4	3,84±0,17
CH	99±1,5	0,20±0,030	18±1,0	2,40±0,13
HC	98±2,7	0,31±0,019	22±1,1	3,72±0,012
HH	98±2,0	0,21±0,019	16±1,7	2,35±0,11

CC: XR proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em meio sintético e produção enzimática de xilitol em meio sintético; CH: XR proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em meio sintético e produção enzimática de xilitol em hidrolisado; HC XR proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado e produção enzimática de xilitol em meio sintético e; HH: XR proveniente do cultivo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado e produção enzimática de xilitol em hidrolisado.

Foi observado formação de xilitol e consumo de xilose em todos os experimentos realizados. Esse fato indica que o hidrolisado pode ser empregado tanto como fonte de

carbono para o crescimento microbiano para a produção de XR como na própria reação de produção de xilitol por esta enzima. Pode-se observar na TABELA 27 que os melhores resultados foram obtidos quando empregou-se meio reacional sintético, independente no meio de cultivo para produção da XR (CC e HC). E também deve ser mencionado que os resultados de produtividade volumétrica em xilitol (Q_p) obtidos para o ensaio no qual o meio de cultivo e meio reacional foram compostos de hidrolisado (HH) foram os mesmos que para o ensaio no qual a o cultivo foi em meio sintético e o meio reacional em hidrolisado (CH). Deste modo, pode-se dizer que o comportamento da produção enzimática de xilitol não foi influenciado pelo meio de cultivo no qual foi produzida a enzima e sim pelo meio reacional. Esse fato comprova, de certa forma, que o extrato enzimático pré-purificado não contém ou possui pequenas quantidades de substâncias provenientes do hidrolisados, as quais poderiam afetar a reação. Deve-se salientar ainda que a eficiência do processo foi semelhante em todos os ensaios, demonstrando mais uma vez a viabilidade técnica do emprego de hidrolisado tanto na etapa de produção da enzima como na reação de produção enzimática de xilitol.

5.11 ENSAIOS DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE XILITOL COM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Hidrolisados de biomassa tem sempre sido uma fonte de carbono de difícil uso devido a sua complexidade em compostos tóxicos que podem prejudicar severamente um bioprocessos. Para entender o efeito e avaliar o potencial do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de xilose e glicose, diferentes quantidades de hidrolisado foram empregadas no meio reacional. A FIGURA 34 apresenta as concentrações de xilose e glicose enquanto que a FIGURA 35 apresenta a concentração de glicose e gluconato e a FIGURA 36 apresenta a concentração de NADPH durante a reação.

Figura 34. Concentração de xilose (símbolos em preto) e xilitol (símbolos em branco) em função do tempo de reação para os experimentos com diferentes quantidades de hidrolisado no meio reacional: controle (■); 20 % (◆), 40 % (▲), 80 % (●) e 100 % v.v⁻¹ (▼). As curvas representam o ajuste dos dados experimentais.

Figura 35. Concentração de glicose (preto) e gluconato (branco) em função do tempo de reação para os experimentos com diferentes quantidades de hidrolisado no meio reacional: controle (■); 20 % (◆), 40 % (▲), 80 % (●) e 100 % v.v⁻¹ (▼). As curvas representam o ajuste dos dados experimentais.

Figura 36. Concentração relativa de NADPH em função do tempo de reação para os experimentos com diferentes quantidades de hidrolisado no meio reacional: controle (■); 20 % (◆), 40 % (▲), 80 % (●) e 100 % v.v⁻¹ (▼). As curvas representam o ajuste dos dados experimentais.

Em todos os experimentos foi observado a redução da concentração de xilose, glicose e NADPH concomitante com a formação de xilitol e gluconato (FIGURAS 34-36). Adicionalmente, foi observado também uma redução considerável nas taxas de consumo e produção após 12 horas de reação, provavelmente devido ao esgotamento de glicose. Se a glicose for totalmente exaurida, o ciclo de regeneração não pode funcionar efetivamente, deste modo não haverá mais produção de xilitol e gluconato. Essa é a reação pela qual os parâmetros foram calculados após 12 horas de reação (TABELA 28). De acordo, com as FIGURAS 34 e 35 e a TABELA 28 o comportamento do consumo de xilose e glicose e a produção de xilitol e gluconato foram semelhantes para os experimentos controle, 20 e 40 % v.v⁻¹. Esse fato indica que uma mistura de meio comercial com 40 % v.v⁻¹ de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado não interferiria no curso da reação, sendo uma vantagem para a viabilidade desse processo, uma vez que o uso, mesmo parcial, de hidrolisado representa uma redução de custo

Tabela 28 – Parâmetros de processo para a produção enzimática de xilitol com diferentes quantidades de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar após 12 horas de reação.

