

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS - DPQ

**OBTENÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE DE *Candida mogii* E SUA
PURIFICAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS**

AUTORA: ZEA DUQUE VIEIRA LUNA MAYERHOFF

ORIENTADORA: PROF^a DR^a TELMA TEIXEIRA FRANCO

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a INÊS CONCEIÇÃO ROBERTO

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia
Química**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas - São Paulo

Abril – 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M4520
V EX
TOMBO BCI 49966
PROC 16.837/00
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00170470-0

BIB ID 246993

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M4536
M4520
Mayerhoff, Zea Duque Vieira Luna

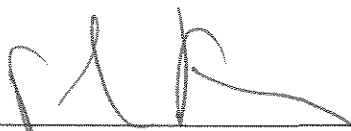
Obtenção da enzima xilose redutase de *Candida mogii* e sua purificação em sistemas de duas fases aquosas / Zea Duque Vieira Luna Mayerhoff. --Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Telma Teixeira Franco e Inês Conceição Roberto.

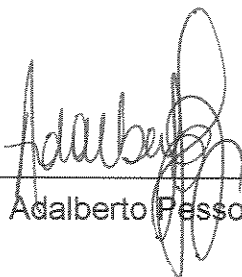
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Aldose redutase. 2. Xilitol. 3. Proteínas. 4. Fungos – Extração de proteínas I. Franco, Telma Teixeira. II. Roberto, Inês Conceição. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

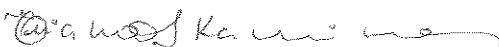
Tese de Doutorado defendida por Zea Duque Vieira Luna Mayerhoff e aprovada em 29 de abril de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



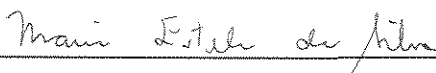
Profª Drª Telma Teixeira Franco – Orientadora



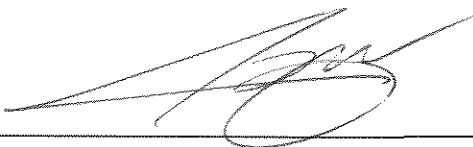
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior (Titular)



Profª Drª Eliana Setsuko Kamimura (Titular)

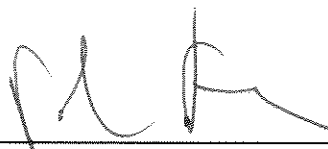


Profª Drª Maria Estela da Silva (Titular)



Prof. Dr. Martin Aznar (Titular)

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters, positioned above a horizontal line.

Orientadora

*À memória de meu pai e de meu irmão,
Albênzio,*

*À minha mãe e às minhas irmãs, Zeila e
Zelma*

*Ao meu marido, Alfredo, e aos meus
filhos, Ana Luísa, Eric e Ethel.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Telma Teixeira Franco, por suas diretrizes seguras e pela confiança em mim depositada.

À Prof^a Dr^a Inês Conceição Roberto, pela amizade e pela dedicação no papel de co-orientadora.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

À FAENQUIL, pela oportunidade de usufruir de suas instalações e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, pelo grande incentivo e pelo apoio na fase inicial do projeto.

À Prof^a Dr^a Adriane Milagres, por sua valiosa colaboração durante a execução do projeto.

A todos os funcionários da UNICAMP e da FAENQUIL que, direta ou indiretamente, colaboraram para o sucesso de meu trabalho, em especial ao Sr. Levy, à Maria Eunice, à Walquíria, ao Paulo Roberto, ao Djalma, ao Roberto, ao Nicamor e ao Sr. Dainese.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pelo incentivo constante.

A todos os amigos do LEB e do GPF, pelos bons momentos compartilhados.

À Prof^a Dr^a Eliana Kamimura, pela excelente convivência durante o período no qual trabalhamos em conjunto.

Aos grandes companheiros Rita de Cássia, Dr^a Lourdes Alves, Denise e Ely, pela amizade e pelo apoio em diversos momentos ao longo de todo o trabalho.

À minha família, que sempre me incentivou e me apoiou nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que, por ventura, eu tenha deixado de citar, mas que sabem que, de alguma forma, colaboraram para a realização de meu trabalho.

Arte é "eu";
Ciência é "nós".
(Claude Bernard)

RESUMO

A obtenção, extração e caracterização parcial da enzima xilose redutase (XR) presente no extrato celular da levedura *Candida mogii* NRRL Y-17032 cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foram estudadas neste trabalho. A concentração de hidrolisado no meio de cultivo para a produção da XR foi avaliada, e os maiores valores de produção e produtividade específica (35 U/g de célula e 0,97 U/[g de célula.h], respectivamente) foram obtidos em fermentações empregando meio contendo 49,2 g xilose/l. As condições para atividade ótima da XR *in vitro* foram estudadas e a máxima atividade volumétrica (0,54 U/ml) foi obtida empregando pH de 6,5 e 38 °C. No estudo da estabilidade, a atividade da XR permaneceu constante por 3 horas às temperaturas de 4 e 38 °C, e por 4 meses sob congelamento a -18 °C. Os parâmetros cinéticos determinados para a XR foram $V_{\max} = 0,485$ U/ml e $K_m = 63$ mM para a xilose e $V_{\max} = 0,390$ U/ml e $K_m = 0,032$ mM para o cofator NADPH. Para o rompimento celular de *C. mogii* por agitação com esferas de vidro, a maior atividade volumétrica (0,683 U/ml) foi encontrada empregando esferas de 300 µm de diâmetro, concentração celular de 45 g/l e 50 ciclos de agitação. No estudo para extração da XR em sistemas de duas fases aquosas, modelos matemáticos foram previstos para o fator de purificação e o percentual de recuperação (rendimento) na fase superior, e os valores máximos previstos por estes modelos foram 1,59 e 105,8, respectivamente.

Palavras-chave: enzima, purificação, xilose redutase, sistemas de duas fases aquosas, xilitol, *Cândida mogii*

ABSTRACT

The obtainment, extraction and partial characterization of the enzyme xylose reductase (XR) present in cell extract of the yeast *Candida mogii* NRRL Y-17032 cultivated in rice straw hemicellulosic hydrolysate were studied in this work. The XR production was evaluated by varying the concentration of hydrolysate in the growth medium, and the highest values of production and specific productivity (35 U/g of cell and 0.97 U/[g of cell.h], respectively) were obtained in fermentations employing medium containing 49.2 g xylose/l. The conditions for *in vitro* optimal XR activity were studied and the maximum volumetric activity (0.54 U/ml) was obtained employing pH 6.5 and 38 °C. In the study of the stability, XR activity remained constant for 3 hours at temperatures of 4 and 38 °C, and for 4 months at -18 °C. The kinetic parameters determined for XR were $V_{\max} = 0.485$ U/ml and $K_m = 63$ mM for xylose and $V_{\max} = 0.390$ U/ml and $K_m = 0.032$ mM for the cofactor NADPH. For the disruption of *C. mogii* cells by mechanical agitation with glass beads, the highest volumetric activity (0.683 U/ml) was found employing 300 μ m diameter beads, cell concentration of 45 g/l and 50 cycles of agitation. In the study for XR extraction in aqueous two-phase systems, mathematical models were predicted for the purification factor and percent recovery (yield) on top phase, and the maximum values predicted by these models were 1.59 and 105.8, respectively.

Key-words: enzyme, purification, xylose reductase, aqueous two-phase systems, xylitol, *Candida mogii*

ÍNDICE

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
ÍNDICE	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
NOMENCLATURA	xxvii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO DA LITERATURA	5
1. PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO	7
1.1. SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	8
1.1.1. Composição dos Sistemas de Duas Fases Aquosas	8
1.2. FATORES QUE INFLUENCIAM A PARTIÇÃO EM SDFA	11
1.3. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO EM DUAS FASES AQUOSAS	13
2. XILOSE REDUTASE	13
2.1. AÇÃO DA XILOSE REDUTASE	13
2.2. CARACTERIZAÇÃO DA XILOSE REDUTASE	14
2.2.1. Massa Molar	16
2.2.2. pH Ótimo e Ponto Isoelétrico	16
2.2.3. Temperatura Ótima.....	17
2.2.4. Estabilidade.....	17
2.3. PURIFICAÇÃO DA XILOSE REDUTASE	18
2.3.1. Rompimento Celular	18
2.3.2. Métodos Empregados para a Purificação da Xilose Redutase	19

3. XILITOL	20
3.1. OCORRÊNCIA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	20
3.2. OBTENÇÃO DO XILITOL	21
3.2.1. Matéria Prima: Resíduos Lignocelulósicos como Fonte de Xilose.....	22
3.2.2. Processos de Obtenção do Xilitol	22
3.2.2.1. Método Químico	22
3.2.2.2. Processo Microbiológico	23
3.2.2.3. Processo Enzimático	25
3.3. PALHA DE ARROZ.....	26
 CAPÍTULO 2. ACTIVITY OF XYLOSE REDUCTASE FROM <i>Candida mogii</i> GROWN IN MEDIA CONTAINING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF RICE STRAW HYDROLYSATE.....	 29
Abstract	31
Introduction	31
Material and Methods	32
<i>Preparation of Hemicellulose Hydrolysate</i>	<i>32</i>
<i>Microorganism and Preparation of Inoculum</i>	<i>32</i>
<i>Fermentation Conditions</i>	<i>33</i>
<i>Preparation of Cell-Free Extracts</i>	<i>33</i>
<i>Xylose Reductase Assay</i>	<i>33</i>
<i>Analytical Methods</i>	<i>33</i>
Results and Discussion	33
Acknowledgement	38
References	38
 CAPÍTULO 3. KINETIC PROPERTIES OF THE ENZYME XYLOSE REDUCTASE PRESENT IN <i>Candida mogii</i> CELL EXTRACT.....	 41
ABSTRACT	43
1. INTRODUCTION	44
2. MATERIAL AND METHODS	45
2.1. CHEMICALS	45

2.2. CULTIVATION OF THE MICROORGANISM.....	45
2.3. OBTAINMENT OF CELL-FREE EXTRACT	45
2.4. XR EXTRACTION	46
2.5. DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY	46
2.6. STUDY CONDITIONS	46
3. RESULTS AND DISCUSSION	47
3.1. OPTIMAL ACTIVITY	47
3.2. XR STABILITY AT STORAGE AND HANDLING TEMPERATURES	52
3.3. KINETIC PARAMETERS	53
4. CONCLUSIONS	59
Acknowledgements	59
References	59
CAPÍTULO 4. DEVELOPMENT OF THE CONDITIONS FOR XYLOSE REDUCTASE RELEASE BY <i>Candida mogii</i> CELL DISRUPTION.....	63
ABSTRACT	65
1. INTRODUCTION	66
2. MATERIAL AND METHODS	67
2.1. CULTIVATION OF THE MICROORGANISM	67
2.2. PREPARATION OF CELL SUSPENSION	67
2.3. DISRUPTION OF CELLS	67
2.4. DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY	69
2.5. EXPERIMENTAL DESIGN	69
3. RESULTS	69
4. CONCLUSION	74
Acknowledgements	75
References	75
CAPÍTULO 5. PURIFICATION OF XYLOSE REDUCTASE FROM <i>Candida mogii</i> IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS.....	77
ABSTRACT	79
1. INTRODUCTION	80

2. MATERIAL AND METHODS	81
2.1. CULTIVATION OF THE MICROORGANISM	81
2.2. OBTAINMENT OF CELL HOMOGENATE	81
2.3. OBTAINMENT OF CELL-FREE EXTRACT	81
2.4. PREPARATION OF AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS	82
2.5. DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY	82
2.6. ELECTROPHORESIS	82
2.7. DETERMINATION OF THE TIE-LINE LENGTHS	83
2.8. EXPERIMENTAL DESIGNS	83
2.9. DETERMINATION OF PARTITION COEFFICIENT, PURIFICATION FACTOR, YIELD AND SELECTIVITY	85
3. RESULTS	87
3.1. 2 ⁴ FACTORIAL DESIGN	87
3.2. 2 ² CENTRAL COMPOSITE DESIGN	91
4. CONCLUSIONS	98
Acknowledgements	98
References	98
 CAPÍTULO 6. ESTUDO PRELIMINAR DO USO DE CORANTES COMO LIGANTES BIOESPECÍFICOS NA EXTRAÇÃO DA XR EM SDFA.....	 103
1. INTRODUÇÃO.....	105
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1. COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS	106
2.2. LIGAÇÃO DO CORANTE DRIMAREN AO PEG.....	106
3. RESULTADOS.....	107
4. CONCLUSÕES.....	113
CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
ANEXO A	A-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Curva binodal e linha de amarração de um sistema de duas fases aquosas composto por dois polímeros	10
Figura 1.2.	Metabolismo de D-xilose em leveduras (WINKELHAUSEN e KUSMANOVA, 1998)	15
Figura 1.3.	Esquema de obtenção do xilitol por via química e biotecnológica	24
Fig.1.	Effect of hydrolysate concentration expressed as initial xylose content on maximum cell growth rates of the yeast <i>C. mogii</i>	34
Fig.2.	Highest values of specific production for xylitol (—●—) and XR (—▲—) in fermentations with different hemicellulose hydrolysate concentration expressed as initial xylose content	36
Fig.3.	Specific production of xylitol (—●—) and XR (—▲—) along fermentation time with hydrolysate concentrations equivalent to (A) 29.2, (B) 38.6 , (C) 49.3, (D) 69.8 and (E) 88.3 g/L	37
Fig.4.	Highest values of specific productivity for xylitol (—●—) and XR (—▲—) in fermentations with different hemicellulose hydrolysate concentrations expressed as initial xylose content	38
Figure 3.1.	Response surface plot for the optimal activity of NADPH-dependent XR obtained by the experimental design	50
Figure 3.2.	Response surface plot for the optimal activity of XD obtained by the experimental design	51
Figure 3.3.	Overlay plot of the response surfaces for XR and XD activities as function of pH and temperature	52

Figure 3.4. Percentages of XR activity in extracts maintained at 4 °C (—●—) and 38 °C (—■—) as a function of time. Initial activity was taken as 100 %	53
Figure 3.5. Effect of xylose (A) and NADPH (B) concentrations on XR activity expressed as initial rate of NADP formation	54
Figure 3.6 Lineweaver-Burk double reciprocal plots for XR with xylose (A) and NADPH (B)	55
Figure 3.7. Effect of xylose concentration on XR activity (A) and Lineweaver-Burk plot (B) of the top phase of an ATPS used for XR extraction	57
Figura 3.8. Effect of NADPH concentrations on the initial rate of NADP formation in the presence of different concentrations of the dyes Drimaren (A) and Cibacron (B): 0.01 g/l (▲); 0.0025 g/l (●); or without dye (■)	57
Figure 3.9. Lineweaver-Burk plots for the initial rates of NADP formation with NADPH in the presence of different concentration of the dyes Drimaren (A) and Cibacron (B): 0,01 g/l (▲); 0,0025 g/l (●); or without dye (■)	58
Figure 4.1. Schematic drawing of the reactor used for cell disruption with glass beads	68
Figure 4.2. Pareto chart for the study of <i>Candida mogii</i> cell disruption	71
Figure 4.3. Effect of number of cycles on <i>Candida mogii</i> cell disruption with glass beads; (A) XR volumetric activity; (B) XR specific activity	72
Figure 5.1. Phase diagram of systems composed of Na/K phosphate buffer and PEG 600 (A), PEG 1000 (B) and PEG 1500 (C) at room temperature and pH 6.5. Tie-lines with lengths of 24, 29 and 34 are shown	84
Figure 5.2. Pareto chart for the effects of the variables MMPEG (A), PEG concentration (B), phosphate concentration (C) and NaCl concentration (D) on the purification factor in top phase	89

Figure 5.3. Response surface plot of experimental design no. 1 for the purification factor in the top phase	90
Figure 5.4. Response surface plot of experimental design no. 2 for the optimization of the purification factor in the top phase	93
Figure 5.5. Response surface plot of experimental design no. 2 for the optimization of the XR yield in the top phase	94
Figure 5.6. Overlay plot of the response surfaces for PF_T and Y_T in design no. 2 .	96
Figure 5.7. SDS-PAGE electrophoresis of purification step in ATPS. Column (A) cell extract; (B) top phase of system 12; (C) bottom phase of system 12; and (D) molecular markers	97
Figura 6.1. Partição do corante Drimaren Vm BR A4-G sob a forma livre em sistemas de duas fases aquosas compostos por polímeros de diferentes massas molares e fosfato de sódio/potássio	108
Figura 6.2. Efeito da concentração dos corantes Drimaren Vm BR A4-G (■) e Cibacron Blue F3-G (◆) sobre a atividade da XR de <i>Candida mogii</i> ..	109
Figura 6.3. Variação da velocidade de reação da XR em função do NADPH em presença de diferentes concentrações dos corantes Drimaren (A) e Cibacron (B): sem corante (■); 0,0025 g/l (●); 0,01 g/l (▲)	111
Figura 6.4. Gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk para a variação da velocidade de reação da XR em função do NADPH em presença de diferentes concentrações dos corantes Drimaren (A) e Cibacron (B): sem corante (■); 0,0025 g/l (●); 0,01 g/l (▲)	111

LISTA DE TABELAS

Table 1.	Partial composition of fermentation media with hydrolysate concentrations equivalent to xylose contents of 29 g/L (A), 39 g/L (B), 49 g/L (C), 70 g/L (D) e 88 g/L (E)	34
Table 2.	Fermentative and enzymatic parameters determined along the fermentation time with initial rice straw hydrolysate contents equivalent to xylose concentrations of 29 g/L(A), 39 g/L(B), 49 g/L(C), 70 g/L(D) and 88 g/L(E)	35
Table 3.1.	Experimental design for the study of the optimal activities of XR and XD	48
Table 3.2.	ANOVA for the model predicted for XR activity by the experimental design employing three levels of temperature and four levels of pH....	49
Table 3.3.	ANOVA for the model predicted for XD activity by the experimental design	50
Table 3.4.	Characterization of the cell extract and the top and bottom phases of the ATPS used for XR extraction	54
Table 3.5.	kinetic parameters for the enzyme XR from different yeast strains	56
Table 3.6.	Variation in the $V_{\max}$ of XR with different concentrations of the inhibitors Drimaren and Cibacron	58
Table 4.1.	2^3 factorial design of the study of <i>C. mogii</i> cell disruption for XR release	70
Table 4.2.	XR activity in <i>Candida mogii</i> cell extracts obtained by employing different disruption processes	73
Table 5.1.	Total composition of the aqueous two-phase systems used in the central composite design for XR extraction in ATPS	84

Table 5.2.	2^4 Factorial design for the extraction of xylose reductase in ATPS (design no. 1)	85
Table 5.3.	2^2 Central composite design for XR extraction by partitioning in ATPS (design no. 2)	86
Table 5.4.	Composition of the ATPS studied and purification factor (PF) and partition coefficient (k) of xylose reductase	88
Table 5.5.	Anova for the effects of variables on PF_T in xylose reductase extraction by partitioning in aqueous two-phase systems	90
Table 5.6.	Parameters of the extraction of the enzyme XR in ATPS (design no. 2)	91
Table 5.7.	ANOVA for the quadratic models predicted for the purification factor and XR yield in design no. 2	95
Tabela 6.1.	Resultados da extração da XR de <i>Candida mogii</i> em SDFA, empregando o corante Drimaren Vm BR A4-G como ligante	108
Tabela 6.2.	Variação da $V_{m\acute{a}x}$ de XR com diferentes concentrações dos corantes Drimaren e Cibacron	113

NOMENCLATURA

- F_I – concentração de fosfato na fase inferior (% p/p)
 F_S – concentração de fosfato na fase superior (% p/p)
 K – coeficiente de partição/partition coefficient
 K_m – constante de Michaelis-Menten (mM)
 $\varnothing$ – diameter (μm)
 P_B – concentration of PEG in the top phase (% w/w)
 PF_B – purification factor in the bottom phase
 PF_T – purification factor in the top phase
 P_I – concentração de PEG na fase inferior (% p/p)
 pI – ponto isoeletrico
 P_S – concentração de PEG na fase superior (% p/p)
 P_T – concentration of PEG in the top phase (% w/w)
 P_{XR} – specific XR production (U XR/g cell)
 P_{xtol} – specific xylitol production (g xylitol/g cell)
 q_{P1} – specific xylitol productivity (g xylitol/g cell.h)
 q_{P2} – specific XR productivity (U XR/g cell.h)
 S – selectivity
 S_B – concentration of salt in the bottom phase (% w/w)
 S_T – concentration of salt in the top phase (% w/w)
 v_{vm} – volume of air per volume of medium per minute
 V_{max} – velocidade máxima de reação (U/mL)
 Y_B – yield in the bottom phase (%)
 $Y_{P/S}$ – xylitol yield (g xylose/g xylose used)
 Y_T – yield in the top phase (%)
 $Y_{X/S}$ – cell yield (g cell/g xylose used)

INTRODUÇÃO

A xilose redutase (XR) é uma enzima-chave no metabolismo de xilose em muitos microrganismos. A xilose é uma pentose presente em grandes proporções nos resíduos vegetais. Estes resíduos são acumulados em grande quantidade em todo o mundo, em função das atividades das indústrias de exploração agrícola e florestal.

