

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 Sílvio 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 Cobianchi 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, $1,68 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ 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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