Quantidade de hidrolisado (% v.v ⁻¹)	Eficiência (%)	Qp (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Consumo de xilose (%)	Xilitol (mM)	-ΔNADPH (mM)	TTN
Controle	98±2,3	0,33±0,025	22±1,3	26,0±0,10	0,029 ±0,0050	325±20,2
20	99±1,4	0,33±0,033	21±1,0	26,0±0,11	0,039±0,0011	287±18,2
40	98±2,5	0,32±0,014	21±1,1	25,2±0,012	0,039±0,0013	281±19,1
80	103±2,0	0,28±0,018	18±1,1	22,1±0,13	0,052±0,0020	214±16,3
100	98±1,5	0,26±0,015	17±1,2	20,5±0,11	0,053±0,0022	197±15,4

Houve uma redução significativa nas taxas de produção de xilitol e regeneração de NADPH nos experimentos com aumento na quantidade de hidrolisado no meio reacional (TABELA 28). Esse fato pode ser evidenciado pelos resultados de produtividade volumétrica em xilitol (Qp) e número total de *turnovers* (TTN) (TABELA 28). De acordo com a TABELA 28, houve um decréscimo de 15 e 20 % em Qp, e de 35 pe 40 % em TTN para os experimentos de 80 e 100 % v.v⁻¹ de hidrolisado, respectivamente, comparado ao ensaio controle. A literatura descreve que hidrolisados contém muitas substâncias derivadas da hidrólise material que são tóxicas ao metabolismo microbiano (ALMEIDA et al., 2007; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009) e para a maioria destes compostos o mecanismo de inibição e efeito sinérgico não foram completamente elucidados. Também foi relatado que provavelmente existem substâncias desconhecidas provenientes da hidrólise que podem prejudicar os bioprocessos. Desta forma, o fenômeno observado poderia ter sido causado por várias razões, como inibição da atividade enzimática. Deve-se mencionar que as atividades de XR e de GDH foram medidas no início e após 24 h de reação e ambas mantiveram as mesmas atividades, podendo-se dizer que se foram afetadas por alguma(s) substância(s) do hidrolisado, o efeito foi reversível.

Foi observada uma eficiência de conversão de xilose em xilitol de 100 % em todos os ensaios. Esse resultado demonstra que as condições experimentais empregadas tornaram possível direcionar a xilose apenas a xilitol ao invés de sorbitol pela enzima do sistema de regeneração GDH. Esse fato também demonstrou que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço

de cana-de-açúcar não causou desvio ou reações em paralelo com o sistema de enzimático de produção de xilitol, embora a reação tenha sido afetada por outros meios pela quantidade de hidrolisado. Em trabalhos anteriores com produção enzimática de xilitol (NIDETZKY et al., 1996) empregando meio sintético, também foi reportado conversão estequiométrica. De acordo com a literatura o processo químico possui uma eficiência de 50-60 % com base na xilana total do material que foi convertido em xilitol (NIDETZKY et al., 1996) e para a via microbiológica valores de 70-95 % tem sido reportados (BRANCO et al., 2009; SARROUH;BRANCO;SILVA, 2009), no entanto deve-se salientar que para alcançar elevados valores de eficiência na via microbiológica a Qp deve ser significativamente prejudicada.

5.12 ESTRATÉGIAS DE AUMENTO DA ESTABILIDADE À ESTOCAGEM DO EXTRATO PRÉ-PURIFICADO DE XILOSE REDUTASE

Durante o desenvolvimento do trabalho observou-se a fragilidade do extrato enzimático pré-purificado de XR a estocagem, ou seja a perda, relativamente, rápida de atividade de XR com o tempo. Observaram-se perdas de até 55 % de atividade em um período de 7 dias. Esse fato motivou a busca de alternativas para o aumento da estabilidade a estocagem desse extrato. Essa baixa estabilidade pode ter sido causada pelas altas concentrações de acetato (tampão) e/ou de NaCl, provenientes do processo de pré-purificação.

Deste modo, a primeira opção para a melhoria da estabilidade do extrato de XR foi a realização de diálise do extrato pré-purificado. A TABELA 29 apresenta os resultados do extrato dialisado e do controle (não dialisado). Pode-se observar que quase não houve perda de atividade devido ao processo de diálise (9 %) inclusive houve um discreto aumento na pureza do extrato, provavelmente devido à retirada de moléculas similares a proteínas, de baixa massa molecular. Houve grande remoção de íons, uma vez que a condutividade reduziu de 200 para 0,08 mS.