Tendo em vista a preocupação crescente da sociedade com a questão da redução dos recursos naturais do planeta, decorrente da sua exploração não racional, foi criado e vem sendo amplamente aceito e difundido o conceito do “desenvolvimento sustentável”. Por definição, o desenvolvimento sustentável “é aquele que atende às necessidades dos presentes sem comprometer a possibilidade de as gerações futuras satisfazerem suas próprias necessidades”.

Vários segmentos da comunidade mundial têm se mobilizado, propondo e implementando medidas para adaptar as atividades do homem a esse novo conceito. Dentre diretrizes para se alcançar um efetivo desenvolvimento sustentável propostas pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, destaca-se a “diminuição do consumo de energia e o desenvolvimento de tecnologias que admitem o uso de fontes energéticas renováveis e o aumento da produção industrial nos países não-industrializados à base de tecnologias ecologicamente adaptadas”. Nesse sentido, a comunidade científica vem trabalhando continuamente, contando com o apoio político e financeiro da sociedade, que reconhece a importância deste esforço.

Nesse contexto, inserem-se os estudos para o aproveitamento dos resíduos da biomassa vegetal, gerados em grande quantidade principalmente nos países em desenvolvimento, onde a exploração agrícola e florestal constitui a sua maior fonte de riqueza. Desta forma, uma ampla gama de trabalhos visando o aproveitamento sistemático das várias frações destes resíduos encontram-se em curso.

Estes estudos estão basicamente concentrados no uso de processos alternativos, que minimizem o gasto energético e a geração de resíduos para a conversão desta biomassa. O emprego de processos biotecnológicos de modificação destas matérias-primas (conversão microbiológica e enzimática) constituem o objeto de estudos de grande parte dos grupos de pesquisa no Brasil e em muitos outros países.

O presente trabalho está inserido em uma linha de pesquisa que visa o aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica de resíduos da agroindústria por via biotecnológica, e foi realizado através de uma cooperação entre a Universidade Estadual de Campinas e a Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção, a purificação e a caracterização parcial da enzima xilose redutase presente na levedura *Candida mogii*, que foi selecionada, em estudo anterior, como um microrganismo promissor para a produção de xilitol a partir da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. O estudo da atividade desta enzima pode ser de grande importância tanto no conhecimento das vias metabólicas de obtenção de xilitol por via microbiológica quanto no estabelecimento de condições para a obtenção deste produto por conversão enzimática.

O processo de purificação por partição em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) foi escolhido para ser estudado por tratar-se de uma tecnologia que apresenta grandes vantagens econômicas e de processo, podendo ser utilizada em escala industrial para a obtenção de várias biomoléculas de interesse econômico.

Constituíram etapas deste trabalho:

- Investigar o efeito da concentração de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz no meio de cultivo sobre a produção da XR *Candida mogii*.
- Determinar as propriedades da XR, tais como pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade, especificidade para o cofator, entre outras, a fim de estabelecer as condições ideais para seu manuseio e utilização.
- Determinar método para o rompimento celular da levedura para a liberação da XR para o meio extracelular.

- Estudar a extração da XR em SDFA, utilizando a metodologia de planejamento experimental no estudo dos parâmetros massa molar do polímero polietilenoglicol (PEG), concentração do PEG, concentração do tampão fosfato e concentração de NaCl.
- Realizar estudo cinético para determinação dos parâmetros K_m e V_m da XR obtida antes e após sua purificação.

O presente trabalho encontra-se dividido em capítulos nos quais estão apresentadas as diferentes etapas desenvolvidas, além de uma revisão da literatura e uma conclusão geral. Os capítulos estão redigidos sob a forma de artigos, no idioma inglês, e são precedidos por uma apresentação de seu conteúdo. Destes artigos, alguns já foram publicados, enquanto outros serão ainda submetidos para publicação em periódicos especializados. Informações complementares aos artigos estão inseridas sob a forma de anexos.

CAPÍTULO 1

Este capítulo apresenta uma revisão da literatura relacionada ao assunto da tese. O capítulo encontra-se dividido em tópicos, nos quais são abordados os aspectos mais relevantes já investigados, que fornecem subsídios para a realização do presente trabalho.

1. PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

As enzimas são catalisadores biológicos que permitem que as reações químicas do metabolismo celular ocorram a uma velocidade significativa, em condições ambientais extremamente suaves, compatíveis com a manutenção da viabilidade celular. As enzimas são catalisadores ideais, dada a sua elevada especificidade, alta eficiência na conversão substrato-produto e elevada atividade em condições ambientais moderadas, o que lhes abre uma ampla gama de possibilidades de aplicação (ILLANES, 1994). Segundo este autor, dada a inerente labilidade das enzimas, como consequência de sua estrutura protéica, o uso eficiente dessas moléculas, separadas do sistema celular onde se originam, é o objetivo da biotecnologia de enzimas. De acordo com KILIKIAN *et al* (2000), devido ao rápido avanço da biologia molecular e da genética, proteínas e peptídeos são áreas de grande interesse, e o isolamento e a purificação dessas moléculas é um requisito natural e lógico para permitir a sua utilização.

As características dos sistemas biotecnológicos fazem a purificação ser a parte mais cara do processo de produção de biomateriais (BIM e FRANCO, 2000). Segundo SILVA e FRANCO (2000), análises econômicas mostram que as etapas de separação e purificação constituem um aspecto muito importante na produção e no processamento de biomoléculas, particularmente no caso de proteínas que, devido à complexidade do material inicial, requerem muitas etapas para alcançar níveis de pureza exigidos para aplicação clínica e alimentícia. De acordo com DIAMOND e HSU (1992), 50-90 % do custo de obtenção de produtos biológicos são oriundos dos processos de purificação, devido à sua complexidade e à necessidade de preservação da atividade do produto biológico. Segundo KILIKIAN *et al* (2000), na biotecnologia, existe uma necessidade de novos processos de purificação e concentração de compostos biologicamente ativos, que combinem alta seletividade e biocompatibilidade com uma facilidade de ampliação de escala. A tarefa dos especialistas em separação é desenvolver processos simples e

seguros para a obtenção de produtos com um alto grau de pureza (SILVA e FRANCO, 2000).

1.1. SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

A extração líquido-líquido consiste na transferência de certos compostos de uma fase para outra, quando fases líquidas imiscíveis ou parcialmente solúveis são colocadas em contato (KILIKIAN *et al.*, 2000). Entre os processos de extração líquido-líquido atualmente estudados para a separação e purificação de substâncias de origem biológica, especial ênfase tem sido dada à partição em sistemas de duas fases aquosas (SDFA), por ser um método eficiente, versátil e de baixo custo (BERGGREN *et al.*, 1995; OTTO *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1996). O uso de sistemas de duas fases aquosas para a separação de biomoléculas vem ganhando importância na biotecnologia (SALAMANCA *et al.*, 1998). Quando comparados com outras técnicas de separação e de purificação, a separação em SDFA apresenta diversas vantagens, como facilidade de ampliação de escala, habilidade de separar materiais particulados, operação rápida e contínua, altos rendimentos, baixo custo dos materiais, reciclagem dos polímeros e minimização da desnaturação das proteínas (LAMARCA *et al.*, 1990; CASCONI *et al.*, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1994).

1.1.1. Composição dos Sistemas de Duas Fases Aquosas

Estes sistemas são constituídos por duas fases aquosas parcialmente miscíveis, obtidas pela adição de dois polímeros solúveis em água ou por um polímero e um sal. A tendência de dois diferentes polímeros se separarem em duas fases distintas em um mesmo solvente é conhecida desde o final do século XIX, e isto tem mostrado ser regra geral para a maioria dos sistemas aquosos compostos por dois polímeros (SILVA e FRANCO, 2000). Segundo estes autores, o polietilenoglicol (PEG) é um dos polímeros mais utilizados em SDFA, e os sistemas compostos por PEG/dextrana são os sistemas

mais bem estudados para a partição líquido-líquido de proteínas. De acordo com ALBERTSSON (1986), os sistemas compostos por PEG/dextrana ou PEG/fosfato contêm de 80 a 95% (p/p) de água, que combinado com a baixa tensão interfacial do sistema, permite a partição não destrutiva de biomateriais sensíveis, tais como proteínas, organelas celulares e células viáveis inteiras.

Dados da composição e das propriedades das fases dos sistemas são necessários para projetar processos de extração por SDFA. As composições das fases e as concentrações das misturas polímero/polímero ou polímero/sal, necessárias para que ocorra a separação das fases, podem ser representadas em um diagrama de fases, onde um dos eixos representa a composição em massa da substância que predomina na fase superior do sistema e o outro representa a composição, em massa, da substância que predomina na fase inferior. A curva que separa a região de fases é denominada curva binodal ou curva de equilíbrio, sendo que as composições de meios representadas por pontos acima da curva indicam a formação de duas fases (região bifásica), enquanto que pontos abaixo da curva (região monofásica), representam uma solução homogênea (CABRAL e AIRES-BARROS, 1993). A formação de duas fases aquosas depende, portanto, da concentração dos componentes do sistema (ALBERTSSON, 1986). De acordo com KAUL (2000), o diagrama de fases delinea uma área de trabalho potencial para um sistema de duas fases particular, e é uma "impressão digital" única àquele sistema, sob condições determinadas, como, por exemplo, pH, temperatura e concentração de sal.

Inicialmente, a composição do sistema é dada pelo ponto M (Figura 1.1). No equilíbrio, é dada pelos pontos T (fase superior) e B (fase inferior). O segmento de reta TMB é chamado de linha de amarração (*tie line*). Todos os sistemas que se encontram na linha de amarração possuem composições químicas idênticas, tanto da fase superior, quanto da fase inferior, porém, diferem quanto aos volumes de cada fase, em função da composição inicial (KULA *et al.*, 1982; BAMBERGER *et al.*, 1985; HUDDLESTON *et al.*, 1991 e 1994). Encontra-se também presente na curva binodal um chamado "ponto crítico". Neste ponto, as composições e os volumes das fases superior e inferior são iguais, sendo que sistemas de composição próxima ao ponto crítico são

instáveis e devem ser evitadas, pois, pequenas diluições poderão levá-lo à região monofásica (KULA *et al.*, 1982; HUDDLESTON *et al.*, 1991).

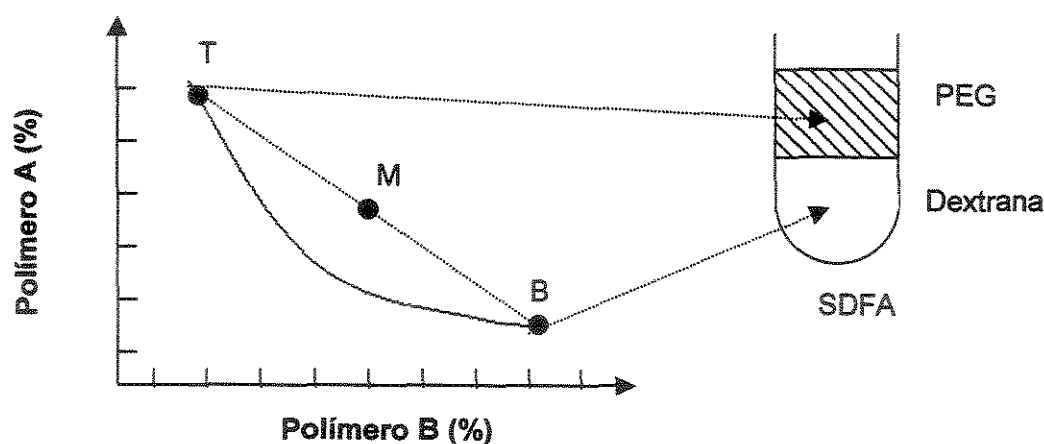


Figura 1.1 – Curva binodal e linha de amarração de um sistema de duas fases aquosas composto por dois polímeros

Novos tipos de sistemas de duas fases aquosas estão sendo desenvolvidos, nos quais um polímero termosseparável funciona como um componente formador de fase (JOHANSSON *et al.*, 1998). De acordo com PERSSON *et al.*, (1999), um polímero termosseparável, é um polímero que, quando em solução aquosa, acima de uma determinada temperatura (*cloud point*), forma um sistema bifásico, no qual a fase superior é quase totalmente isenta do copolímero, e a fase inferior é rica em copolímero. Copolímeros de óxidos de etileno e óxidos de propileno (EOPO) termosseparáveis têm sido usados como polímeros formadores da fase superior, ao invés de PEG, em sistemas com dextrana ou um derivado de amido como polímero da fase inferior. Nestes sistemas, a proteína-alvo é primeiramente particionada para a fase rica em EOPO; esta fase é, em seguida, isolada, e a sua temperatura elevada acima do *cloud point*, o que leva à formação de uma fase rica em polímero e uma fase de água/tampão, para a qual a proteína se particiona (HARRIS *et al.*, 1991; ALRED *et al.*, 1994; PERSSON *et al.*, 1998). Estes sistemas possibilitam a recuperação e a reciclagem do polímero termosseparável, o que significa que o custo da extração em

duas fases aquosas em um processo biotecnológico pode ser significativamente reduzido (PERSON *et al.*, 1999). Estes autores relataram um novo sistema de duas fases aquosas, no qual os dois polímeros formadores de fases são termosseparáveis. Estes sistemas são compostos por EOPO e por HM-EOPO, um polímero de óxido de etileno e óxido de propileno com grupos alifáticos $C_{14}H_{29}$ acoplados. Os sistemas água/HM-EOPO podem ser usados particularmente para a extração de proteínas mais hidrofóbicas.

1.2. FATORES QUE INFLUENCIAM A PARTIÇÃO EM SDFA

A distribuição das moléculas de substâncias solúveis (ex.: enzimas e proteínas) entre as duas fases líquidas do SDFA é representada pelo coeficiente de partição (K). O coeficiente de partição é expresso pela relação entre a concentração de moléculas da proteína P na fase superior e na fase inferior:

$$K = \frac{[P]_{superior}}{[P]_{inferior}}$$

O coeficiente de partição em sistemas de duas fases aquosas pode ser expresso em função das propriedades moleculares das proteínas (hidrofobicidade, forças eletrostáticas, massa molar, conformação da molécula e bioespecificidade), divididas em vários fatores:

$$\text{Log } K = \text{Log } K_{hidrof} + \text{Log } K_{elet} + \text{Log } K_{MM} + \text{Log } K_{conf} + \text{Log } K_{bioespec}$$

Entretanto, estas propriedades não devem ser consideradas necessariamente igualmente importantes; sua importância depende do tipo de sistema usado, bem como da proteína-alvo (SCHMIDT *et al.*, 1994).

Vários estudos vêm sendo conduzidos, visando explorar as propriedades das proteínas para otimizar a sua partição em SDFA. FRANCO *et al.* (1996b) estabeleceram um método para o estudo do efeito da hidrofobicidade superficial das proteínas sobre a partição em SDFA. A adição de ligantes bioespecíficos aos sistemas de duas fases vem sendo empregada para aumentar a partição de proteínas em SDFA pelo princípio do bioreconhecimento (KOPPERSCHLÄGER e KIRCHBERGER, 2000; SILVA e FRANCO, 2000).

As propriedades dos sistemas líquidos de duas fases aquosas podem ser moduladas através da manipulação das seguintes variáveis: massa molar e concentração do polímero (ou sais), alterações de pH e força iônica, adição de outras moléculas ou pela introdução de ligantes específicos de afinidade nos componentes de uma das fases (KULA *et al.*, 1982). De acordo com MENGE (2000), a extração de proteínas em SDFA é um dos métodos de purificação mais rápidos disponíveis, além de ser muito útil para a separação de resíduos celulares. Entretanto, para cada problema de separação, a composição das fases dos sistemas deve ser otimizada separadamente para alcançar a purificação ótima individual e a recuperação de uma proteína desejada. Segundo este autor, entre os fatores que controlam a partição entre as fases estão: o componente da fase superior, predominantemente PEG; o componente da fase inferior, predominantemente dextrana ou fosfato; as concentrações destes componentes de fase ou o comprimento da linha de amarração correspondente; o pH; aditivos (sais, compostos orgânicos), entre outros.

Os efeitos da massa molar, concentração, densidade das fases, presença de outros sais foram detalhadamente investigados em sistemas formados por PEG-dextrana (ALBERTSSON, 1971, 1986; JOHANSSON, 1985; ASENJO *et al.*, 1990; FRANCO *et al.*, 1990, 1996a e b; FRANCO, 1992).

1.3. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Em indústrias biotecnológicas, os processos de extração líquido-líquido são amplamente empregados para a recuperação de bioprodutos (FAIR, 1989). Os sistemas de duas fases aquosas podem ser usados para particionar seletivamente e purificar “proteínas-alvo” de sobrenadantes de um caldo fermentado ou de um extrato celular (JOHANSSON *et al.*, 1998). A técnica de separação em SDFA é utilizada principalmente para o enriquecimento da proteína desejada em uma das fases ou para concentração dos resíduos celulares nas primeiras etapas do processo. Os contaminantes mais comuns (pigmentos, ácidos nucleicos, outras proteínas, polissacarídeos) podem ser removidos por partição na fase oposta à fase enriquecida na proteína-alvo (ANDREWS e ASENJO, 1989; KULA, 1990).

Os sistemas de duas fases aquosas têm sido amplamente utilizados em pesquisas bioquímicas para a separação e purificação de macromoléculas, células e partículas celulares (FRANCO *et al.*, 1996a; PIZA *et al.*, 1999, OLIVEIRA *et al.*, 2001). Os SDFA têm também encontrado aplicação em várias áreas da biotecnologia, sendo usados para purificação de enzimas em larga escala, purificação de interferon, aplicações analíticas e bioconversões extrativas (TJERNELD *et al.*, 1986). SCHMIDT *et al.* (1994) afirmam que a técnica de SDFA é potencialmente atrativa para a separação de enzimas industriais, tanto extracelulares quanto intracelulares.

2. XILOSE REDUTASE

2.1. AÇÃO DA XILOSE REDUTASE

A xilose redutase (XR) é a enzima responsável pela primeira etapa no metabolismo de xilose por leveduras (CHIANG, KNIGHT, 1960). A utilização da xilose

na via das fosfopentoses é precedida por duas reações sequenciais nas quais esta pentose é primeiramente reduzida a xilitol, que, em uma segunda etapa, é convertido em xilulose. A oxidação do xilitol a xilulose é catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XD) (Figura 1.2).