Tabela 29 – Resultados de atividade (atv), atividade volumétrica (atv. vol.) e atividade específica (atv. esp.) entre outros do extrato pré-purificado de XR antes e após diálise.

Extrato	Atv vol. (U.mL ⁻¹)	Atv. esp. (U.mg ⁻¹)	Proteínas totais (mg.mL ⁻¹)	Atv. (U)	Vol. (mL)	Condutividade (mS)	Perda em atividade* (%)	AP**
Não-dialisado	3.30	1.10	3.0	33	10	200	-	-
Dialisado	0.75	1.20	0,63	30	40	0,08	9,0	1,09

* Em relação a atividade ** Em relação a atividade específica

A segunda opção que visou à melhoria na estabilidade a estocagem foi a troca do tampão utilizado na pré-purificação. Não houve diferença na atividade obtida após a pré-purificação quando se substituiu o tampão acetato pelo TRIS/HCl, o que comprovou que o principal responsável pela remoção da enzima do interior das micelas é o sal, no caso o NaCl (CORTEZ 2002; CORTEZ et al., 2004).

A FIGURA 37 apresenta a atividade relativa em função do tempo de estocagem, a 4 °C, para diferentes extratos: não pré-purificado (NP), pré-purificado não dialisado (PND), pré-purificado dialisado (PD), pré-purificado não dialisado (tampão TRIS/HCl 70 mM pH 7,2, PND2). A dificuldade mencionada anteriormente pode ser observada na FIGURA 37. Em apenas 6 dias a atividade reduzia para 55 % da inicial, deste modo pode-se afirmar que a diálise, assim como a troca do tampão original utilizado na pré-purificação (acetato) foram bem sucedidos. A diálise permitiu que em uma semana a perda relativa ao extrato pré-purificado reduziu-se 40 %, provavelmente devido à retirada de íons e/ou substâncias que interferiram negativamente sob a XR. No entanto, um resultado significativo foi da estocagem realizada com o extrato que foi pré-purificado com o tampão TRIS/HCl 70 mM pH 7,2 ao invés do tampão acetato 1,0 M pH 5,5. Em relação ao extrato pré-purificado houve uma diminuição na perda de 45 %, valor maior que o do extrato dialisado. Esse fato pode ser devido ao tipo de tampão, concentração do tampão e pH de estocagem. Optou-se pela troca do tampão e sua concentração utilizado na pré-purificação, uma vez que foi comprovado que essa mudança permitiu que a enzima se torna mais estável durante a sua estocagem.

Figura 37. Atividade relativa dos extratos em função do tempo de estocagem a 4 °C. (♦) bruto (NP); (■) pré-purificado (PP); (▲) pré-purificado dialisado (PD) e; (●) pré-purificado com tampão TRIS/HCl. Os símbolos representam os pontos experimentais e as curvas representam o respectivo ajuste desses pontos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir que:

- ✓ O aumento de K_{La} , de 12 h^{-1} para 50 h^{-1} , nas fermentações resultou em um aumento na produção de xilose redutase e na produtividade em xilitol.
- ✓ O tampão TRIS/HCl empregado na pré-purificação do extrato enzimático pelo foi a melhor alternativa para a melhoria da estabilidade da XR.
- ✓ O meio de cultivo de obtenção da enzima xilose redutase não influenciou na reação de produção enzimática de xilitol.
- ✓ Foi definido o sistema que emprega glicose desidrogenase como sistema de regeneração enzimática de coenzima NADPH para auxiliar a produção enzimática de xilitol, uma vez ser este o que exerceu menor influência sobre o sistema reacional.
- ✓ Membranas de tamanho de poro de 10 kDa permitiram apenas a retenção das enzimas xilose redutase e glicose desidrogenase, enquanto que membranas de tamanho de poro de 1 kDa permitiram a retenção de 99 % da coenzima NADPH.
- ✓ As variáveis concentração de xilose e de NADPH foram selecionadas para a otimização do processo enzimático de produção de xilitol em regime de batelada utilizando planejamento experimental 2^{5-1} .
- ✓ Na etapa de otimização, o modelo estatístico quadrático foi o mais adequado para explicar a produtividade volumétrica em xilitol em função das variáveis concentração de xilose e de NADPH.
- ✓ A melhor condição de produção enzimática de xilitol em meio contendo xilose comercial foi de 0,34 M e 1,20 mM de concentração de xilose e de NADPH, respectivamente, nessas condições obteve-se uma produtividade volumétrica em xilitol de $1,58 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ correspondendo a uma eficiência de conversão de xilose em xilitol de 99 %.