A xilose redutase pode utilizar apenas NADPH, ou utilizar, conjuntamente, NADPH e NADH como cofatores, enquanto a xilitol desidrogenase utiliza, como cofator, NAD^+ (JEFFRIES, 1983). Da ação de redução de uma molécula de xilose pela XR resulta a oxidação de uma molécula de cofator. Da mesma forma, a oxidação do xilitol requer a simultânea redução do cofator utilizado pela xilitol desidrogenase. A utilização exclusiva de NADPH como cofator pela xilose redutase é freqüentemente relacionada com a incapacidade de assimilação da xilose por algumas leveduras em ausência total de oxigênio (BRUINENBERG *et al.*, 1984). Em presença de oxigênio, o NADH gerado na oxidação do xilitol é regenerado na cadeia respiratória. Em anaerobiose, apenas leveduras que utilizam NADH como cofator para a xilose redutase são capazes de gerar cofator oxidado para a reação subsequente.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DA XILOSE REDUTASE

Estudos para a caracterização da XR produzida por diversos microrganismos fermentadores de xilose são encontrados na literatura (KUHN *et al.*, 1995; ROSA *et al.*, 1998). Em alguns casos, foi relatada a presença de mais de uma XR em um mesmo microrganismo. A massa molar, o ponto isoelétrico, as condições ótimas de pH e temperatura, a estabilidade térmica e a estabilidade em diferentes valores de pH foram determinados para a maioria das enzimas estudadas.

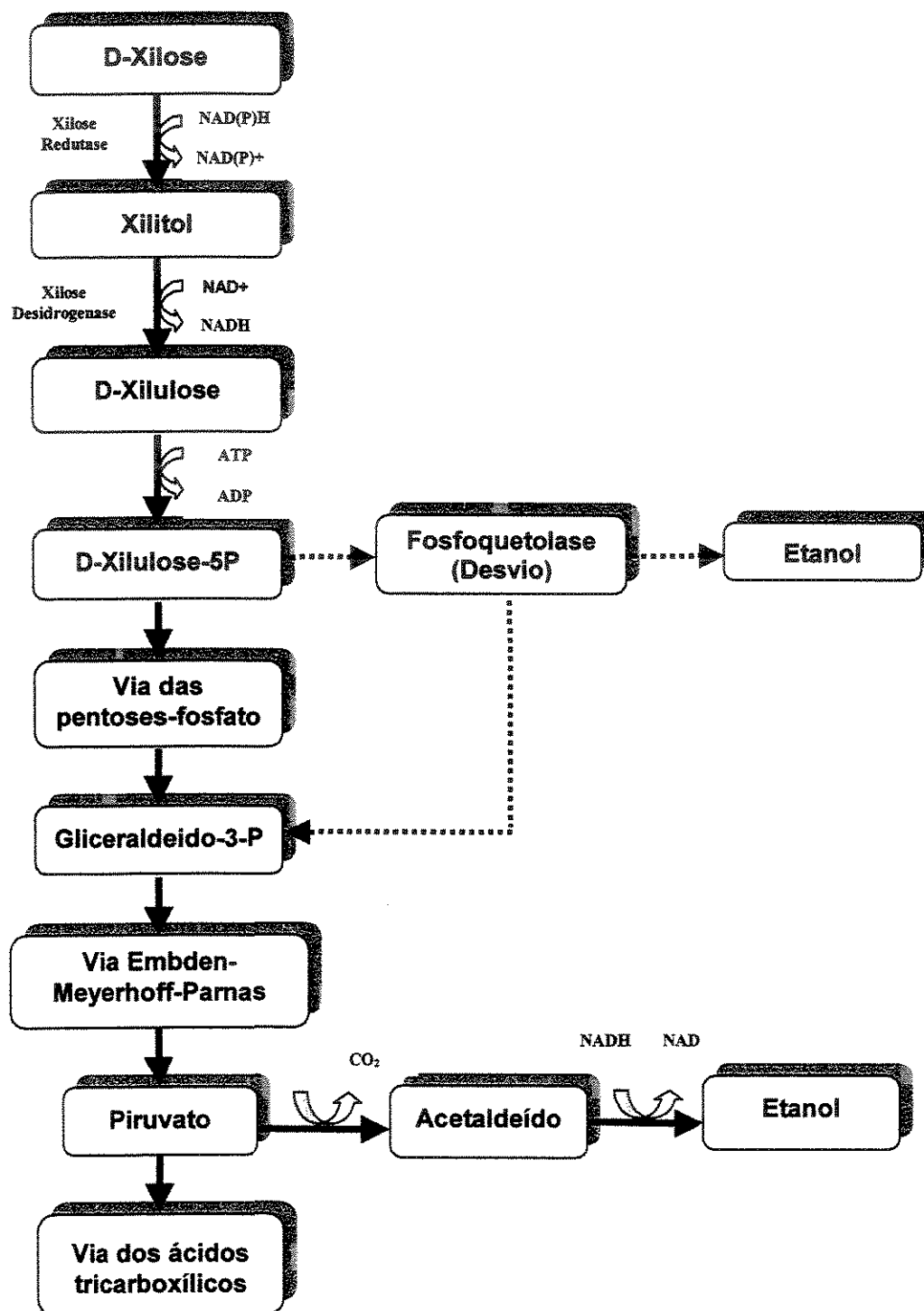


Figura 1.2 – Metabolismo de D-xilose em leveduras (WINKELHAUSEN e KUSMANOVA, 1998)

2.2.1. Massa Molar

Na maioria dos estudos realizados, a massa molar encontrada para a enzima XR foi de 32–38 kDa, tendo sido relatada a presença de apenas uma subunidade na estrutura das enzimas produzidas por *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae* (BOLEN *et al.*, 1986; DIETZELMULLER *et al.*, 1984; HO *et al.*, 1990). Entretanto, VERDUYN *et al.* (1985), utilizando diferentes técnicas para a determinação da massa molar da XR de *Pichia stipitis*, encontrou os valores 34, 63 e 65 kDa. Segundo esse autor, esta enzima é provavelmente composta por duas subunidades idênticas. Resultados similares foram obtidos por RIZZI *et al.* (1989) para a XR de uma outra linhagem de *Pichia stipitis* e por YOKOYAMA *et al.* (1995) para uma linhagem de *Candida tropicalis*. BOLEN *et al.* (1986) encontraram valores entre 36,5 e 59 kDa, empregando diferentes técnicas para a determinação da massa molar de XR de *Pachysolen tannophilus*. Porém, este autor não relacionou estas diferenças encontradas com a presença de mais de uma subunidade na molécula da XR. Outros trabalhos realizados empregando a levedura *Pachysolen tannophilus* também indicaram a presença de apenas uma subunidade na molécula de XR (DITZELMULLER *et al.*, 1984; MORIMOTO *et al.*, 1987). A massa molar encontrada para a XR de *Candida guilliermondii* foi de 36 kDa (HANDUMHONGKUL e SILVA, 1998).

2.2.2. pH Ótimo e Ponto Isoelétrico

O pH ótimo para a atividade enzimática da xilose redutase na redução de xilose a xilitol variou entre 5,0 e 7,5. O pH ótimo de 7,0 foi determinado por DITZELMÜLLER *et al.* (1984) para a XR de *Pachysolen tannophilus*, enquanto MORIMOTO *et al.* (1987) encontraram valores ótimos entre 5,0 e 6,0, para o mesmo microrganismo. KISE *et al.* (1988) encontraram diferentes valores de pH ótimo para a XR de *Cryptococcus lactativorus* em função do cofator empregado. O pH ótimo da XR de *C. lactativorus* foi de 5,8, quando empregando o cofator NADH, e de 6,9 quando utilizando NADPH como cofator. KUHN *et al.* (1995) determinou pH ótimo de 5,0 para a XR presente em

Saccharomyces cerevisiae. A atividade da XR na reação de redução da xilose por *Candida boidinii* apresentou pH ótimo entre 6,5 e 7,0, enquanto que, para a reação inversa - oxidação do xilitol a xilose, empregando a mesma enzima, o pH ótimo foi 9,0 (BOLEN e McCracken, 1990).

Os pontos isoelétricos (pI) das enzimas estudadas foram encontrados entre os valores de pH 3,55 e 5,20. O pI determinado para a levedura *C. lactativorus* foi de 3,55 (KISE *et al.*, 1988). DITZELMÜLLER *et al.* (1984) determinaram um PI de 4,87 para a XR *Pachysolen tannophilus*. O pI de *Candida boidinii* determinado por BOLEN e McCracken (1990) foi de 5,20.

2.2.3. Temperatura Ótima

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da XR de *Candida guilliermondii* foi estudado por SENE (2000). Segundo este autor, a temperatura ótima encontrada foi de 65 °C. A temperatura ótima da XR de *Cryptococcus lactativorus* demonstrou ser dependente do cofator empregado (KISE *et al.*, 1988). Quando utilizado o cofator NADPH, a atividade máxima foi encontrada a temperatura de 60 °C, porém, ao utilizar NADH como cofator, a enzima teve sua temperatura ótima reduzida para 50 °C.

2.2.4. Estabilidade

A enzima produzida por *Cryptococcus lactativorus* mostrou-se estável em valores de pH entre 6,0 e 8,0 unidades, após 24 h de incubação, quando utilizou ambos os cofatores, sendo desnaturada em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 (KISE *et al.*, 1988). O estudo de estabilidade térmica para esta enzima determinou uma atividade residual de 100 %, 93 % e 3 % da atividade inicial, após 10 min. de incubação a 30, 50 e 80 °C, respectivamente. A meia-vida desta enzima foi de 800 h e 14 h, a 30 e 50 °C, respectivamente, também para ambos os cofatores empregados.

A xilose redutase de *Candida shehatae* mostrou-se estável a 4 °C por vários meses, e por 48 h à temperatura ambiente (HO *et al.*, 1990). Frações contendo xilose redutase produzida por *Candida boidinii* puderam ser estocadas por pelo menos dois meses à 20 °C, sem perda da atividade (BOLEN e McCRACKEN, 1990).

2.3. PURIFICAÇÃO DA XILOSE REDUTASE

2.3.1. Rompimento Celular

A separação da xilose redutase requer, como etapa inicial, o rompimento das células para a sua liberação. Dentre as diversas técnicas de rompimento celular empregadas em trabalhos visando a purificação e caracterização de XR, destacam-se: o rompimento mecânico com pérolas de vidro (KISE *et al.*, 1988; RIZZI *et al.*, 1989; BOLEN e McCRACKEN, 1990; HO *et al.*, 1990; KUHN *et al.*, 1995; GÍRIO *et al.*, 1996), a homogeneização em prensa francesa (SMILEY e BOLEN, 1982; BOLEN e DETROY, 1985, BOLEN *et al.*, 1986, BOLEN e McCRACKEN, 1990) e o rompimento por ultrassom (BRUINENBERG *et al.*, 1983; DITZELMULLER *et al.*, 1984; BICHO *et al.*, 1988; LEE *et al.*, 1996). A ruptura mecânica por agitação com pérolas de vidro tem sido um dos métodos mais comumente empregados. Este processo apresenta um custo relativamente baixo e já vem sendo empregado para o rompimento de células para a obtenção de alguns produtos em larga escala (WOODROW e QUIRK, 1982).

BOLEN e McCRACKEN (1990) realizaram um estudo comparando diferentes métodos de rompimento, visando a liberação da XR produzida pela levedura *Candida boidinii*. Os métodos estudados foram: agitação com pérolas de vidro, homogeneização em prensa francesa, homogeneização precedida por tratamento com mercaptoetanol e passagem por prensa francesa precedida por tratamento com zimolase. Os resultados apontaram o rompimento em prensa francesa precedido por tratamento com mercaptoetanol como o método mais eficiente para a liberação da enzima, promovendo uma liberação maior do que o dobro da obtida com outros métodos.

2.3.2. Métodos Empregados para a Purificação da Xilose Redutase

A purificação da enzima XR produzida por diferentes microrganismos tem sido freqüentemente relatada em estudos empregando técnicas cromatográficas. A XR da levedura *Pachysolen tannophilus* foi purificada com o emprego de quatro etapas cromatográficas, na seguinte sequência: 1) cromatografia em coluna de *DEAE-cellulose*; 2) Cromatografia em coluna de *2',5'-ADP-Sepharose*; 3) Filtração em gel; e 4) Cromatografia em *Blue Sepharose* (DITZELMÜLLER *et al.*, 1984). O fator de purificação alcançado foi de 57,5 vezes, com um rendimento de 37%. VERDUYN *et al.* (1985) purificou a XR de *Pichia stipitis* empregando cinco etapas, na seguinte sequência: 1) centrifugação para a remoção de fragmentos celulares; 2) precipitação dos ácidos nucleicos; 3) cromatografia de troca iônica; 4) cromatografia por afinidade; e 5) congelamento e descongelamento. O fator de purificação alcançado foi de 50 vezes, com um rendimento de 69%. A xilose redutase de *Candida shehatae* foi purificada 55 vezes por HO *et al.* (1990), com um rendimento de 50,8%. As etapas de purificação empregadas para esta enzima foram: 1) centrifugação para a remoção de fragmentos celulares; 2) diálise em tampão fosfato; 3) cromatografia por afinidade em coluna de *Reactive Red Agarose*; 4) cromatografia de focalização isoelétrica (*cromatofocusing*); 5) cromatografia líquida de alta resolução por troca iônica; e 6) cromatografia líquida de alta resolução por fase-reversa. YOKOYAMA *et al.* (1995) identificaram e purificaram três XRs produzidas por *Candida tropicalis* (XR₁, XR₂ e XR₃) em um processo que consistiu das seguintes etapas: 1) diálise por 10h com tampão TEM; 2) cromatografia em coluna de *DEAE-cellulose*; 3) cromatografia por afinidade em coluna de *Blue Sepharose CL-6B*; 4) diálise por ultrafiltração; e 5) cromatografia líquida de alta resolução em coluna *Mono Q*. Os fatores de purificação alcançados foram 25,9, 36,8 e 21,8 vezes, e os rendimentos obtidos foram de 0,7%, 12,7% e 15,0% para as enzimas XR₁, XR₂ e XR₃, respectivamente.

No entanto, técnicas de purificação de biomoléculas mais adequadas para a aplicação em processos industriais estão sendo desenvolvidas. CORTEZ *et al.*, (2001)

estudaram a extração da XR de *Candida guilliermondii* em sistemas líquido-líquido de micelas reversas, alcançando um fator de purificação de 4,8 e uma recuperação de 135 %. Segundo estes autores, a recuperação superior a 100 % ocorre em função da redução na concentração de inibidores da XR durante o processo de extração.

3. XILITOL

3.1. OCORRÊNCIA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

O xilitol é um açúcar-álcool de cinco carbonos de ampla ocorrência na natureza. Sua presença foi relatada, em pequenas quantidades, em muitas frutas, verduras, cereais e em leveduras (WASHÜTTL *et al.*, 1973). O xilitol é também um intermediário no metabolismo de carboidratos em mamíferos, inclusive no homem, sendo encontrado em concentração entre 0,03 e 0,06 mg/l no sangue (YILIKARI, 1979).

Devido ao seu poder adoçante similar ao da sacarose, à sua propriedade não cariogênica e ao seu metabolismo independente de insulina, o xilitol vem sendo utilizado principalmente como adoçante em confeitos não cariogênicos, além de, menos freqüentemente, ser também utilizado em alimentos dietéticos, preparações farmacêuticas e em cosméticos (HYVÖNEN *et al.*, 1982; BÄR, 1986).

A utilização de xilitol na profilaxia de cáries dentárias vem sendo amplamente estudada nas últimas décadas (MÄKINEN, 1983; ALANEN *et al.*, 2000; MÄKINEN *et al.*, 1998). Diversos trabalhos têm sido publicados abordando as propriedades cariostáticas e anticariogênicas do xilitol (PEPPER e OLINGER, 1988; MÄKINEN, 1988; TENOVUO e SÖDERLING, 1992; HUJOEL *et al.*, 1995). Além da baixa cariogenicidade, a ocorrência de remineralização de cáries já existentes foi verificada por MAKINEN (1979) em indivíduos que se alimentaram exclusivamente de xilitol como açúcar. O aumento do fluxo de saliva e a manutenção de seu pH entre 7,2 e 7,8, decorrentes da dieta a que foram submetidos os voluntários, foram apontados como fatores contribuintes para que os mecanismos naturais de defesa da saliva pudessem reparar as áreas em princípio

de desmineralização. Trabalhos mais recentes apontam os benefícios do consumo de xilitol por mães na profilaxia de cáries causadas pela transmissão de *Streptococcus mutans* de mães para filhos (ISOKANGAS *et al.*, 2000; SÖDERLING *et al.*, 2001).

Outra propriedade importante do xilitol, de acordo com YILIKARI (1979), é a capacidade de ser rapidamente metabolizado no fígado humano, sendo transformado em energia. A absorção do xilitol pelo intestino, no entanto, é consideravelmente lenta. Como consequência destes dois fatores, a assimilação do xilitol pelo organismo humano se processa de forma que toda a glicose formada a partir do xilitol seja primeiro estocada como glicogênio, sendo liberada gradualmente, e não causando mudanças rápidas na concentração de glicose no sangue. Com isto, o xilitol pode ser indicado como adoçante para diabéticos.

Estudos recentes apontam a eficácia do xilitol também na prevenção de otite (LAGACE, 1999; UHARI *et al.*, 2000; KLEIN, 2000). Em estudo conduzido durante 2 meses empregando 306 crianças, UHARI *et al.* (2000) observaram uma redução de cerca de 42% nos casos de otite aguda no grupo de crianças que consumiram 8,4g de xilitol por dia em relação ao grupo de controle. Segundo estes autores, este efeito se deve à eficácia do xilitol na redução do crescimento de *Streptococcus pneumoniae*, prevenindo assim, a ocorrência da otite aguda causada por pneumococos.

Outra importante aplicação clínica recentemente apontada para o xilitol é o seu uso na prevenção da osteoporose (MATILLA, 1999). Estudos com cobaias mostraram que a administração oral de xilitol foi efetiva tanto no aumento da massa óssea de cobaias saudáveis, quanto na prevenção da perda óssea em cobaias nas quais a osteoporose foi experimentalmente induzida. Segundo este autor, a administração oral de xilitol parece oferecer interessantes possibilidades para a prevenção de osteoporose.

3.2. OBTENÇÃO DO XILITOL

A extração do xilitol diretamente de suas fontes naturais é um processo antieconômico e impraticável, uma vez que esta substância é encontrada apenas em

pequenas quantidades (menos de 900mg/100g) na natureza (HYVÖNEN *et al.*, 1982). Segundo estes autores, um processo alternativo à extração é a obtenção do xilitol pela hidrogenação da xilose presente na matéria vegetal, o que pode ser realizado por via química ou por via biotecnológica, em processos fermentativos ou enzimáticos.

3.2.1. Matéria-Prima: Resíduos Lignocelulósicos como Fonte de Xilose

Os materiais lignocelulósicos sob a forma de resíduos agrícolas e florestais são acumulados no mundo em grandes quantidades. De acordo com BISARIA e GHOSE (1981), o acúmulo destes materiais resulta na deterioração do meio ambiente e na perda de recursos potencialmente valiosos. Além disso, a biomassa sob a forma de celulose, hemicelulose e lignina consiste em um meio de coletar e armazenar energia solar e, assim, representa uma importante fonte de energia e matéria-prima.

A xilose é o maior constituinte da hemicelulose das plantas. Esta pentose é um dos compostos de açúcar mais abundantes presentes em biomassa renovável de resíduos florestais e agrícolas (HO *et al.*, 1990). A recuperação da xilose através da despolimerização da hemicelulose é facilitada pela estrutura relativamente aberta desta molécula. Processos de hidrólise com ácidos diluídos são comumente empregados na recuperação dos açúcares da hemicelulose (CHEN e GONG, 1985; ROBERTO *et al.*, 1995; PARAJO *et al.*, 1996). A xilose assim obtida constitui a matéria-prima principal na obtenção do xilitol por diferentes métodos.

3.2.2. Processos de Obtenção do Xilitol

3.2.2.1. Método Químico

De acordo com MELAJA e HÄMÄLÄINEN (1977), o processo de obtenção de xilitol à partir da xilose, por via química, consiste na hidrólise ácida do material

lignocelulósico, seguida da purificação e hidrogenação da xilose, e, finalmente, na purificação do xilitol (Figura 1.3). De acordo com HYVÖNEN *et al.* (1982), devido à variedade de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico, a obtenção da solução purificada de xilose a ser empregada no processo químico de produção de xilitol requer dispendiosas etapas de purificação. A hidrogenação da solução purificada de xilose é realizada em presença de catalisador metálico ($\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$), sob temperatura de 80-140 °C e alta pressão de hidrogênio (até 50 atm).

Segundo LU *et al.* (1995), o método químico requer extensivos procedimentos de purificação da xilose, bem como de separação do xilitol de outros açúcares-álcoois formados durante o processo de hidrogenação, o que resulta em um produto caro, limitando, assim, a sua utilização. Contribui também para o encarecimento do produto final o elevado consumo de energia demandado no processo.

3.2.2.2. Processo Microbiológico

O processo fermentativo de produção de xilitol tem sido considerado como uma alternativa ao processo químico, uma vez que este não requer a purificação inicial da xilose, além de ser realizado sob condições mais brandas (HEIKKILÄ *et al.*, 1992). A grande maioria dos trabalhos relata a produção de xilitol por via microbiológica empregando leveduras (GONG *et al.*, 1981; BARBOSA *et al.*, 1988; OJAMO *et al.*, 1988; VONGSUVANLERT e TANI, 1989; MEYRIAL *et al.*, 1991; ROBERTO *et al.*, 1991; ROSEIRO *et al.*, 1991; HEIKKILÄ *et al.*, 1992; HORITSU *et al.*, 1992; SIRISANSANEEYAKUL *et al.*, 1992; FELIPE *et al.*, 1993; NOLLEAU *et al.*, 1995; VANDESKA *et al.*, 1995; MAYERHOFF *et al.*, 1998), embora alguns estudos para a produção deste poliol empregando bactérias e fungos filamentosos tenham sido realizados (YOSHITAKE *et al.*, 1973; YOSHITAKE *et al.*, 1976; DASHIYA, 1991).

VIA QUÍMICA

VIAS BIOTECNOLÓGICAS

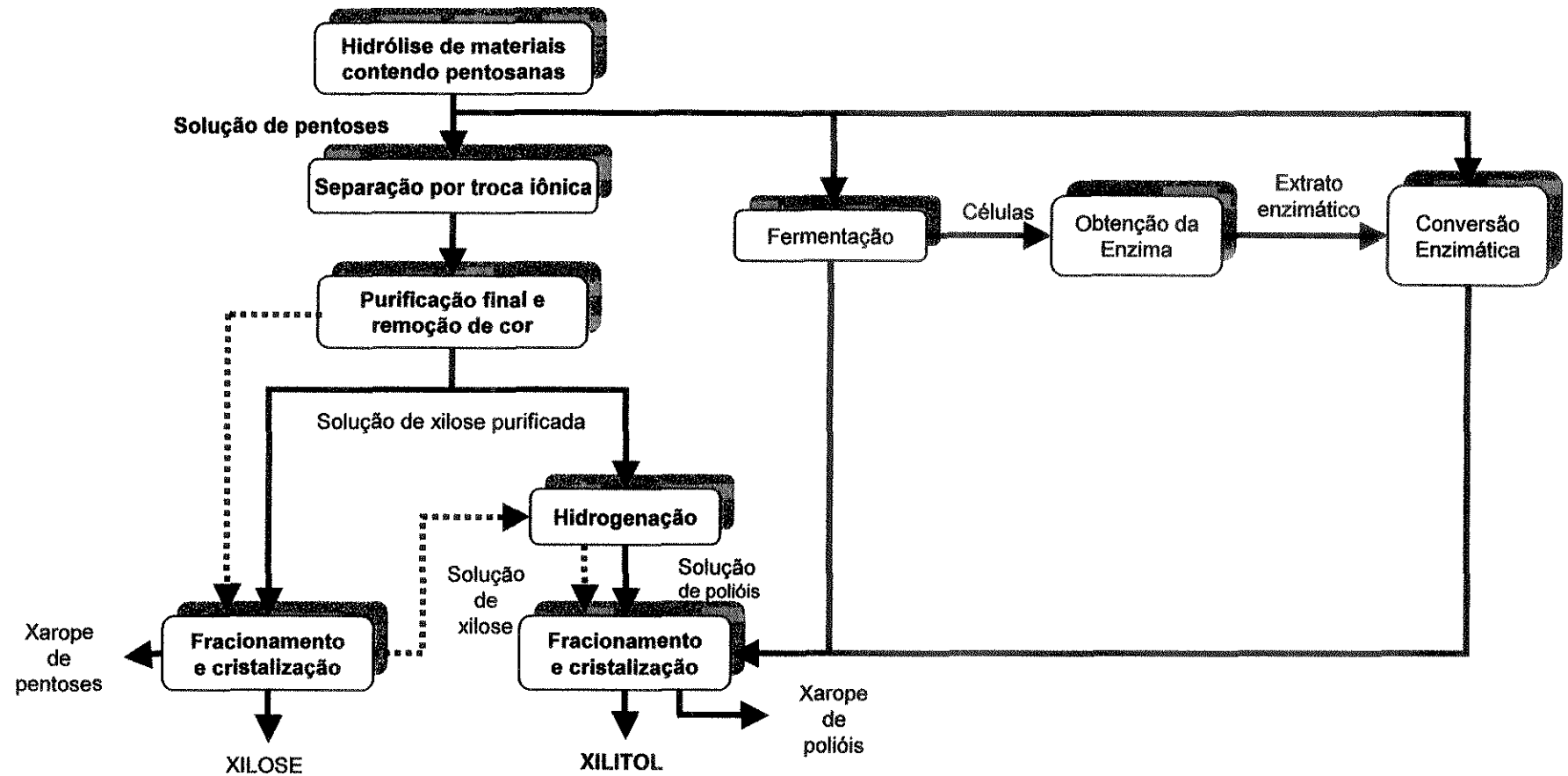


Figura 1.3 – Esquema para a obtenção de xilitol por via química e biotecnológica

No metabolismo de leveduras, o xilitol é formado através da redução da xilose pela enzima xilose redutase (XR). Segundo NIGAM e SINGH (1995), devido ao passo seguinte, no qual o xilitol é convertido em xilulose através da enzima xilitol desidrogenase (XD) e subseqüentemente metabolizado na via das fosfopentoses, o rendimento de xilose em xilitol no processo microbiológico encontra-se tipicamente na faixa entre 65% e 85%. De acordo com BARBOSA *et al.* (1988), o rendimento teórico calculado para a conversão de xilose em xilitol por leveduras em condições aeróbias, para microrganismos cuja XR utiliza basicamente NADPH como cofator, é de 0,91 g xilitol/g xilose (91 %).

Em estudo anteriormente realizado (MAYERHOFF, 1997), visando a seleção de leveduras para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, a levedura *Candida mogii* NRRL Y-17032 foi selecionada, entre 31 diferentes linhagens pertencentes a quatro gêneros, como uma promissora produtora deste poliol. Neste estudo, foram obtidos um rendimento em xilitol em torno de 70% e uma produtividade volumétrica de 0,63 g/l.h, empregando *Candida mogii* NRRL Y-17032. Embora satisfatórios quando comparados a resultados de outros estudos para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisados de resíduos vegetais, o rendimento em xilitol alcançado neste trabalho encontra-se substancialmente abaixo do rendimento teórico, devido às limitações do método microbiológico, que requer a degradação do xilitol para a manutenção do metabolismo das leveduras. Rendimentos em xilitol próximos ao teórico têm sido relatados em estudos empregando microrganismos modificados geneticamente cultivados em meio sintético, porém, nestes casos, foi observada a necessidade de adição de co-substratos (como a glicose) ao meio de fermentação (HALLBORN *et al.*, 1994; MEINANDER *et al.*, 1994).

3.2.2.3. Processo Enzimático

O processo enzimático para a síntese de xilitol empregando a enzima XR recuperada, quando comparado aos processos fermentativos anteriormente mencionados, pode representar um aumento no rendimento em xilitol, uma vez que a

enzima responsável pela reação de degradação do xilitol (XD) não está presente. A produção enzimática deste poliol pode também resultar em um aumento substancial da produtividade, decorrente da redução nas limitações de transferência de massa, que são muitas vezes limitantes no processo microbiológico (NIDETZKY *et al.*, 1996).

Alguns estudos realizados visando a produção de xilitol por processo enzimático apresentaram uma eficiência da conversão de xilose em xilitol de 100% (KITPREECHAVANICH *et al.*, 1984; NIDETZKY *et al.*, 1996). No entanto, uma limitação do processo enzimático de conversão de xilose em xilitol é a necessidade do reciclo da forma reduzida da coenzima (NADPH ou NADH). A redução da coenzima nos estudos de produção de xilitol por processo enzimático tem sido realizada através do emprego de membranas eletricamente carregadas ou por acoplamento de microrganismos metanogênicos capazes de regenerar a coenzima (NIDETZKY *et al.*, 1996, KITPREECHAVANICH *et al.*, 1984).

3.3. PALHA DE ARROZ

Dentre os diversos resíduos citados na literatura como sendo gerados em grandes quantidades, encontra-se a palha de arroz, cuja produção se destaca principalmente nos países em desenvolvimento (SRINIVASAN *et al.*, 1983; EL-MASRY, 1983). Também no Brasil, a quantidade gerada destes resíduos alcança números significativos. Na região sul do Brasil, 3,85 toneladas de palha são geradas por hectare de arroz plantado (MARTINS, citado por ROBERTO, 1997). Segundo dados obtidos junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a produção de palha de arroz no Brasil, na safra de 1995/96, correspondeu a $13.914,8 \times 10^3$ ton.

Segundo JEFFRIES (1983), grandes quantidades dos resíduos lignocelulósicos gerados no mundo são utilizados em processos de polpação ou na geração de calor, implicando em grandes vantagens econômicas. No caso específico da palha de cereais, embora trabalhos anteriores tenham apontado a sua utilização para a geração de vapor como também para a nutrição animal pouco interessante, a sua utilização para estes fins tem sido amplamente adotada (HORWATH e van KESSEL, 1998). Diversos

trabalhos apontam estes resíduos como tendo baixo calor de combustão por unidade de volume (CHEN e ANDERSON, 1980), baixa digestibilidade (HAN e ANDERSON, 1975; CHEN e ANDERSON, 1980), além de apresentar um baixo teor protéico (HAN e ANDERSON, 1975; SRINIVASAN *et al.*, 1983). Estas características destes resíduos, porém, são muitas vezes contornadas, tornando possível o seu emprego para diversos fins, como por exemplo, o emprego da palha de arroz para a nutrição animal, quando suplementada com outros nutrientes. A combustão da palha de arroz é relatada como o método de disposição mais economicamente viável empregado pelas agroindústrias da Califórnia/EUA. Entretanto, devido ao impacto ambiental decorrente desta prática, diversas alternativas para a sua minimização vem sendo estudadas (HORWATH e van KESSEL, 1998). A possibilidade de remoção dos açúcares hemicelulósicos da palha de arroz para a utilização em processos fermentativos e do posterior emprego dos resíduos de celulose e lignina na geração de calor consiste em uma alternativa interessante para o aproveitamento total desta biomassa.

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido conduzidos visando a utilização do componente hemicelulósico da biomassa vegetal, rico em xilose, como substrato para a obtenção de diversos produtos de interesse econômico e social, dentre os quais destaca-se o xilitol.

CAPÍTULO 2

Neste capítulo, será apresentado o estudo do efeito da concentração inicial de substrato na produção da xilose redutase (XR) de *Candida mogii* empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz como fonte de carbono. O resumo, uma breve introdução, a metodologia empregada, os resultados obtidos e as referências bibliográficas citadas estão apresentados em tópicos distintos. Os resultados de produção e produtividade específicas tanto de xilose redutase quanto de xilitol foram avaliados, e as concentrações ótimas para a produção de ambos os produtos foram comparadas.

Este trabalho foi publicado no periódico Applied Biochemistry and Biotechnology, v.91/93, p.729-737, 2001.

Copyright © 2001 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/01/91-93/0729/\$12.25

Activity of Xylose Reductase from *Candida mogii* Grown in Media Containing Different Concentrations of Rice Straw Hydrolysate

ZEIA D. V. L. MAYERHOFF,¹ INÊS C. ROBERTO,^{*,2}
AND TELMA T. FRANCO¹

¹Faculty of Chemical Engineering, State University of Campinas,
PO Box 6066, Campinas, SP, Brazil; and ²Department of Biotechnology,
Faculty of Chemical Engineering of Lorena, PO Box 116,
SP, Brazil, E-mail: ines@debiq.faenquil.br

Abstract

Xylose reductase (XR) activity was evaluated in extracts of *Candida mogii* grown in media containing different concentrations of rice straw hydrolysate. Results of XR activity were compared to xylitol production and a similar behavior was observed for these parameters. Highest values of specific production and productivity were found for xylose reductase (35 U/g of cell and 0.97 U/[g of cell·h], respectively) and for xylitol (5.63 g/g of cell and 0.13 g/[g of cell·h]) in fermentation conducted in medium containing 49.2 g of xylose/L. The maximum value of XR:XD ratio (1.82) was also calculated under this initial xylose concentration with 60 h of fermentation.

Index Entries: *Candida mogii*; hydrolysate concentration; rice straw; xylitol; xylose reductase.

Introduction

Xylose reductase (XR) is the enzyme responsible for the first step in xylose metabolism by yeasts (1). In a reaction catalyzed by this enzyme, xylose is reduced to xylitol, which can be oxidized into xylulose or released into the environment, depending on the culture conditions of the microorganism. The oxidation of this polyalcohol is catalyzed by the enzyme xylitol dehydrogenase (XD). Xylitol is a sugar alcohol of economic interest because of its dietetic and anticariogenic properties (2,3). Microbial and enzymatic processes have been studied as alternatives to the chemical

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

process currently employed for its production (4-8). These biologic processes are expected to reduce the final cost of xylitol by allowing the utilization of xylose from hydrolysates of lignocellulosic materials, thus eliminating the need for the previous purification of this sugar (9). Among several residues utilized as a xylose source for xylitol production by yeasts, rice straw has been deemed a potential substrate for this bioconversion (6,9). Many yeasts have the capability of efficiently producing xylitol from hemicellulose hydrolysates. In a previous study, *Candida mogii* NRRI Y-17032 was selected among 31 yeast strains as a promising xylitol producer from rice straw hemicellulose hydrolysate (10). Compared to microbiologic fermentation processes, the approach by enzyme technology employing isolated XR for xylitol synthesis should make a substantial increase in productivity because mass transfer limitations are avoided in homogeneous enzyme reactors (7). Taking into account that XR is an inducible enzyme, enhancing its production depends on the optimization of microorganism culture conditions. Some factors have been studied in order to evaluate their influence on XR activity (11,12). In the present study, the effect of initial substrate concentration was investigated in *C. mogii* fermentations employing rice straw hydrolysate as the source of carbon.

Materials and Methods

Preparation of Hemicellulose Hydrolysate

Rice straw hemicellulose hydrolysate was obtained by acid hydrolysis of the rice straw in an AISI 316 stainless steel 350-L stirred-tank reactor. The hydrolysis was run for 20 min at 120°C using 10 mL of 0.13 M H_2SO_4 solution/g of dry matter. The obtained hemicellulose hydrolysate was collected by centrifugation and homogenized. The following components were detected: 18.1 g/L of xylose, 3.5 g/L of glucose, 2.8 g/L of arabinose, 0.025 g/L of furfural, and 0.038 g/L of hydroxymethylfurfural (HMF). This hydrolysate was concentrated under vacuum at 70°C and the xylose concentration reached 220 g/L. Next, the pH was raised with NaOH pellets up to 8.0 and then lowered to 6.0 with 72% H_2SO_4 (w/w). Each time the pH level was changed, the precipitate was removed by centrifugation (2860g for 30 min).

Microorganism and Preparation of Inoculum

C. mogii NRRI Y-17032 obtained from Northern Regional Research Laboratory (Peoria, IL) was maintained at 4°C on nutrient agar slants. Inoculum was prepared by cultivating cells in 125-mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of medium. The medium was composed of rice straw hemicellulose hydrolysate diluted with distilled water to provide an initial xylose concentration of 30 g/L. Loopfulls of cells were suspended in a few milliliters of distilled water, and this suspension was pipetted into the flasks. The flasks were incubated in a rotary shaker at 200 rpm and 30°C. After 48 h, cells were harvested by centrifugation. The fermentation medium contained an initial cell concentration of 1 g/L.

Fermentation Conditions

Fermentation media were composed of rice straw hemicellulose hydrolysate containing 220 g/L of xylose diluted with distilled water to provide initial xylose concentrations of 30, 40, 50, 70, and 90 g/L. Twenty-five milliliters of these media was placed into 125-mL Erlenmeyer flasks that were inoculated and then incubated at 30°C at 200 rpm. Each sample was constituted by the total volume of one Erlenmeyer flask.

Preparation of Cell-Free Extracts

Cells were harvested by centrifuging at 2860g for 30 min at 4°C, washed with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2), and resuspended to a concentration of 15 g of dry cell weight/L with the same buffer. Cell disruption was conducted by sonication for 35 min in 1-s pulses with 1-s intervals in Sonics & Materials Disrupter equipment. Samples were centrifuged for 10 min at 6000g in a Jouan MR1812 centrifuge, and the cell-free extract was used for enzymatic tests.

Xylose Reductase Assay

Enzyme activities were determined spectrophotometrically by following the oxidation or reduction of the coenzyme at 340 nm. The assays were performed as described by Bolen and Detroy (13) except for cofactor concentration and buffer pH. The XR assay reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2; 10 mM mercaptoethanol; 0.12 mM NADPH; 50 mM D-xylose; cell extract; and distilled water in a total volume of 1 mL. The reaction was started by the addition of D-xylose. XD activity was determined in a similar manner with phosphate buffer, D-xylose, and NADPH substituted by 75 mM Tris buffer, pH 8.6; 50 mM xylitol; and 0.12 mM NAD⁺, respectively. One unit was defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation or reduction of 1 μ mol of cofactor/min. Specific activities were expressed as units per gram of cell.

Analytical Methods

Cell mass was determined by using a calibration curve that correlates optical density at 600 nm and dry cell weight. Concentrations of sugars were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Shimadzu C-R7A chromatograph equipped with a refractive index detector and a Bio-Rad Aminex HPLC-87H column. Concentrations of furfural and HMF were determined by HPLC using a Waters chromatograph equipped with an ultraviolet detector and an RP18 column.

Results and Discussion

Table 1 presents the partial composition of fermentation media. Xylose concentrations were close to those expected from the dilutions, varying from 29.2 to 88.3 g/L. Concentrations of glucose and arabinose were both

Table 1
Partial Composition of Fermentation Media
with Hydrolysate Concentrations Equivalent to Different Xylose Contents

Component (g/L)	Xylose content (g/L)				
	29.2	38.6	49.3	69.8	88.3
Glucose	5.5	7.3	9.2	13.0	15.6
Arabinose	5.1	6.7	8.6	12.1	14.6
Furfural	0.017	0.021	ND ^a	ND ^a	0.028
HMF	0.026	0.032	0.042	0.062	0.076

^aND, not determined.