- ✓ A reação de produção enzimática de xilitol não foi prejudicada pelo emprego de 40 % v.v⁻¹ de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e tratado, onde obteve-se nessas condições valores semelhantes de produtividade volumétrica em xilitol e eficiência de conversão de xilose em xilitol àqueles obtidos em meio contendo xilose comercial.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. *Bol. SBCTA*, v. 33, n. 2, p. 184-93, 1999.
- AKSU, S.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLLMANNA, F. A New Regeneration System for Oxidized Nicotinamide Cofactors. *Advance Synthesys Catalalysis*, v. 351, p. 1211 – 1216, 2009.
- ALMEIDA, J. R.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 340-349, 2007.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pre treatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70/72, p. 89-98, 1998.
- ANNIES. - Annies Marlborough Ltd. Disponível na internet, <http://www.annies.co.nz/xylitoldemand.html>. Acesso em 2009.
- AUTIO, J. T. Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* in preschool children. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, v. 69 , n. 1 , p. 81-6, 2002.
- BAEA, S. M.; PARKA, Y. C.; LEEA, T. H.; KWEONA, D. H.; CHOIA, J. H.; KIMB, S. K.; RYUC, Y. W.; SEOA, J.H. Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35 p. 545–549, 2004.
- BÄR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 349-79.
- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHENEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and same factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 3, p. 241-51, 1988.
- BAUDEL, H. M.; ZAROR, C.; ABREU, C. A. M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Industrial Crops and Products*, v. 21, p. 309-315, 2005.
- BISSWANGER, H. Enzyme kinetics. In: ENZYME KINETICS. Alemanha: Wiley-Vch, 2002. p. 51-158.

BONETE, M-J.; PIRE, C.; LLORCA, F.I.; CAMACHO, M.L. Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: Enzyme purification, characterization and N-terminal sequence. **FEBS Letters**, v. 383, p. 227-229, 1996.

BOUCHOUX, A.; BALMANN, H. R.; LUTIN, F. Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production process based on convention and bipolar eletrodialysis operations. **Separation and purification technology**, v. 4 p. 33-45, 2006.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72 , p. 248-54 1976.

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; MURAKAMI, L. Y.; MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G; SILVA, S. S. Xylitol Production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. **Process Biochemistry**, v.42, p.258 - 262, 2007.

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; PESSOA JR., A.; SILVA S. S. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 84, p. 326-330, 2009.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BRUINENBERG, P. M.; BOT, P. H. M.; DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 256-60, 1984.

CARVALHO, W. **Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio**. 2004. 110f. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Lorena, São Paulo, 2004.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 553-9, 2003.

CARVALHO, W; SANTOS, J. C.; CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2135-41, 2004.

CASSANO, A.; DONATO, L.; DRIOLI, E. Ultrafiltration of kiwifruit juice: operation parameters, juice quality and membrane fouling. **Journal of food engineering**, v. 33, p. 99-106, 2006.

CHEETAM, P. S. J. Principles of Industrial Enzymology: Basis of utilization of soluble and immobilized enzymes in industrial processes. In: WISEMAN, A. **Handbook of Enzymes Biotechnology**. West Sussex: Ellis Horwood, 1985, p. 54-142.

CHENAULT, H. K.; WHITESIDES, G. M. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic-synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 14, p. 147-97, 1987.

CONAB – 3º levantamento da produção de cana-de-açúcar. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3lev-cana.pdf>, 2009. Acesso em 2009.

COPELAND, R.A. Kinetics of single-substrate enzyme reactions. In: **Enzymes**. 2nd Ed. Estados Unidos da América: Wiley-Vch, 2000. p.109-145.

CORNISH-BOWDEN, A. Introduction to enzyme kinetics. In: **FUNDAMENTALS of enzyme kinetics**. Cambridge: Portland Press, 1995. p. 19-51.

CORTEZ, E. V. **Extração líquido-líquido de xilose redutase e xilitol desidrogenase por micelas reversas**. 2002. 144 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CORTEZ, E. V.; PESSOA Jr., A.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 47-54, 2004.

CROGNALÉ, S.; PETRUCCIOLI, M.; FENICE, M.; FEDERICI, F. Fed-batch gluconic acid production from *Penicillium variable* P16 under different feeding strategies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 445-449, 2008.