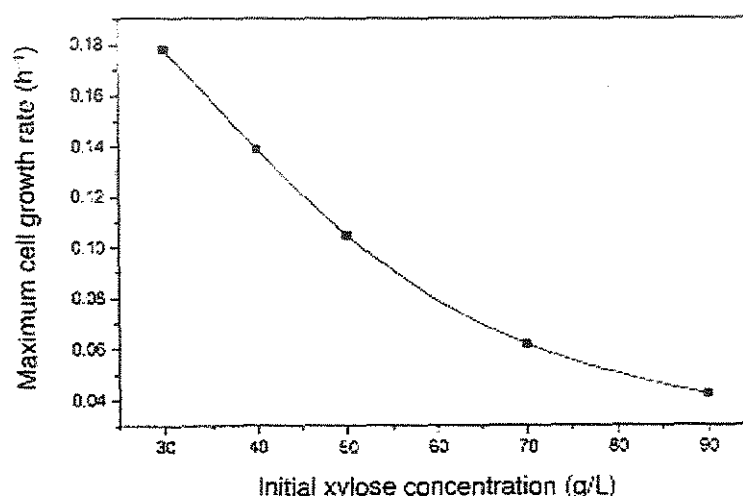


Fig. 1. Effect of hydrolysate concentration expressed as initial xylose content on maximum cell growth rates of the yeast *C. mogii*.

about 18% in relation to xylose levels. In addition to sugars, other substances could also be detected. Furfural and HMF are frequently found in hemicellulose hydrolysates (14,15). Acetic acid and lignin degradation products were not analyzed and may have volatilized during vacuum concentration. Initially, we intended to study a range of hydrolysate concentrations larger than that presented. However, in another study for xylitol production employing the yeast *Candida guilliermondii* and rice straw hydrolysate (16), no significant substrate consumption was detected above 90 g/L of xylose. Because the yeast *C. mogii* has presented a behavior similar to *C. guilliermondii* in all the studies conducted previously (10), the range was restricted up to 90 g/L.

Figure 1 shows maximum cell growth rates. This parameter was strongly influenced by rice straw hydrolysate concentration. A gradual decrease in maximum cell growth rate resulted by increasing hydrolysate

Table 2
Fermentative and Enzymatic Parameters Determined
Along Fermentation Time with Initial Rice Straw Hydrolysate Contents Equivalent
to Different Xylose Concentrations

S_i (g/L)	Run time (h)	Xylose used (%)	Y_{xy} (g/g)	Y_{XR} (g/g)	q_{xy} (g/[g·h])	q_{XR} (U/[g·h])	P_{xy} (g/g)	P_{XR} (U/g)	XR:XDH ratio
29.2	24	84	0.43	0.19	0.09	0.79	2.23	19	0.69
	36	97	0.42	0.24	0.05	0.36	1.78	13	0.89
	48	97	0.39	0.32	0.03	0.15	1.24	7	1.02
38.6	24	69	0.47	0.17	0.11	0.46	2.74	11	0.88
	36	93	0.46	0.16	0.08	0.56	2.95	20	0.81
	48	97	0.44	0.22	0.04	0.33	2.03	16	0.80
49.3	36	82	0.59	0.13	0.13	0.97	4.64	35	1.70
	48	95	0.58	0.10	0.12	0.63	5.55	30	1.29
	60	99	0.54	0.10	0.09	0.50	5.63	30	1.82
69.8	48	37	0.65	0.15	0.09	0.21	4.32	10	1.38
	72	66	0.53	0.11	0.07	0.18	4.82	13	0.58
	96	99	0.45	0.09	0.05	0.22	5.01	21	0.75
88.3	96	43	0.32	0.09	0.04	0.16	3.79	15	1.75
	120	49	0.30	0.12	0.02	0.08	2.60	9	1.68
	144	65	0.24	0.08	0.02	0.08	3.25	11	1.51

Y_{xy} , xylitol yield (g/g of xylose used); Y_{XR} , cell yield (g/g of xylose used); q_{xy} , specific xylitol productivity (g/[g of cell·h]); q_{XR} , specific XR productivity (U/[g of cell·h]); P_{xy} , specific xylitol production (g/g of cell); P_{XR} , specific XR production (g/g of cell). Values are average of duplicates.

concentrations. The highest value (0.18 h^{-1}) was achieved with an initial xylose concentration of 29.2 g/L , and the lowest value (0.04 h^{-1}) was found in fermentation with 88.3 g of xylose/L. Several researchers have reported growth inhibition by rising substrate concentration on yeast physiology. A decline of yield and specific rate of cell production when the amount of xylose initially present in the culture increased was found in a study for xylitol production from *C. guilliermondii* in synthetic medium (17). The yeasts *C. guilliermondii* and *Candida parapsilosis* showed the same relationship between cell growth and xylose concentration under different aeration conditions (11). Growth inhibition in fermentations using hemicellulose hydrolysates as substrate has been reported at lower levels of xylose concentration than in synthetic media (16,18). du Preez et al. (18) observed an increase in maximum specific growth rate from 0.21 to 0.35 h^{-1} by diluting to half the hydrolysate concentration in fermentation medium. These results suggest that in the present study inhibition has occurred as a function of the increase in concentration of toxic compounds.

Table 2 shows the results of the fermentative and enzymatic parameters monitored for each initial xylose concentration along fermentation time. The highest values of specific production of xylitol (5.63 g/g of cell) and XR (35 U/g of cell) were found with an initial xylose concentration of

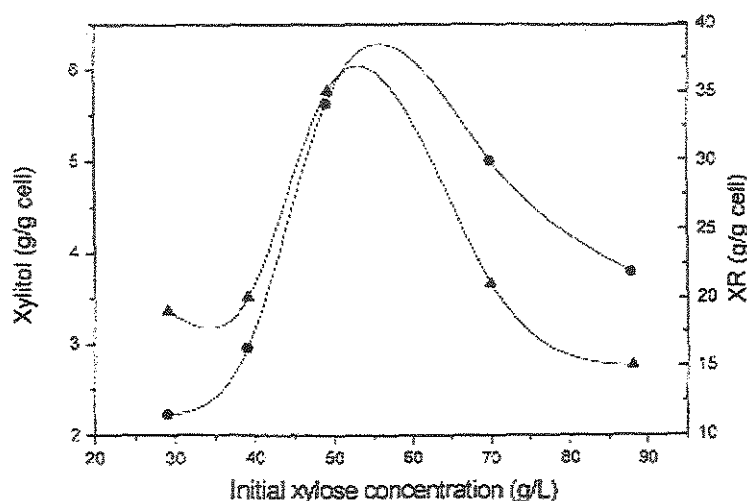


Fig. 2. Highest values of specific production for xylitol (—●—) and XR (—▲—) in fermentations with different hemicellulosic hydrolysate concentrations expressed as initial xylose content.

49.3 g/L. The lowest values for both xylitol (1.24 g/g of cell) and XR (7 U/g of cell) were determined at a fermentation condition of 29.2 g of xylose/L and 48 h. The effect of initial substrate concentration condition on specific production is shown in Fig. 2, where points of maximum can be observed at about 50 g of xylose/L. Time course profiles suggested a relationship between xylitol and XR for this parameter (Fig. 3). In most cases, values increased or decreased with xylitol-specific formation. Nolleau et al. (11) reported similar behavior when evaluating the influence of xylose concentration on xylitol production from strains of *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis* in synthetic medium. According to them, maximum values of specific enzyme activity were found for *C. guilliermondii* (0.63 U/mg of total protein) and *C. parapsilosis* (0.42 U/mg of total protein) at their optimal initial xylose concentrations (100–150 and 200–300 g/L, respectively) for xylitol accumulation.

According to Table 2, values of specific productivity varied from 0.02 to 0.13 g/(g of cell·h) for xylitol and from 0.08 to 0.97 U/(g of cell·h) for XR. For this parameter, a relationship between xylitol and XR along the fermentation time was found only in fermentations with 29.2, 49.3, and 88.3 g of xylose/L. Figure 4 shows the effect of initial substrate concentration condition on specific productivity. The highest values for both products were found in fermentation with 49.3 g of xylose/L. Specific production rates of xylitol and XR have already been associated in *C. mogii* fermentation using synthetic media with an initial xylose concentration varying from 5.3 to 53 g/L, although values have not been presented (12). In the present study, the maximum values for total formation of xylitol and enzyme were found with an initial xylose concentration of 49 g/L in a 60-h

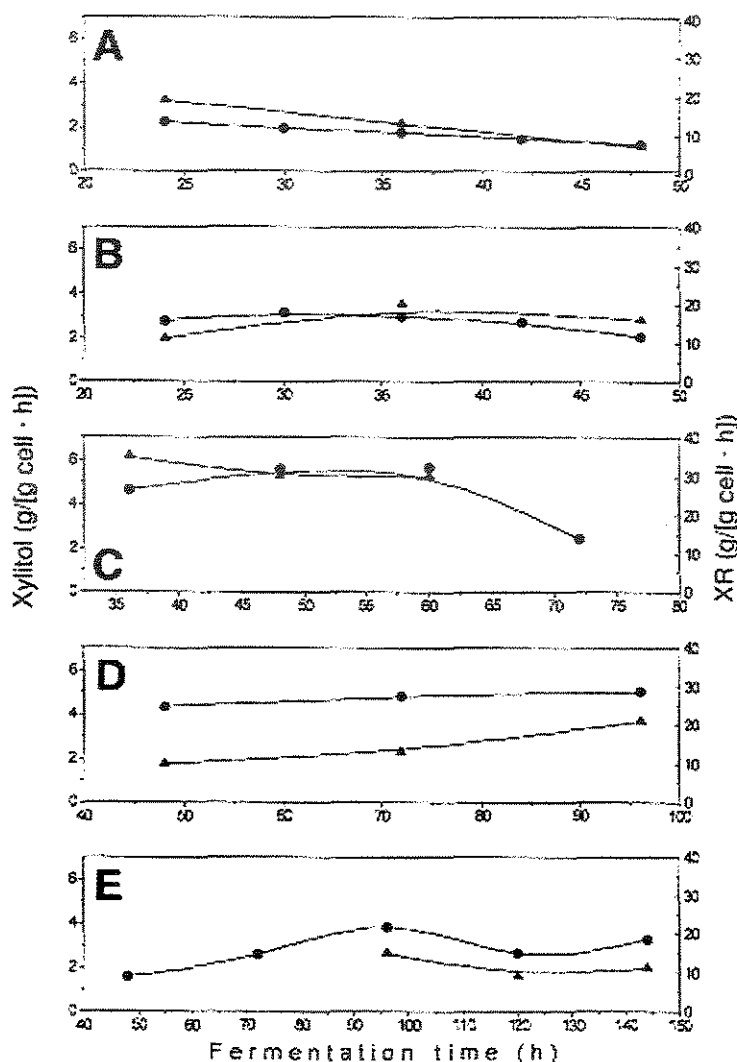


Fig. 3. Specific production of xylitol (—●—) and XR (—▲—) along fermentation time with hydrolysate concentrations equivalent to (A) 29.2, (B) 38.6, (C) 49.3, (D) 69.8, and (E) 88.3 g/L.

fermentation (data not shown). Under this condition, the XR:XD ratio was the highest (1.82). Similar values were calculated for the yeasts *Candida boidinii* (19) and *Debaryomyces hansenii* (20). For these microorganisms, XR:XD ratio varied from 1.10 to 2.10 and 1.14 to 2.26, respectively.

Xylitol and XR production was positively influenced by initial hydrolysate concentration up to a certain level, whereas cell growth was strongly limited. Nevertheless, under higher initial hydrolysate concentrations, inhibition of xylitol and XR production was also observed. The inhibitory effect of hydrolysate concentrations in yeast fermentations has been attributed to toxic chemicals often formed during acid hydrolysis

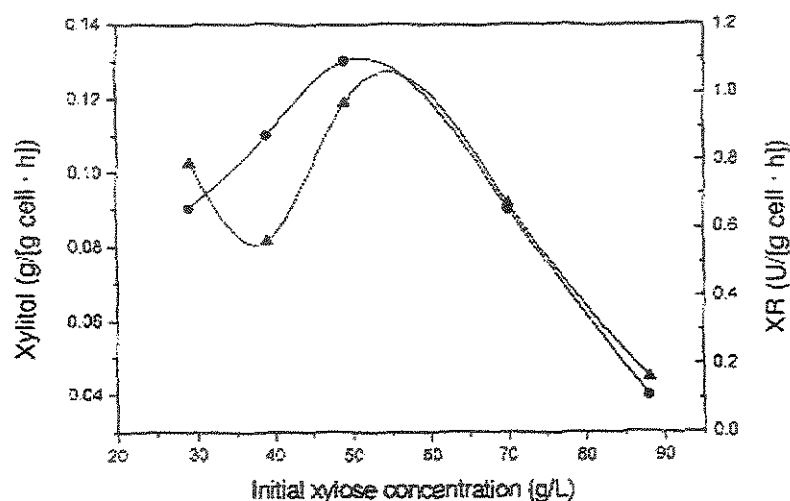


Fig. 4. Highest values of specific productivity for xylitol (—●—) and XR (—▲—) in fermentations with different hemicellulosic hydrolysate concentrations expressed as initial xylose content.

(16,21,22). In a study of the effects of lignocellulosic degradation products on xylose fermentation, Delgenes et al. (23) found that the intensity of growth inhibition was closely related to the initial concentration of tested inhibiting molecules.

Results drawn from the experiments in the present study showed an optimal initial hydrolysate concentration condition for xylitol and XR production with about 50 g of xylose/L. However, because the effect of substrate concentration seems to be dependent on aeration conditions (11), it is possible that the formation of these products might be improved by using different aeration levels.

Acknowledgments

We wish to thank Maria Eunice M. Coelho for revising the manuscript. We also acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil.

References

1. Chiang, C. and Knight, S. G. (1960), *Nature* **188**, 79–81.
2. Mäkinen, K. K. (1992), *J. Appl. Nutr.* **44**, 16–28.
3. Ylikari, R. (1979), *Adv. Food Res.* **25**, 159–180.
4. Heikkilä, H., Nurmi, J., Rahkila, L., Töyrylä, M., and Kirkkonummi, M. T. (1992), US patent 5,051,026.
5. Strehainu, P. and Dupuy, M.-L. (1990), FR patent 2,641,545.
6. Roberto, I. C., Felipe, M. G. A., Mancilha, I. M., Vitolo, M., Sato, S., and Silva, S. S. (1995), *Biores. Technol.* **51**, 255–257.

7. Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D., and Kulbe, K. D. (1996), *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 387-396.
8. Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Nishio, N., and Nagai, S. (1984), *Biotechnol. Lett.* **6**, 651-656.
9. Roberto, I. C., Mancilha, I. M., de Souza, C. A., Felipe, M. G. A., Sato, S., and Castro, H. F. (1994), *Biotechnol. Lett.* **16**, 1211-1216.
10. Mayerhoff, Z. D. V. L., Roberto, I. C., and Silva, S. S. (1997), *Biotechnol. Lett.* **19**, 407-409.
11. Nollet, V., Preziosi-Belloy, L., Delgenes, J. P., and Navarro, J. M. (1993), *Curr. Microbiol.* **27**, 191-197.
12. Sirisansaneeyakul, S., Staniszwski, M., and Rizzi, M. (1995), *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 565-570.
13. Bolen, P. L. and Detroy, R. W. (1985), *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 302-307.
14. Rodrigues, D. C. G. A., Silva, S. S., and Felipe, M. G. A. (1998), *J. Biotechnol.* **62**, 73-77.
15. Alves, L. A., Felipe, M. G. A., Almeida e Silva, J. B., Silva, S. S., and Prata, A. M. R. (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70/72**, 89-98.
16. Silva, C. J. S. M. and Roberto, I. C. (1999), *Biotechnol. Technique* **13**, 743-747.
17. Meyrial, V., Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. (1991), *Biotechnol. Lett.* **13**, 281-286.
18. du Preez, J. C. (1994), *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 944-956.
19. Vandeska, E., Kuzmanova, S., and Jeffries, T. W. (1995), *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 513-516.
20. Girio, F. M., Roseiro, J. C., Sá-Machado, P., Duarte-Reis, A. R., and Amaral-Collaco, M. T. (1994), *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 1074-1078.
21. Dominguez, J. M., Gong, C. S., and Tsao, G. T. (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 49-56.
22. Preziosi-Belloy, L., Nollet, V., and Navarro, J. M. (1997), *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 124-129.
23. Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. (1996), *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 220-225.

CAPÍTULO 3

Neste capítulo estão apresentados os estudos para determinação da atividade ótima, da estabilidade, da especificidade para o cofator e dos parâmetros cinéticos da XR presente no extrato enzimático de *Candida mogii*.

Os ensaios para determinação da atividade ótima da XR foram realizados em diferentes condições de pH e temperatura, de acordo com um planejamento experimental. Neste estudo, a atividade ótima da XD foi também avaliada. Para o estudo da especificidade da XR para o cofator, foram utilizados NADH e NADPH nas análises enzimáticas. A estabilidade da XR nas temperaturas de estocagem (4 e – 18 °C) e na temperatura ótima previamente determinada (38 °C) foi investigada. Foram também determinados os parâmetros cinéticos da XR para o substrato e o cofator.

Este trabalho foi publicado parcialmente nos Anais de Trabalhos Completos do I Encontro de Pós-Graduação, vol. 2, pág. 135-137, São José dos Campos, 2001, e será submetido para publicação integral em periódico especializado.

**KINETIC PROPERTIES OF THE ENZYME XYLOSE REDUCTASE PRESENT IN
Candida moggi CELL EXTRACT**

^{1,2}Zea D.V.L. Mayerhoff, ²Inês C. Roberto, ¹Telma T. Franco

¹School of Chemical Engineering, State University of Campinas – P.O. Box 6866,
13081-970, Campinas/SP, Brazil

²School of Chemical Engineering of Lorena – P.O. Box 116, 12600-970, Lorena/SP,
Brazil

ABSTRACT

Optimal activity, stability, cofactor specificity and kinetic parameters of the enzyme xylose reductase (XR) were determined employing *Candida moggi* cell extract. XR activity was evaluated at different pH values and temperatures according to an experimental design. Maximum activity (0.54 U/ml) predicted was for pH 6.5 and 38 °C. The enzyme xylitol dehydrogenase (XD) was also studied in this design in order to determine a desirable working region of maximum XR and minimum XD activities. XR stability was studied at temperatures of –18, 4 and 38 °C. Enzyme activity remained at 100% for three hours under four and 38 °C and for 4 months of storage at –18 °C. Studies on cofactor specificity showed that only NADPH-dependent XR was obtained under the cultivation conditions employed. Values of $V_{\max}$ and K_m determined for XR were 0.485 U/mL and 63 mM for the substrate xylose and 0.390 U/mL and 0.032 mM for the cofactor NADPH.

1. INTRODUCTION

The enzyme xylose reductase (XR) is responsible for the first step in the xylose metabolism of yeasts [1]. In a reaction catalyzed by this enzyme, xylose is reduced to xylitol which can either be oxidized to xylulose or released into the environment, depending on the culture conditions of the microorganism and the enzyme specificity for the cofactor NADH or NADPH [2,3,4]. The oxidation step is catalyzed by the enzyme xylitol dehydrogenase (XD). Xylitol is a sugar-alcohol of economic interest due to its sweetening capacity and dietetic and anticariogenic properties [5]. Studies on extraction and purification of XR from yeast cells [6,7] are aimed at either characterizing the enzyme to improve the fermentative process or obtaining a purified XR solution for direct use in enzymatic conversion of xylose into xylitol.

One of the problems in enzyme purification is establishing a reliable and reproducible assay to relate the amounts of enzyme in different fractions during the process. Enzyme activity depends on several factors, such as pH, temperature, concentration of substrates and presence of enzyme activators or inhibitors. Under optimal conditions, the enzyme shows maximum activity (V_{max}). Loss of activity over time interferes with the processes employing enzymes. Enzymes are sensitive molecules, unable to resist to a variety of stresses when outside their natural protective environment. Once the tissue is disrupted, intracellular enzymes are released from their safe environment into a hostile medium into which proteolytic enzymes are also released, and thus they are exposed to threats that may lead to loss of activity [8].