CUNHA, M. A. A.; CONVERTI, A.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Yeast immobilization in lentikats®: a new strategy for xylitol bioproduction from sugarcane bagasse. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.65-72, 2006.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **CELULOSE e Papel – Tecnologia de Fabricação da pasta Celulósica**. São Paulo: SENAI/ IPT, 1988, v. 2, p. 45-106.

DAWSON, M.; DIXON, T.; INKERMAN, P. In: **Australian society of Sugar Cane Technologists**, 1990, p. 199.

DOMÍNGUEZ, J. M.; CHENG, S. G.; TSAO, G. T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolisate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 57/58, p. 49-56, 1996.

EGUCHI, S.Y.; NISHIO, N.; NAGAI, S. NADPH production from NADP⁺ by a formate-utilizing methanogenic bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2941-3, 1983

- FARIA, L. F. F.; PEREIRA JR. N.; NÓBREGA, R. Xylitol production from D-xylose in a membrane bioreactor. **Desalination**, v. 149, p. 231-6, 2002.
- FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; ROSA, S. A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 103-14, 1993.
- FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 18, p. 251-4, 1997.
- FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613 p.
- FERREIRA, A. S.; BARBOSA, N. R.; SILVA, S. S. In vivo xylitol primary dermal irritation and phototoxicity evaluation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 192-195, 2009.
- FROLLINI, E., PIMENTA, M. J. A. Lignin: Utilization as a macromonomer in the synthesis of phenolic type resins. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 46, p. 43-49, 1997.
- GLIEMMO, M. F.; CALVIN, A. M.; TAMASIB, O.; GERSCHENSONA, L. N.; CAMPOSA, C. A. Interactions between aspartame, glucose and xylitol in aqueous systems containing potassium sorbate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 611-9, 2008.
- GONÇALVES A. R.; ESPOSITO E.; BENAR P. Evaluation of *panus tigrinus* in the delignification of sugarcanebagasse by FTIR-PCA and pulp properties. **Journal of biotechnology**, v. 66, p. 177-85, 1998.
- GRILLAUD, M.; BANDON, D.; NANCY, J.; DELBOS Y.; VAYSSE F. Les polyols en odontologie pédiatrique : intérêt du xylitol. **Archives Pediatric**, v. 12, p. 1180-6, 2005.
- GRZEŚKOIWAK-PRZYWECKA, A., SŁOMIŃSKA, L. Saccharification of potato starch in a ultrafiltration reactor. **Journal of food engineering**, v. 33, p. 77-88, 2006.
- GURPILHARES, D. B. **Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Candida guilliermondii***. 2004. 155f. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Lorena, São Paulo, 2004.
- GURPILHARES D. B.; HASMANN, F. A.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39 p. 591-5, 2006.
- HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, v. 37, p. 267-74, 2003.

HONG U. S.; BRUENING, M. L. Separation of amino acid mixtures using multilayer polyelectrolyte nanofiltration membranes. **Journal of membrane science**, v. 280 p. 1-5, 2006.

HUANG, C. F.; LIN, T. H.; GUO, G. L.; HWANG, W. S. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource technology**, v. 100, No. 17, p. 3914-3920.

IQBAL, J.; KIM, H. J.; YANG, J. S.; BAEK, K.; YANG, J. W. Removal of arsenic from ground water by micellar-enhanced ultrafiltration (MEUF). **Chemosphere**, v. 77, p. 22-33, 2006.

ITOH, N.; MIZUGUCHI, N.; MABUCHI, M. Production of chiral alcohols by enantioselective reduction with NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase from *Corynebacterium* strain, ST-10. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 41-50, 1999.

IWATA, C.; NAKAGAKI, H.; MORITA, I.; SEKIYA, T.; GOSHIMA, M.; ABE, T.; ISOGAI, A.; HANAKI, M.; KUWAHARA, M.; TATEMATSU, M.; ROBINSON, C. Daily use of dentifrice with and without xylitol and fluoride: effect on glucose retention in humans in vivo. **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 389-95, 2003.

JAFFE, G. M.; SZKRYBALO, W.; WEINERT, P. H. US Patent. n. 3.784.408. 16 de setembro de 1970.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xilose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 27, p. 1-32, 1983.

KIM, M. D.; JEUN, Y. S.; KIM, S. G.; RYU, Y. W.; SEO J. H. Comparison of xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains harboring XYL1 gene of *Pichia stipitis* and GRE3 gene of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 862-6, 2002.

KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with the oxiredutase system of methanogen strain Hu. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 10, p. 651-6, 1984.

KRATZER, R.; KAVANAGH, K. L.; WILSON, D. K.; NIDETZKY, B. Studies of the Enzymic Mechanism of *Candida tenuis* Xylose Reductase (AKR 2B5): X-ray Structure and Catalytic Reaction Profile for the H113A Mutant. **Biochemistry**, v. 43, p. 4944-4954, 2004.

KROUTIL, W.; MANG, H.; EDEGGER, K.; FABER, K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 120-6, 2004.

KUHAD, K.C.; SING, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p. 151-172, 1993.

KULA, M. R. Enzyme Catalyzed Reductions of Carbonyl Groups. Proceedings of In: CHIRAL EUROPE, 1994, Stockport, UK. Proceedings **Spring Inovations Ltd.**, 1994, p. 27-33.

KUMAR, S.; SINGH S. P.; MISHRA I. M.; ADHIKARI D. K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp IPE453. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1483-1489, 2009.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 57-63, 2001.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xilose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367-380, 2002.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**. v. 56, p. 1-24, 1997.

LI, Y.; SHABAZI, A.; KADZERE, C. T. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. **Journal of food engineering**, v. 75, p. 574-580, 2006.

LI, Z.; YOURAVANG, W.; H-KITTIKUN, A. Separation proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. **Bioresource technology**, v. 97 p. 2364-2370, 2006.

LIMA, U. A, AQUARONE E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: BIOTECNOLOGIA industrial. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v.2, p. 277-329.

LOBO, A.; CAMBIELLA, A.; BENITO, J. M.; PAZOS, C.; COCA, J. Ultrafiltration of oil-in-water emulsion with ceramics membranes: Influence of pH and crossflow velocity. **Journal of membrane science**, v. 278, p. 328-334, 2006.

LOUWRIER, A. Review: Industrial products- the return to carbohydrate-based industries. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27, p. 1-8, 1998.

LOVEREN, C. Sugars alcohols: what is the evidence for caries-preventive effect and caries therapeutic effects?. **Caries Research**, v. 38, p. 286-93, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

MAGEE, R. J., KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 32, p. 60-63, 1985.

- MAIA, M. C. A., GALVÃO, A. P. G. L. K., MODESTA, R. C. D.; PEREIRA Jr., A. Avaliação do consumidor sobre sorvetes com xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 146-151, 2008.
- MÄKINEN, K. K. Xylitol: the sugar that prevents tooth decay. **The futurist**, p. 135-9, 1976.
- MÄKINEN, K. K., ISOKANGAS, D. D. S. Relationship between carbohydrate sweeteners and oral diseases. **Progress in Food and Nutrition Science**, v. 12, p. 73-109, 1988.
- MANS, V.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol – it's properties and use as a sugar substitute in foods. In: FOOD R. A. SYMP. SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS. London 1973, p. 21-38.
- MÄNTÄRRI, M.; VIITIKKO, K.; NYSTRÖM, M. Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry. **Journal of membrane science**, v. 272, p. 152-160, 2006.
- MARTINEZ, E. A.; VILLARREAL, M. L. M.; SILVA, J. B. A.; SOLENZAL, A. I. N.; CANILHA, L., MUSSATO, S. I, ROBERTO, I. C.. Use of different raw materials for biotechnological xylitol production. **Ciencia y_Tecnologia Alimentaria**, v. 3, n. 5, p. 295-301, 2002.
- MASSOTH, M. Xylitol gum for Streptococcus mutans reduction. **Dental Abstracts**, v. 51, p. 366-7, 2006.
- MATOS, G. S. **Adaptação e reciclagem de células de candida guilliermondii em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar: efeito sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase**. 2004. 107 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Lorena, São Paulo, 2004.
- MAYR, P.; NIDETZKY, B.; KLIMACEK, M. Transient-State and Steady-State Kinetic Studies of the Mechanism of NADH-Dependent Aldehyde Reduction catalyzed by Xylose Reductase from the Yeast *Candida tenuis*. **Biochemistry**, v. 40, p. 10371-10381, 2001.
- MERTENS, R.; GREINER, L.; van DEN BAN, E. C. D.; HAAKER, H. B. C. M.; LIESE, A. Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. **Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic**, v. 24-25, p. 39-52, 2003.
- MEYER, P.; PREEZ, J. C.; KILIAN, S. G. Isolation and evaluation of yeasts for biomass production from bagasse hemicellulose hydrolysate. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 161-5, 1992.
- MIERZWA, J. C., SILVA, M. C. C., RODRIGUES L. D. B., HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia sanitária ambiental**, v. 78, n. 1, p. 78-87, 2008.