Candida mogii was selected from 31 yeast species as a good xylitol producer [9]. Studies on the purification of the XR present in this microorganism are under way in our laboratories. Data on the stability and the optimal conditions for storing and handling this enzyme will be useful for further studies. In this work, different values of pH and temperature were tested to determine the optimal XR activity conditions as well as the ratio between XR and XD. The stability of XR was also studied for different temperatures of storage and handling. Kinetic parameters were determined for the XR present in both *Candida mogii* extract and in a material purified by an aqueous two-phase system

(ATPS) composed of polyethylene glycol and phosphate salts. Several researchers have reported on textile dyes as specific ligands for enzyme extraction (10,11,12). Thus, the kinetic parameters of this enzyme in the presence of textile dyes were determined for XR extraction in ATPS.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. CHEMICALS

D-Xylose, β -mercaptoethanol, the cofactors NADPH, NADH and NAD^+ and the dye Cibacron Blue F-3G were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. The dye Drimaren VM BR A-4G was kindly endowed by Clariant S.A., Resende, RJ, Brazil. All other reagents used were of analytical grade.

2.2. CULTIVATION OF THE MICROORGANISM

The *Candida mogii* NRRL Y-17032 yeast obtained from the Northern Regional Research Laboratory (Peoria, IL) was kept at 4°C in agar slants. Cells were cultivated in medium prepared from rice straw hemicellulosic hydrolysate diluted with distilled water up to an initial xylose concentration of 50 g/L. This was done in Erlenmeyer flasks and the ratio of flask volume to medium volume was 5:1. The flasks were incubated in a rotary shaker at 200 rpm and 30°C for 48h. Initial cell concentration was 1g/L. Cells were harvested by centrifugation at 1100 x g, washed with 0.1M potassium phosphate buffer, centrifuged and resuspended with the same buffer to a concentration of 15g dry weight cell/L.

2.3. OBTAINMENT OF CELL-FREE EXTRACTS

Cell suspension was disrupted by ultrasonication for 35 min with 1 s pulses and 1 s intervals in Sonics equipment set at a frequency of 60Hz. Samples were centrifuged

for 10 min at 6000 x g in a Jouan MR1812 centrifuge. Cell-free extracts were collected and analyzed under the given conditions.

2.4. XR EXTRACTION

The enzyme was extracted in an aqueous two-phase system composed of 19.3 % (w/w) PEG 1000 and 12.4 % (w/w) sodium/potassium phosphate. A ten-gram system was prepared by adding 2 mL of cell extract, and the final mass was made up with deionized water. The systems were agitated in magnetic stirrer and after thorough homogenization transferred to graduated centrifuged tubes. Separation was achieved by centrifugation at 1600 x g for 5 min. The top phase was collected for determination of the XR kinetic parameters.

2.5. DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY

XR activity was determined by the change in absorbance at 340 nm due to the oxidation of the coenzyme (NADPH or NADH). Assays were run in a 1-mL cuvette containing 50 μ l 1 M phosphate buffer, 100 μ l 0.1 M mercaptoethanol, 100 μ l 1.2 mM NADPH, 100 μ l 0.5 M D-xylose and 650 μ l diluted sample. The reaction was started up by the addition of D-xylose. XD activity was determined in a similar manner using 0.5 M xylitol and 1.2 mM NAD⁺ as the substrate and the cofactor, respectively. Both temperature and pH of the analyses were determined in the study of optimal activities. Total protein concentration was determined by a colorimetric method using bovine serum albumin as the standard. One unit of XR activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 μ mol of NADPH per minute.

2.6. STUDY CONDITIONS

Optimal enzymatic activities were studied by running enzymatic analyses according to an experimental design with three different temperatures (20, 40 and 60 °C) and four pH values (5.0, 6.0, 7.0 and 8.0). For each temperature, reagents were maintained for five min in a water bath. The pH values were achieved using appropriate

buffer solutions. In the XR analyses, NADH and NADPH were used separately as cofactors so that their specificities could be determined. To evaluate XR stability, the optimum pH value was used and extract samples were kept at -18, 4 and 38 °C. The samples at 4 and 38 °C were analyzed at intervals during five hours and the frozen samples were analyzed after 60 and 120 days. Kinetic parameters were studied by varying the substrate and the cofactor concentrations in the reaction mixtures of the analyses. Inhibition by the dyes Drimaren and Cibacron was studied by determining the XR kinetic parameters in the presence of different concentrations of these compounds with NADPH.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OPTIMAL ACTIVITY

The experimental design for the study of the optimal activities of XR and XD and the results obtained are shown in Table 3.1. Results of the analyses of NADH-dependent XR are not shown, since no activity could be detected using this cofactor.

A regression analysis of the results of the NADPH-dependent XR activity was carried out to fit a mathematical model to the experimental data in a search for an optimal region. This analysis allowed determination of a second-order polynomial model that describes the relation between XR activity and the pH and temperature. This model can be described by the following equation:

$$XR = 0.48 + 6.62E^{-3}X_1 - 4.80E^{-2}X_2 - 0.17*(X_1)^2 - 0.23*(X_2)^2 \quad [\text{Eq. 1}]$$

The F-test (ANOVA) was used to evaluate the statistical significance of the quadratic model equation and it revealed that this regression was statistically significant ($p < 0.01$) at a confidence level of 99% (Table 3.2). The correlation coefficient (R^2) of the model explains 87% of the variability in the response.

Table 3.1 – Experimental design for the study of the optimal activities of XR and XD

Assay	Levels of real variables		Levels of coded variables		Volumetric activity (U/mL)	
	pH	Temp. (°C)	X ₁ (pH)	X ₂ (Temp.)	XR	XD
1	5	20	-1	-1	0.103	0.010
2	8	20	+1	-1	0.165	0.286
3	5	60	-1	+1	0.069	0.010
4	8	60	+1	+1	0.010	0.010
5	6	20	-0.33	-1	0.330	0.010
6	7	20	+0.33	-1	0.203	0.189
7	6	60	-0.33	+1	0.305	0.010
8	7	60	+0.33	+1	0.036	0.010
9	5	40	-1	0	0.201	0.010
10	8	40	+1	0	0.368	0.324
11	6	40	-0.33	0	0.474	0.010
12	7	40	+0.33	0	0.473	0.291
13	7	40	+0.33	0	0.445	0.366
14	7	40	+0.33	0	0.440	0.242
15	7	40	+0.33	0	0.457	0.311
16	7	40	+0.33	0	0.520	0.328

XR – NADPH-dependent xylose reductase

The response surface determined by the model equation is shown in Figure 3.1. The maximum XR activity value predicted (0.48 U/mL) corresponded to the point for a pH of 6.5 and a temperature of 38 °C.

Table 3.2 – ANOVA for the model predicted for XR activity by the experimental design employing three levels of temperature and four levels of pH

Source	Sum of Squares	Degree of Freedom	Mean Square	F Value	Probability (p)
Model	0.40	4	0.100	17.67	< 0.0001
Residual	0.062	11	5635 E-3		
<i>Lack of Fit</i>	0.058	7	8261 E-3	7.95	0.0316
<i>Pure Error</i>	4.158 E-3	4	1040 E-3		
Correlation Total	0.46	15			

$$R^2 = 0.86$$

Listed F with confidence level of 95%: $F_{4,11} = 3.36$; $F_{7,4} = 6.09$

The regression analysis of the results of XD activity allowed adjustment of the following model (Eq. 2):

$$XD = 0.22 + 0.12 \cdot X_1 - 5.70E^{-2} \cdot X_2 - 0.15 \cdot (X_2)^2 \quad [\text{Eq. 2}]$$

The statistical significance of the adjusted model was evaluated by the *F*-test (ANOVA), which revealed that this regression is statistically significant ($p < 0.01$) at a confidence level of 99% (Table 3.3). The model did not show significant lack of fit and the correlation coefficient (R^2) explains 71% of the variability in the response.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA

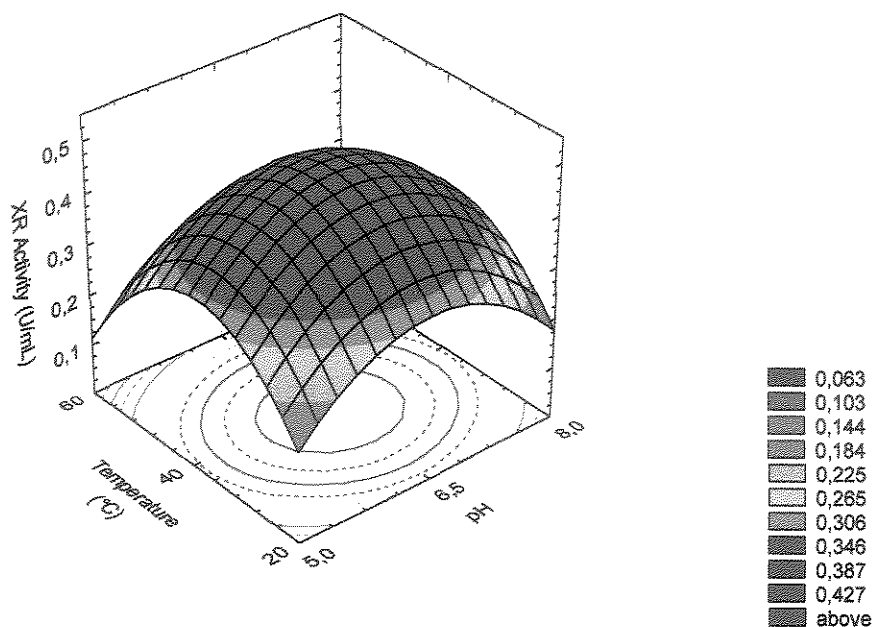


Figure 3.1 – Response surface plot for the optimal activity of NADPH-dependent XR obtained by the experimental design

Table 3.3 – ANOVA for the model predicted for XD activity by the experimental design

Source	Sum of Squares	Degree of Freedom	Mean Square	F Value	Probability (p)
Model	0.24	3	8.10E ⁻²	9.93	0.0014
Residual	9.80E ⁻²	12	8.15E ⁻³		
Lack of Fit	8.90E ⁻²	8	1.10E ⁻²	5.31	0.0622
Pure Error	8.42E ⁻³	4	2.10E ⁻³		
Correlation Total	0.34	15			

$$R^2 = 0.71$$

Listed F with confidence level of 95%: $F_{3,12} = 3.49$; $F_{8,4} = 6.04$

The response surface determined by the model equation is shown in Figure 3.2. The maximum predicted value for XD activity (0.34 U/mL) corresponded to the point for pH 8.0 and 36 °C.

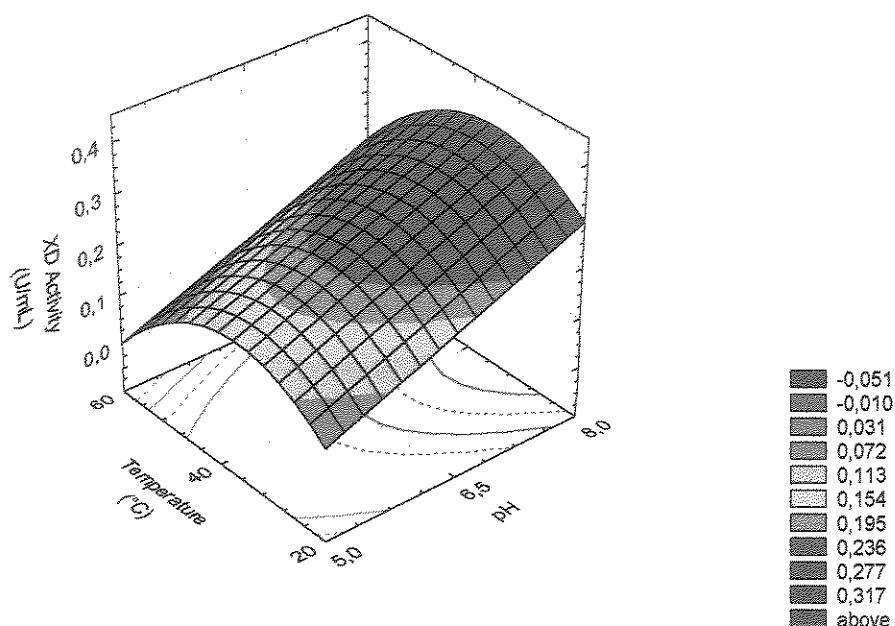


Figure 3.2 – Response surface plot for the optimal activity of XD obtained by the experimental design

Figure 3.3 shows the overlay plot of the response surfaces for XR and XD activities as a function of pH and temperature. This plot allows us to delimit a region of interest by establishing limits for both responses. In this way, a new working region (pH 6.5 and 38 °C) was determined, in which it is possible to obtain a higher XR activity as well as a higher XR:XD ratio than those obtained using the conditions indicated in the literature (pH 7.2 and 30 °C). Under the conditions predicted for the maximum XR activity (0.48 U/mL), the value predicted for the activity of XD is 0.22 U/ml, resulting in an XR:XD ratio of 2.2.

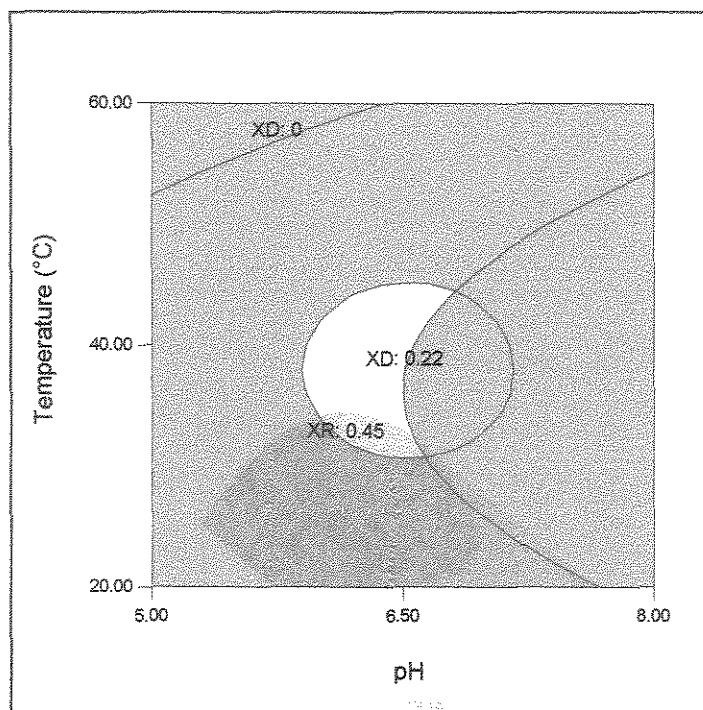


Figure 3.3 – Overlay plot of the response surfaces for XR and XD activities as a function of pH and temperature

3.2. XR STABILITY AT STORAGE AND HANDLING TEMPERATURES

Figure 3.4 shows the results of the XR stability study. The behavior of the enzyme was very similar at both 4 and 38 °C, remaining stable for 180 min. A slight variation within the analytical error previously determined (6.6%) can be observed. XR activity dropped to about 80% after 240 min and 50% after 300 min. The sample maintained at -18 °C remained stable immediately after thawing, but after 180 min at 4 °C, it showed a slight decrease in XR activity, which dropped to 90%.

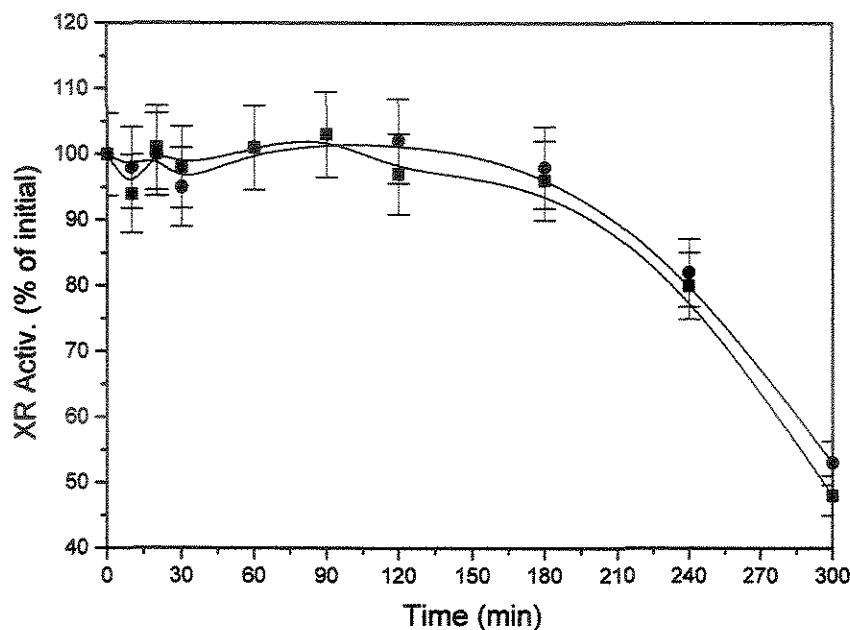


Figure 3.4 – Percentages of XR activity in extracts maintained at 4 °C (—●—) and 38 °C (—■—) as a function of time. Initial activity was taken as 100 %.

3.3. KINETIC PARAMETERS

Table 3.4 shows the results of the analyses of XR activity and total protein content of the cell extract and of the top and the bottom phases of the systems used for XR extraction.

Figure 3.5 shows the effect of xylose and NADPH concentration on the activity of the enzyme XR present in *Candida mogii* cell extract. As can be seen, the velocity of NADP formation increases with the increase in the concentrations of both substrates up to a certain point after which it tends to be constant. In fact, the rate of catalysis by enzymes varies with the substrate concentration so that a maximum value (V_{max}) is reached. Linear methods are used for determining the V_{max} and the Michaelis Constant

(K_m) in enzymatic catalysis. The Michaelis constant represents the concentration at which the velocity is at half the maximum. This parameter indicates the affinity of the enzyme for the substrate and can be used to compare different enzymes that catalyze the same reaction.

Table 3.4 – Characterization of the cell extract and the top and the bottom phases of the ATPS used for XR extraction

Sample	XR Activity (U/mL)	Total Protein (mg/mL)
Cell extract	0.496	1.22
Top Phase	0.226	0.294
Bottom Phase	0.011	0.338

* Analyses carried out using conditions described in item 2.5

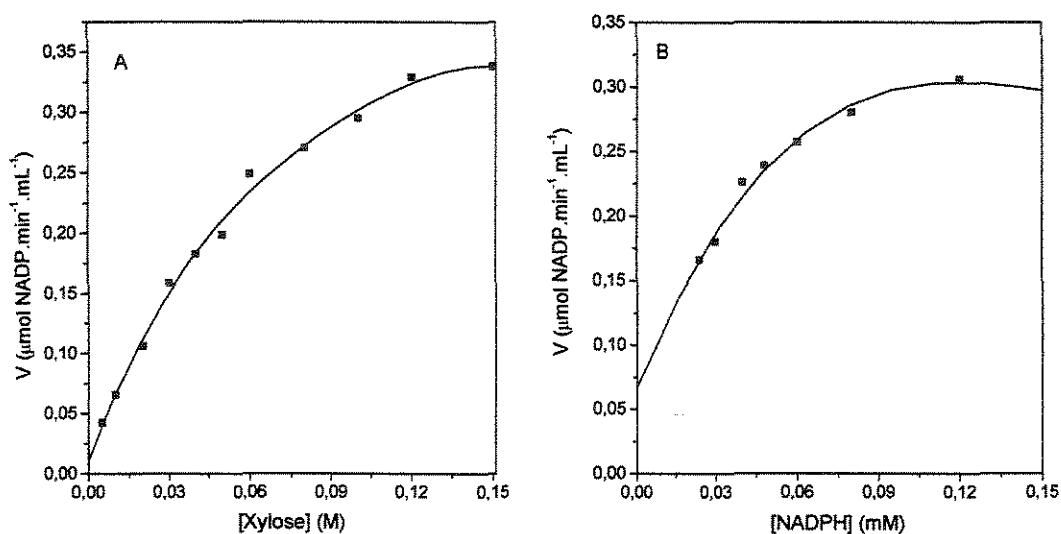


Figure 3.5 – Effect of xylose (A) and NADPH (B) concentrations on XR activity expressed as initial rate of NADP formation

The Lineweaver-Burk plot was used to determine the XR kinetic constants with xylose and NADPH, as shown in Figure 3.6. The Lineweaver-Burk method allows us to determine the K_m and the V_{max} by plotting the double reciprocal of the velocity of the reaction and substrate concentration, thus obtaining a straight line where the slope is equal to K_m/V_{max} and the y-intercept is equal to $-1/V_{max}$.