MIKKOLA, J.-P.; SALMI, T.; VILLELA, A.; VAINIO, H.; MÄKI-ARVELA, P.; KALANTAR, A.; OLLONQVIST, T.; VÄYRYNEN, J.; SJÖHOLM, R. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n.3, p. 2003.

MOLWITZ, M.; SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; PRATA, A. M. R.; MANCILHA, I. M. Aspects of the cell growth of *Candida guilliermondii* in sugar cane bagasse hydrolisate. **Journal of Biosciences**, v. 51, p. 404-8, 1996.

MORITA, T. A. **Estudo da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: efeito do pH e da aeração**. 1998. 78 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Lorena, São Paulo, 1998.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MURTHY, G. S.; SRIHDAR, S.; SUNDER, M. S.; SHANKARAIHA, B.; RAMAKRISHNA, M. Concentration of xilose reaction liquor by nanofiltration for the production of xylitol sugar alcohol. **Separation and purification technology**, v. 44, p. 205-211, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 38, 401-13, 2002.

NABARLATZ, D.; TORRAS, C.; GARCIA-VALLS, R.; MONTANÉ, D. Purification of xilo-oligossacharides from almond shells by ultrafiltration. **Separation and purification technology**, v. 22, p.12-18, 2006.

NIDETZKY, B.; NEUHAUSER, W.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, n. 3, p. 387-96, 1996.

NYSS, A.; PIHLAJANIEMI, A.; PALVA, A.; WEYMARN, N.; LEISOLA M. Production of xylitol from d-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 55-66, 2005.

OJAMO, H.; YLINEN, L.; LINKO, M. Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivation *Candida guilliermondii*. Wo Patent. nº 88/05467. 8 de dezembro de 1987.

OSTERGAARD, S., OLSSON, L., NIELSON, J. Metabolic engineering of *Sacharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PANAGIOTOU, G.; CHRISTAKOPOULOS, P. NADPH-Dependent D-Aldose reductase and xylose fermentation in *Fusarium oxysporum*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 229-304, 2004.

- PANDEY, A.; SOCOOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technolog.**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191-201, 1998.
- PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food technology**, v. 42, p. 98-106, 1988.
- PESSOA Jr., A. **Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 1991 187f. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PETER H. W.; AHLERS J.; MOREIRA R. A. **Cinética enzimática**. Fortaleza: UFC, 1987, p. 236.
- PIRT, S. J. **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 124-9, 1997.
- PROCKNOR, C. Subprodutos; o bagaço. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 18, n. 4, p. 14, 2000.
- PURI, V. P.; PEARCE, G. R. Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymatic hidrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 480-5, 1986.
- RABELLO, T.; YONEYA F. Bagaço de cana, 'resíduo' cada vez mais lucrativo. **O Estado de São Paulo**, Disponível em <http://www.estadao.com.br/noticias/suplementos,bagaco-de-cana-residuo-cada-vez-mais-lucrativo,235392,0.htm>. Acesso em 2008.
- RAWAT, U. B.; RAO, M. B. Purification, kinetic characterization and involvement of tryptophan residue at the NADPH binding site of xylose reductase from *Neurospora crassa*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1293, p. 222-230, 1996.
- ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-6, 2003.
- RODRIGUES, D. C. G. A. **Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo alimentado**. 1997. 104 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Lorena, São Paulo, 1997.

RODRIGUES, S. L. C.; MOREIRA, R. L. S.; CARDOSO, M. H., MERÇONI F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 44-49 2003.

RONDA, M. G. F.; BLANCO, C. A.; CABALLERO P. A. Effects of polyols and nondigestible oligosaccharides on the quality of sugar-free sponge cakes. **Food Chemistry**, v. 90, p. 549-55, 2005.

ROSEIRO, J. C.; PEITO, M. A.; GÍRIO, F. M.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaromyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, v. 156, p. 484-90, 1991.

RUPPERT, R.; HERRMANN, S.; STECKHAN, E. Very efficient reduction of NAD(P)⁺ with formate catalyzed by cationic rhodium complexes. **Journal of The Chemical Society-Chemical Communications**, v. 17, p. 1150-1, 1988.

SAJJAN, U.; MOREIRA, J. A.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A Novel Model to Study Bacterial Adherence to the Transplanted Airway: Inhibition of *Burkholderia cepacia* Adherence to Human Airway by Dextran and Xylitol. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 23, p. 1382-91, 2004.

SAMPAIO, F. C.; FAVERI, D.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. L.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Use of response surface methodology for optimization of xylitol production by the new yeast strain *Debaryomyces hansenii* UFV-170. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 376–386, 2006.