The kinetic parameters determined in the present work were compared with results found in the literature for different yeast strains (Table 3.5). According to our results, *Candida mogii* had a higher specificity for both xylose and NADPH than the yeasts *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*, since its K_m values (63 mM and 0.032 mM) were the lowest for both substrates (xylose and NADPH, respectively). The V_{max} values found for *Candida mogii* XR were 0.485 and 0.390 U/mL for xylose and NADPH, respectively.

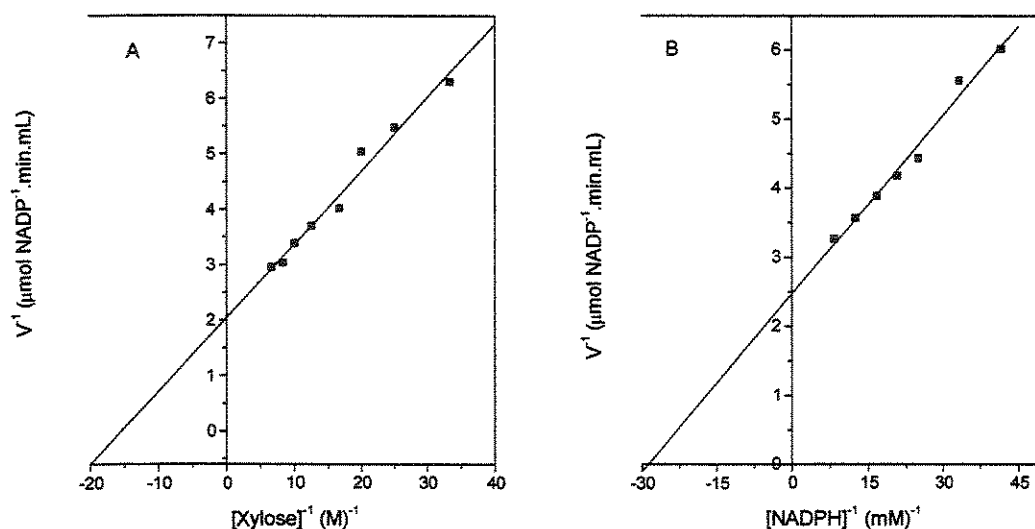


Figure 3.6 – Lineweaver-Burk double reciprocal plots for XR with xylose (A) and NADPH (B)

Table 3.5 – Kinetic parameters for the enzyme XR from different yeast strains

Yeast	K _m constant (mM)	
	Xylose	NADPH
<i>Candida mogii</i> ^a	63	0.032
<i>C. mogii</i> (XR extracted in ATPS) ^a		
<i>Candida mogii</i> ^b		
<i>Candida guilliermondii</i> ^c	180	-
<i>Pachysolen tannophilus</i> ^d	162	0.059

^a This work^b Sirisansaneeyakul *et al* (13)^c Silva *et al.* (14)^d Ditzelmüller *et al.* (15)

The effect of the initial substrate concentration on the activity of the XR present in the top phase of a material purified in an aqueous two-phase system was also studied (Figure 3.7). The values for K_m and V_{max} calculated using the Lineweaver-Burk plot were respectively 65 mM and 0.247 U/mL. The dilution of the enzyme in the ATPS could explain the reduction of the V_{max} observed, since this parameter is dependent on enzyme concentration.

The kinetics of inhibition of XR activity by the textile dyes Drimaren Vm Br A-4G and Cibacron Blue F-3G was studied by determining the kinetic parameters of XR with NADPH in the presence of different concentrations of the dyes. Figure 3.8 shows the profiles for the velocity of product formation and Figure 3.9 shows the Lineweaver-Burk plots for these profiles.

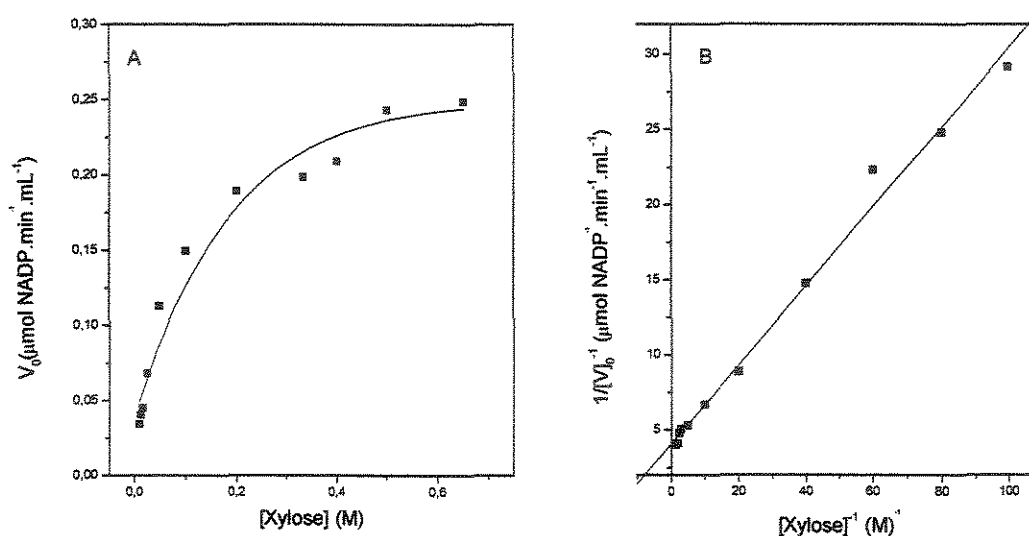


Figure 3.7 – Effect of xylose concentration on XR activity (A) and Lineweaver-Burk plot (B) of the top phase of an ATPS used for XR extraction

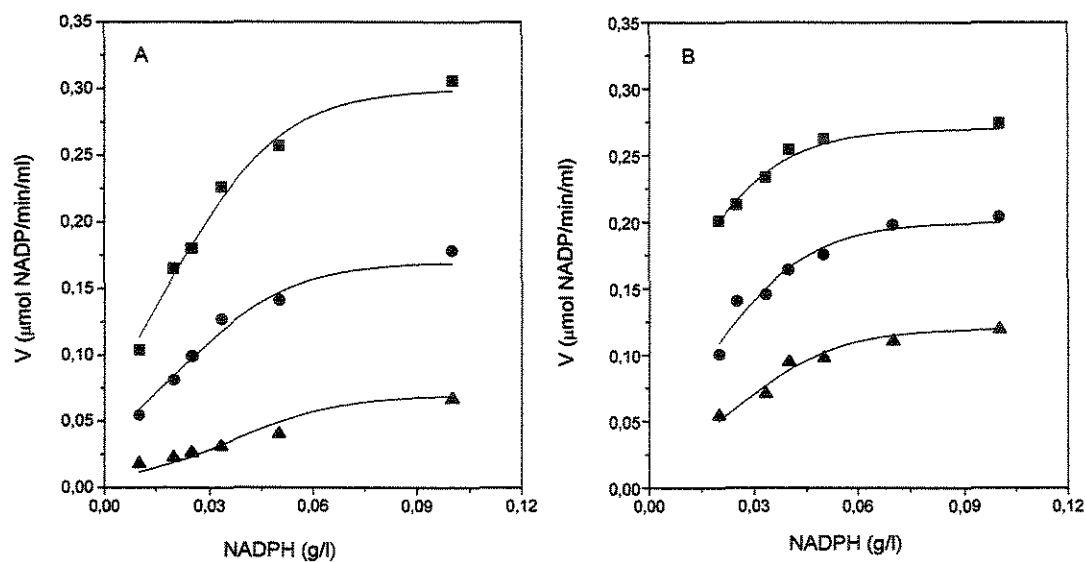


Figure 3.8 – Effect of NADPH concentration on the initial rate of NADP formation in the presence of different concentrations of the dyes Drimaren (A) and Cibacron (B): 0.01 g/l (▲), 0.0025 g/l (●) or without dye (■).

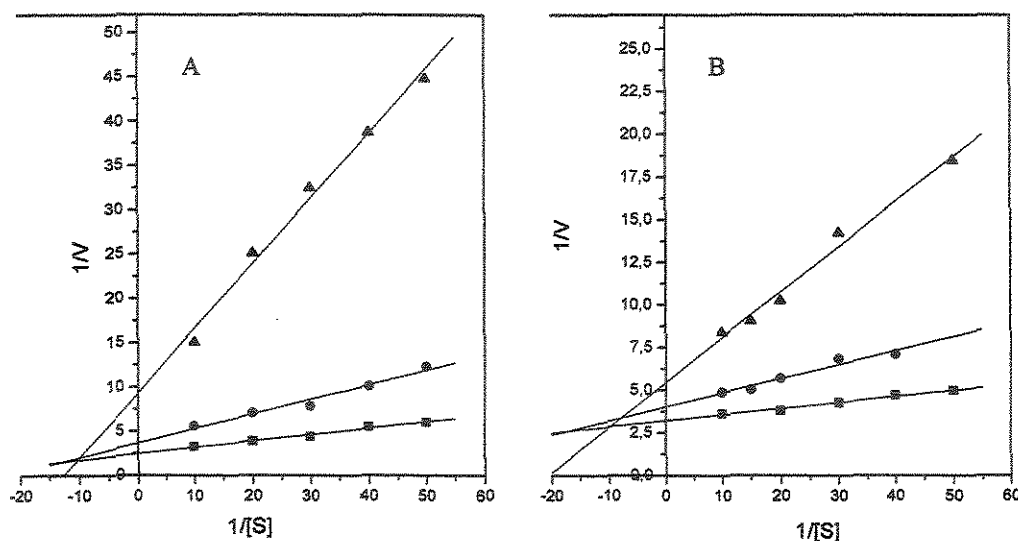


Figure 3.9 – Lineweaver-Burk plots for the initial rates of NADP formation with NADPH in the presence of different concentrations of the dyes Drimaren (A) and Cibacron (B): 0.01 g/l (▲), 0.0025 g/l (●) or without dye (■).

Lineweaver-Burk plots were used to calculate the value of $V_{\max}$ for each dye concentration (Table 3.6). For both dyes, the $V_{\max}$ decreased with the increase in the concentration of the inhibitor, which indicates that the inhibition of XR activity by these dyes is noncompetitive with the cofactor NADPH. The values of K_i for Drimaren and Cibacron were 1.34×10^{-3} and 1.27×10^{-4} , respectively.

Table 3.6 – Variation in the $V_{\max}$ of XR with different concentrations of the inhibitors Drimaren and Cibacron

XR $V_{\max}$	Dye Concentration (g/g)		
	0	0.0025	0.011
Drimaren	0.41	0.27	0.11
Cibacron	0.41	0.35	0.19

4. CONCLUSIONS

This study allowed us to determine the optimal conditions for XR activity and to minimize the XD activity simultaneously. As a result, the best conditions established were pH 6.5 and 38 °C. XR was shown to be exclusively NADPH-dependent under the conditions employed for cultivation and handling. The period of time in which XR can be used or stored at both 4 and 38 °C without loss of activity is three hours, which is quite adequate for most protein purification processes. Values of Vmax and Km determined for XR were 0.485 U/mL and 63 mM for the substrate xylose and 0.390 U/mL and 0.032 mM for the cofactor NADPH. These results showed the high specificity of this enzyme for xylose and NADPH when compared with other yeast strains. A noncompetitive inhibition of the enzyme by the dyes Drimaren Vm Br A4-G and Cibacron Blue F-3G was also evident.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the contribution of Maria Eunice M. Coelho in revising this paper. Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brazil are also acknowledged.

References

1. Chiang, C., Knight, S.G. Metabolism of D-xylose by moulds. *Nature*, 188, 79-81, 1960.
2. Bolen, P.L., Roth, K.A. and Freer, S.N. Affinity purifications of aldose reductase and xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 660-664, 1986.

3. Ho, N.W.Y., Lin, F.P., Huang, S., Andrews, P.C., Tsao, G.T. Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 33-39, 1990.
4. Kern, M., Haltrich, D., Nidetzky B., Kulbe, D.K. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. *FEMS Microbiol. Lett.*, 149, 31-37, 1997.
5. Hyvönen, L., Koivistoinen, P. Food technological evaluation of xylitol. *P. Adv. Food Res.*, 28, 373-403, 1982.
6. Bolen, P.L., Roth, K.A., Freer, S.N. Affinity purifications of aldose reductase and xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 660-664, 1986.
7. Cortez, E.V., Felipe, M.G.A., Roberto, I.C., Pessoa Jr, A., Vitolo, M. Extraction by reversed micelles of the intracellular enzyme xylose reductase. *Appl. Biochem. Biotech.*, 91/93, 753-759, 2001.
8. Scopes, R.K. *Protein purification: principles and practice*, Springer-Verlag, 1994.
9. Mayerhoff, Z.D.V.L., Roberto, I.C., Silva, S.S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnol. Lett.*, 19, 407-409, 1997.
10. Hermansson, G.T., Mallia, K., Smith, P.K. *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego: Academic Press, Inc. 1992.
11. Clonis, Y.D., Labrou, N.E., Kotsira, V.Ph., Mazitsos, C., Melissis, S., Gogolas, G. Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification. *J. Chromatogr. A*, 891, 33-44, 2000.
12. Kopperschläger, G., Kirchberger, J. Dye ligand partitioning of proteins. In: Hatti-Kaul, R. *Aqueous Two-Phase Systems. Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. 2000.
13. SIRISANSANEEYAKUL, S., STANISZEWSKI, M., RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 6, 565-570, 1995.

14. 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*. *J. Basic Microbiol.*, 36, 3, 187-191, 1996.
15. Ditzelmüller, G., Kubicek, C.P., Wöhrer, W., Röhr, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. *Can. J. Microbiol.*, 30, 1330-1336, 1984.

CAPÍTULO 4

Este capítulo apresenta o estudo de rompimento celular de *Candida mogii* para a liberação da XR. O estudo foi conduzido em moinho de esferas de vidro, empregando as variáveis diâmetro das esferas, número de ciclos de agitação e concentração da suspensão celular. Os resultados obtidos são comparados aos resultados de rompimento por ultra-som, realizado em condições previamente estabelecidas, para a escolha do método a ser empregado nos estudos subseqüentes.

Este trabalho será submetido para publicação em periódico especializado.

**DEVELOPMENT OF THE CONDITIONS FOR XYLOSE REDUCTASE RELEASE BY
Candida mogii CELL DISRUPTION**

^{1,2}Zea D.V.L. Mayerhoff, ²Inês C. Roberto, ¹Telma T. Franco

¹School of Chemical Engineering, State University of Campinas – P.O. Box 6866,
13081-970, Campinas/SP, Brazil

²School of Chemical Engineering of Lorena – P.O. Box 116, 12600-970, Lorena/SP,
Brazil

ABSTRACT

The release of xylose reductase (XR) from *Candida mogii* by cell disruption in a glass beads mill was studied using an experimental design. Statistical analysis of the results indicated that XR volumetric activity increases by using a smaller glass bead diameter and a lower cell concentration and by increasing the number of agitation cycles. The highest volumetric activity (0.683 U/mL) was found using 300 µm glass beads, a cell concentration of 45 g/L and 50 cycles. Disruption with glass beads was shown to be the most efficient method for XR release when compared to the sonication process. The highest specific activity (0.175 U/mg of protein) was found in extracts obtained by suspension freezing and thawing, which suggests that this method can be used as a selective process of cell disruption for XR release.

1. INTRODUCTION

Various biomolecules of industrial interest are concentrated intracellularly. In such cases, disruption of the cellular wall is a mandatory step prior to product recovery and purification. Disruption may be achieved by mechanical, chemical or enzymatic methods, although in large-scale processing the mechanical method is generally employed (1).

Xylose reductase (XR) is the enzyme responsible for the first step of xylose metabolism in yeasts, catalyzing the reduction of xylose into xylitol (2). Xylitol is a polyol of economical interest that can be used as a dietetic and anticariogenic sweetener. Currently, it is produced by a chemical process, although several biotechnological studies (3,4) have been carried out in the last few years to develop alternative technologies for its production (microbiological and enzymatic). The feasibility of xylitol attainment by an enzymatic process requires primarily the optimization of the conditions for obtaining and recovering the enzyme XR that will be used as the catalyst. The purification and characterization of intracellular XR have been studied (5,6), and of the different techniques used for cell disruption aiming to release XR, mechanical methods, such as agitation with glass beads, sonication and high-pressure homogenization, have been the most frequently utilized (5,7,8).

Suitable conditions for disruption of *Candida mogii* cells employing a glass bead mill were pursued in this work, aiming at XR release. The influences of three variables (diameter of glass beads, concentration of cell suspension and number of cycles used for agitation) were evaluated using an experimental design. Based on the results, a wider range of number of cycles was studied using a fixed bead diameter and a fixed cell concentration. Results of disruption were evaluated by comparing processes using glass beads and ultrasound under conditions previously established in our laboratory.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. CULTIVATION OF THE MICROORGANISM

Candida mogii NRRL Y-17032 was obtained from the Northern Regional Research Laboratory (Peoria, IL) and was kept at 4°C in glucose agar slants. The cultivation medium consisted in rice straw hemicellulosic hydrolysate diluted with distilled water up to an initial xylose concentration of 50 g/L. The cells were cultivated for 48 h either in a 7L-fermentor (Bioflo III – New Brunswick Scientific Co.) containing 5L of medium (temperature of 30 °C, aeration rate of 0.4 vvm and rotation of 400 rpm) or in a rotary shaker using Erlenmeyer flasks and a flask volume-to-medium volume ratio of 5:1 (200 rpm and 30 °C). In both cases, the initial cell concentration was 1g/L.

2.2. PREPARATION OF CELL SUSPENSION

Cells were harvested by centrifugation at 1100 x g, washed with 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.2), centrifuged, resuspended with the same volume of the buffer and stored at -18 °C. Before disruption, they were thawed and diluted to concentrations established for each assay.

2.3. DISRUPTION OF CELLS

Cells were disrupted in a 60 mL jacketed mill (Figure 4.1), filled with 30 mL of glass beads (300, 500 and 700 µm diameter) and 20 mL of cell suspension. The beads were agitated by four slitted disks mounted on a drive shaft in the centric position by a 100W electrical motor and the cells were disrupted by 10 s agitation cycles with 20 s intervals. The mill was cooled made by circulating ethylene glycol solution at -5 °C

through the jacket. A Sonics disruptor (60 Hz frequency, 1s cycles 1 s intervals) was used for disrupting 3 mL of suspension containing 15 g of cells/L during 35 min. The disrupted suspensions were centrifuged for 10 min, at 4 °C and 6000 x g and the supernatants were analyzed.