SANTOS J.C., 2005. **Processo fermentativo de obtenção de xiltol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 2005. 159 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Lorena, São Paulo, 2005.

SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A. Bioenergetics of Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate in Fluidized Bed Reactor. Effect of the Aeration Rate. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1210-15, 2003.

SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATO, S. I.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 113-8, 2005.

SARROUH, B. F.; BRANCO, R. F.; SILVA, S. S. Production of Xylitol: Enhancement of Monosaccharide Biotechnological Production by Post-Hydrolysis of Dilute Acid Sugarcane Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 153-163, 2009.

SEELBACH, K.; RIEBEL, B.; HUMMEL, W.; KULA, M.R.; TISHKOV, V.I.; EGOROV, A.M.; WANDREY, C.; KRAGL, U. A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n.9, p. 1377-80, 1996.

SENE, L. Obtenção e cinética da xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2000 188f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SIGMA-ALDRICH – Custo da enzima glicose desidrogenase e formato desidrogenase. Disponível em http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/detail.do?lang=en&n4=g5909|sigma&n5=search_concat_pno|brand_key&f=spec e http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F8649|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC, respectivamente, 2010. Acesso em 2010.

SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; ARACAVA, K. K.; VITOLO, M. Use Of Fluidized Bed Reactor Operated In Semi-Continuous Mode For Xylose-To-Xylitol Conversion By *Candida guilliermondii* Immobilized On Porous Glass. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 903-7, 2003.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol, uma adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Aliments Nutrition**, v. 5, p. 109-17, 1993/1994.

SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysis by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63/64, p. 557-63, 1997.

SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; ARACAVA, K. K.; VITOLO, M. Use Of Fluidized Bed Reactor Operated In Semi-Continuous Mode For Xylose-To-Xylitol Conversion By *Candida guilliermondii* Immobilized On Porous Glass. **Process Biochemistry**, v. 38 , n. 6, p. 903-7, 2003.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A.; FELIPE, M. G. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, p. 88-95, 1996.

SMITH, L. D.; BUDGEN N.; BUNGARD S. J.; DANSON, M. J.; HOUGH, D.W. Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. **Biochemistry Journal**, v. 261, p. 973-977, 1989.

SPECTRUMLABS – Disponível em <http://www.spectrapor.com/filtration/Edge.html>. Acesso em 2009.

SUZUKI, T.; YOKOYAMA, S. I.; KINOSHITA, Y.; YAMADA, H.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAP, K. Expression of xyrA Gene Encoding for D-Xylose Reductase of *Candida tropicalis* and Production of Xylitol in *Escherichia coli*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 87, n. 3, p. 280-284, 1999.

TESSIER, L.; BOUCHARD, P.; RAHNI, M. Separation and purification of benzilpenicillin produced by fermentation using coupling ultrafiltration and nanofiltration technologies. **Journal of biotechnology**, v. 116, p. 79-89, 2005.

TSAO, G. T. Conversion of cellulose. In: ALANI, D. I., MOO-YOUNG, M. **Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology**, London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p. 203-22.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p. 144-7, 2001.

VIKBJERG, A. F.; JONSSON, G.; MU, H.; XU, X. Application of ultrafiltration membranes for purification of structured phospholipids produced by lipase-catalyzed acidolysis. **Separation and purification technology**, v. 50, p. 184-191, 2006.

WALLBERG, O., JÖNSSON, A. S. Separation of lignin in kraft liquor from a continuous digester by ultrafiltration at temperatures above 100°C. **Desalination**, v. 195, p. 187-200, 2006.

WILSON, D. K.; KAVANAGH, K. L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo/keto reductases and opportunities for protein engineering. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143/144, p. 515-21, 2003.

WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, p. 1-14, 1998.

WOODYER, R.; SIMURDIK, M.; VAN DER DONK, W. A.; ZHAO, H. Heterologous Expression, Purification, and Characterization of a Highly Active Xylose Reductase from *Neurospora crassa*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1642-1647, 2005.

XU, L.; WANG, S.; ZENG, X. The maltitol purification and concentration by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p. 295-303, 2005.

XU, L.; WANG, S. The Ginkgo biloba extracted concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p. 305-313, 2005.

YOKOYAMA, S. I.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Purification, Characterization and Structure Analysis of NADPH-Dependent D-Xylose

Reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 79, n. 3, p. 211-23, 1995.

ZHAO, J.; XIA L. M. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. **Fuel processing technology**, v. 90, n. 10, p. 1193-1197, 2009.