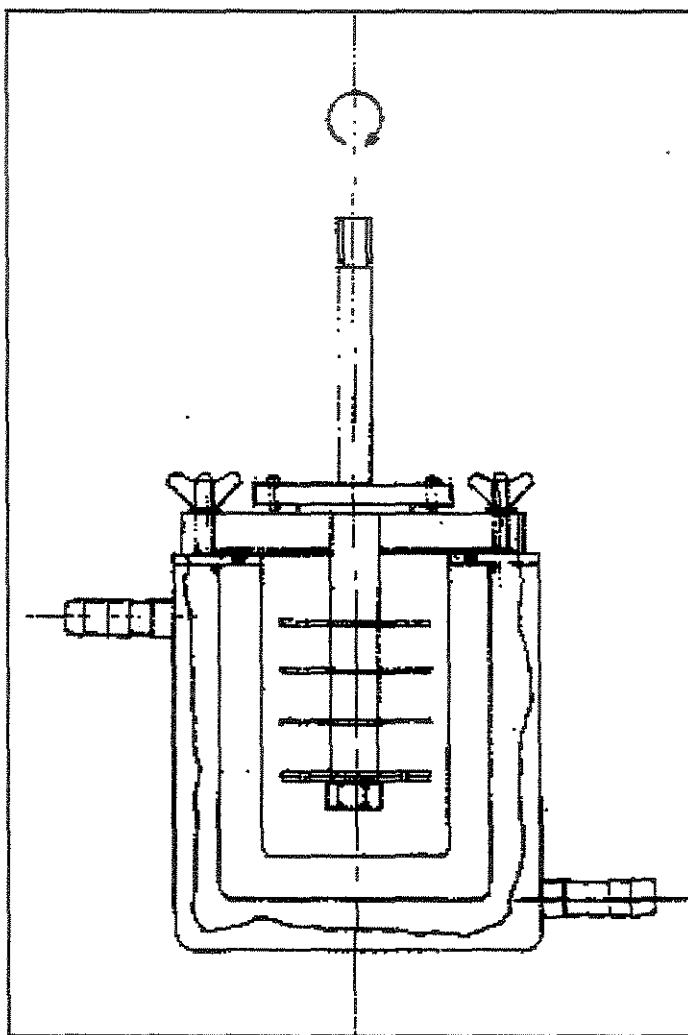


Figure 4.1 – Schematic drawing of the reactor used for cell disruption with glass beads

2.4. DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY

XR activity was determined through oxidation of the coenzyme (NADPH) by the change in absorbance at 340 nm and 38°C. Assays were run in a 1-mL cuvette containing 50 μ l 1 M phosphate buffer, pH 6.5; 100 μ l 0.1 M mercaptoethanol; 100 μ l 1.2 mM NADPH; 100 μ l 0.5 M D-xylose and 650 μ l diluted sample. The reaction was started up by the addition of D-xylose. Total protein concentration was determined by a colorimetric method using bovine serum albumin as the standard (9). One unit of XR activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 μ mol of NADPH per minute.

2.5. EXPERIMENTAL DESIGN

Assays were carried out according to a 2^3 factorial design with five repetitions at the central point (Table 4.1). The variables diameter of glass beads (300, 500 and 700 μ m), number of cycles (24, 42 and 60) and cell concentration (36, 63 and 90 g/L) were represented by coded levels (+1, 0 and -1, respectively).

3. RESULTS

The experimental design to study the influence of the variables on the disruption of *Candida mogii* used cells cultivated in a bench fermentor. XR volumetric activity is shown in Table 4.2. As can be seen, the highest value of XR activity (0.15 U/mL) was obtained in assays using the smallest diameter of glass beads (300 μ m) and the highest number of cycles (60), independently of the concentration of the cell suspension used.

A Pareto chart was used to perform a statistical analysis of the experimental data. Figure 4.2 shows the calculated effects on XR activity in decreasing order of magnitude. The length of each bar is proportional to the standardized effect. Bars extending beyond

the vertical line correspond to effects which were statistically significant at a confidence level of 95%. It can be observed that the interactions between the variables number of cycles and cell concentration (BxC) and between glass bead diameter and cell concentration (AxC) had the highest effects, which were significant at a confidence level of 95%. The variable cell concentration had a main effect significant at a confidence level of 90%.

Table 4.1 – 2³ factorial design of the study of *C. mogii* cell disruption for XR release

Assay	Coded levels			Actual values			Activity (U/mL)
	Ø Beads (A)	No. Cycles (B)	Cell Conc. (C)	Ø Beads (µm)	No. Cycles	Cell Conc. (g/L)	
1	-1	-1	-1	300	24	36	0.10
2	+1	-1	-1	700	24	36	0.05
3	-1	+1	-1	300	60	36	0.15
4	+1	+1	-1	700	60	36	0.02
5	-1	-1	+1	300	24	90	0.02
6	+1	-1	+1	700	24	90	0.10
7	-1	+1	+1	300	60	90	0.15
8	+1	+1	+1	700	60	90	0.09
9	0	0	0	500	42	63	0.09
10	0	0	0	500	42	63	0.06
11	0	0	0	500	42	63	0.03
12	0	0	0	500	42	63	0.05
13	0	0	0	500	42	63	0.03

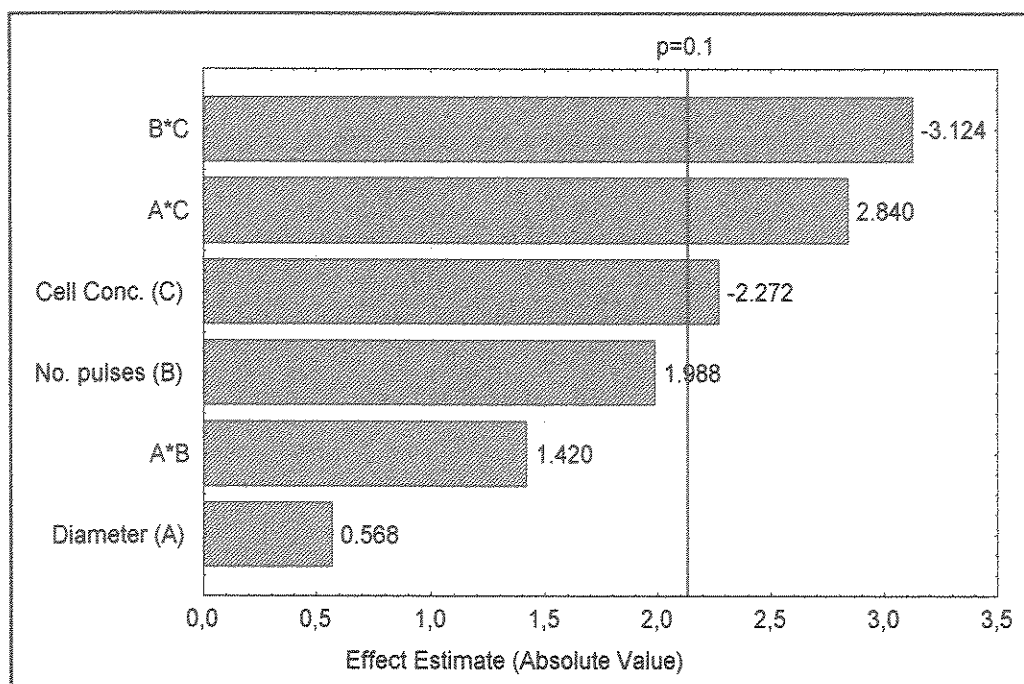


Figure 4.2 – Pareto chart for the study of *Candida mogii* cell disruption

The negative effect of interaction BxC indicates that the highest value of activity can be achieved by increasing the values of one variable and decreasing the values of the other. Considering the significant negative main effect of cell concentration (C), this variable was set at the lowest level whereas the number of cycles (B) was at the highest level. In the same way, the positive effect of interaction AxC indicates that the simultaneous reduction in the values of both variables led to an increase in XR activity, since the main effect of bead diameter was negative. In fact, the dependence of the efficiency of cell disruption on bead size and yeast concentration had already been reported by Currie *et al.* (10). According to these authors, cell disruption with small beads was more efficient with a 30 % yeast slurry than with cell concentrations above 60 %. This reduced efficiency is associated with the effect of small glass beads floating at high yeast concentrations.

Based on the results obtained from the experimental design, other assays were carried out aiming at the optimization of XR release by *Candida mogii* cell disruption.

Cells cultivated in agitated flasks were disrupted by varying the number of cycles from 0 to 60, while the glass beads diameter was fixed at the lowest value (300 μm) and the concentration of cell suspension was also fixed at a value near the minimum studied (45 g/L). The results expressed as volumetric and specific activities are shown in Figure 4.3.

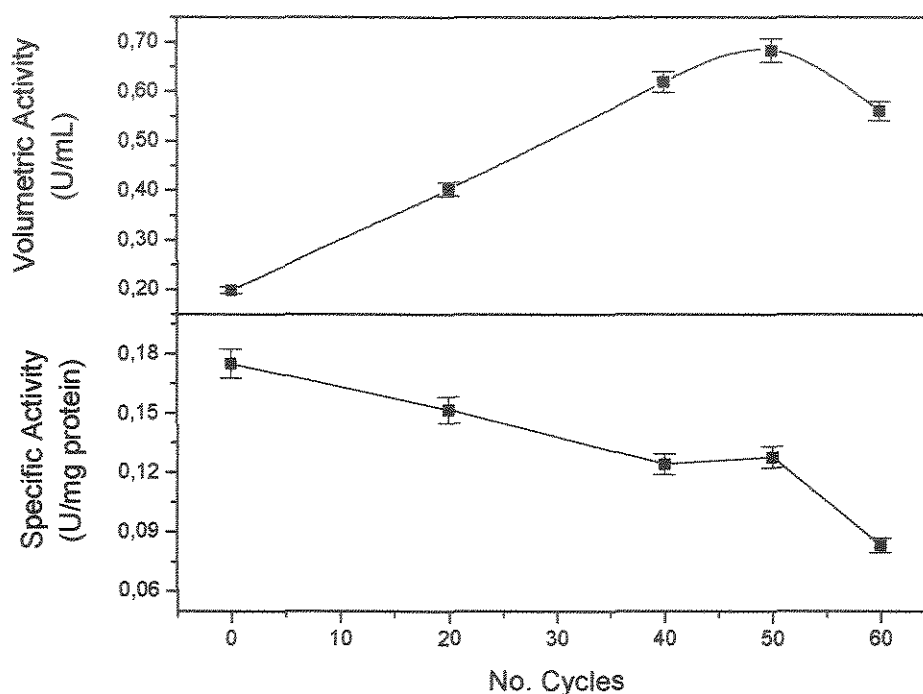


Figure 4.3 – Effect of number of cycles on *Candida mogii* cell disruption with glass beads; (A) XR volumetric activity; (B) XR specific activity

The highest value of volumetric activity was detected in the assays using glass beads agitated with 50 cycles (0.683 U/mL). In the cell extract obtained by centrifuging a suspension that has not been disrupted, a low XR volumetric activity (0.20 U/mL) was detected, probably due to the suspension freezing and thawing process.

A linear correlation between number of cycles and volumetric activity can be observed in the assays using up to 50 cycles (Figure 4.3). Extracts from assays using 60

cycles were turbid, which might have interfered with the determination of XR activity. Attempts to eliminate this turbidity by enhancing the centrifugation force produced no effect. Therefore, the highest value of activity considered was that of the extract obtained by disruption with 50 cycles.

A downward trend is shown for XR specific activity by the increasing number of cycles (Figure 4.3). In the range of 0-50 cycles, the specific activity dropped from 0.175 to 0.128 U/mg of protein. For the purpose of evaluating the disruption process for XR release, this decrease in specific activity (28%) is not significant when compared to the gain in volumetric activity (245%) observed for the same range of cycles.

The results of XR release by disruption of *Candida mogii* cells using glass beads, freezing and thawing and sonication are shown in Table 4.2. Cells disrupted by sonication were also cultivated in agitated flasks.

Table 4.2 – XR activity in *Candida mogii* cell extracts obtained by employing different disruption processes

Disruption Process	Suspension Volume (mL)	Cell Conc.(g/L)	Vol. Activity (U/mL)	Spec. Activity (U/mg pt)
Bead agitation*	20	45	0.683	0.128
Freezing and thawing**	20	45	0.198	0.175
Sonication***	3	15	0.172	0.030

* glass bead diameter of 300 μ m and 50 agitation cycles

** storage for 3 days at -18°C

*** 1 s 60 Hz frequency cycles with 1s intervals during 35 min

Disruption with glass beads showed the highest level of efficiency for XR volumetric activity and a high specific activity when compared with the sonication process. Although some authors report on the disruption of yeast cells by sonication for the release of XR (6,8,11), this process is frequently used for the disruption of bacterial cells. In fact, in the case of yeast cells this method has shown low efficiency, as

observed by Becker *et al.* (12), who reported that the best method for extraction of β -galactosidase was disruption with glass beads.

The highest specific activity, observed in the extract disrupted by freezing/thawing, suggests that this can be used as a selective process of cell disruption for XR release. The efficiency of this method in releasing enzymes was reported by Burns *et al.* (13), who adopted the freeze/thaw method for cell lysis when studying the activity of an aspartate carbamoyltransferase from *Helicobacter pylori*. According to these authors, it is in the cell envelope and to have minimal effects on its overall integrity, ensuring little shearing of membrane-bound proteins and good recovery of soluble proteins.

4. CONCLUSION

The study of the release of XR from *Candida mogii* by disruption with glass beads showed the dependence of the volumetric activity on the interactions between the variables glass bead diameter and cell concentration and between the variables glass bead diameter and number of agitation cycles. Statistical analysis indicated that this response increases when a small glass bead diameter and a low cell concentration are used with an increased number of cycles. The highest volumetric activity (0.683 U/mL) was found when 300 μ m glass beads, a cell concentration of 45 g/L and 50 cycles were used. A comparison of three processes of *Candida mogii* disruption for XR release showed the highest bead mill efficiency for both XR volumetric and XR specific activities. The highest specific activity (0.175 U/mg of protein) was detected in extracts obtained by freezing and thawing the cell suspension. It is suggested that optimization of the freezing/thawing process could lead to a selective disruption of *Candida mogii* cells for XR release.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the assistance of Maria Eunice M. Coelho in revising this paper. The financial support received from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brazil is also acknowledged.

References

1. Middelberg, A.P.J., O'Neil, B.K., Bogle, I.D.L. A new model for the disruption of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization. Part I. Model development and verification. *Trans IchemE*, 70, Part C, 205-211, 1992.
2. Chiang, C., Knight, S.G. Metabolism of the D-xylose by moulds. *Nature*, v. 188, 79-81, 1960.
3. Parajó, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Biores. Technol.*, 65, 191-201, 1998.
4. Mayerhoff, Z.D.V.L., Roberto, I.C., Silva, S.S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnol. Lett.*, 19, 407-409, 1997.
5. Bolen, P.L., Kelly, A.R., Freer, S.N. Affinity purifications of aldose reductase and xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 660-664, 1986.
6. Cortez, E.V., Roberto, I.C., Pessoa Jr., A., Vitolo, M. Extraction by reversed micelles of the intracellular enzyme xylose reductase *Appl. Biochem. Biotech.*, 91-93, 753-759, 2001.

7. Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A., Prior, B.A. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1580-1585, 1995.
8. Sene, L., Vitolo, M., Felipe, M.G.A., Silva, S.S. Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotech.*, 84/86, 371-380, 2000.
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
10. Currie, J.A., Dunnill, P., Lilly, M.D. Release of protein from bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator Mill. *Biotechnol. Bioeng.*, 14, 725-736, 1972.
11. Ditzelmüller, G., Kubicek, C.P., Wöhrer, W., Röhr, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. *Can. J. Microbiol.*, 30, 1330-1336, 1984.
12. Becker, J.M., Caldwell, G.A., Zachgo, E.A. *Biotechnology A laboratory course*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1996. 261 p.
13. Burns, B.P., Mendz, G.L. , Hazell, S.L. *In situ* properties of *Helicobacter pylori* aspartate carbamoyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 347, 119-125, 1997.

CAPÍTULO 5

Neste capítulo, está apresentado o estudo para a purificação da XR em sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Inicialmente, foi estudada a influência das variáveis massa molar do polímero [PEG], concentração do PEG, concentração de fosfato de potássio e concentração de NaCl sobre a extração da XR, utilizando um planejamento fatorial 2^4 . Com base nos resultados obtidos, um novo estudo para a extração da XR foi realizado, de acordo com um segundo planejamento experimental, no qual uma nova faixa para a variável massa molar do PEG foi avaliada, e no qual as concentrações dos componentes dos sistemas foram estudadas através do comprimento das linhas de amarração.

Os comprimentos das linhas de amarração e a metodologia empregada para a sua determinação estão apresentados em anexo inserido no final desta tese.

Este trabalho foi publicado parcialmente nos Anais do 1º Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia.

PURIFICATION OF XYLOSE REDUCTASE FROM *Candida mogii* IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

¹Zea D.V.L. Mayerhoff, ²Inês C. Roberto* & ¹Telma T. Franco

¹School of Chemical Engineering– State University of Campinas – Campinas/SP - Brazil

² School of Chemical Engineering of Lorena – Lorena/SP – Brazil - Fax No. 55 12 5533165

ABSTRACT

Xylose reductase (XR) from *Candida mogii* was extracted by partitioning in aqueous two-phase systems (ATPS) composed of polyethylene glycol (PEG) and phosphate salts. An experimental design was used to evaluate the influence of the variables molar mass of PEG (A), concentration of PEG (B), concentration of phosphate (C), and concentration of NaCl (D) on XR extraction. The positive effect of variable B and the negative effect of A and of the interaction between A and B on the purification factor in the top phase (PF_T) indicated that a simultaneous increase in PEG concentration with a decrease in molar mass of PEG leads to an increase in that response. Phosphate concentration also had a negative effect, indicating an increase in PF_T with a decrease in its value. A linear model fitted to the data indicated the need to change the ranges of the variables. In a second experimental design, the influence of a lower range of PEG molar mass (MMPEG) and of tie-line length (TLL) on the partitioning of XR was studied. Quadratic models were predicted for the responses purification factor in the top phase and XR yield in the top phase (Y_T), and the maximum values predicted by these models were 1.59 ± 0.40 and $105.8 \pm 26.2\%$, respectively. A 19-fold increase of the selectivity factor was experimentally achieved for a system with PEG 1000 and TLL 34. Values of K, PF_T and Y_T of respectively 21.21, 1.89 and 103.5 were also obtained at these experimental conditions.

1. INTRODUCTION

Aqueous two-phase systems (ATPSs) have been widely used in biochemical research for the separation and purification of macromolecules, cells and cell particles. ATPSs have also been employed in several fields of the biotechnological industry for full-scale enzyme purification, in purification of interferon, and extractive bioconversions (1). This technique is considered potentially attractive for the obtainment of industrial enzymes, due its ease of scale-up, low material cost, and minimization of denaturation of the proteins, among other advantages (2). In order to achieve a high yield, recovery, and also a good purification factor for a target protein, a composition for the ATPS has to be selected to quantitatively extract the desirable protein from one of the phases with minimal concentration of contaminant molecules (3). In this sense, top and bottom phases components or the length of the corresponding tie line, and the use of additives (salts or organic compounds) are among the factors cited as controlling phase partitioning (4).

Conversion of xylose from agroindustrial residues into xylitol through biotechnological pathways as an economical alternative to the chemical process currently used has been extensively studied (5,6,7). The obtainment of the enzyme xylose reductase (XR) is an essential step in the development of the enzymatic process for this bioconversion. This enzyme is present in different species of yeasts and is responsible for the process of oxidation of xylose into xylitol by these microorganisms (8). A comparison between the enzymatic and fermentative processes for xylitol production shows a potential increase in yield and productivity with the former, due to the lack of the following metabolic steps and the reduction in mass transfer limitations, respectively (9). Xylitol has been highly valued by the pharmaceutical and food industries, among others, due to its sweetening and dietetic and anticariogenic properties (10).

The response surface methodology (RSM) was employed to optimize the conditions for extraction of the enzyme XR from the yeast *Candida mogii* by partitioning in PEG/salt ATPS. Initially, a 2^4 factorial design was used to evaluate the influence of the variables molar mass of PEG, concentration of PEG, concentration of phosphate,

and concentration of NaCl (design no. 1). In a second step a 2^2 central composite design was employed to study the extraction parameters as function of the molar mass of PEG (MMPEG) and the tie-line length (TLL) of the systems (design no. 2). For employment of the variable TLL, the binodal curves and the tie lines of the ATPS were determined.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. CULTIVATION OF THE MICROORGANISM

Candida mogii NRRL Y-17032, obtained from the Northern Regional Research Laboratory (Peoria, Ill.), was kept at 4 °C on glucose agar slants. It was selected from 31 yeast strains as a good producer of xylitol in rice straw hemicellulosic hydrolysate (11). Cells were cultivated in this medium under previously established conditions (12).

2.2. OBTAINMENT OF CELL HOMOGENATE

After cultivation, the cells were harvested by centrifugation at 1100 x g, washed with 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5, centrifuged and resuspended in the same buffer, resulting in a cell suspension at 25 % (v/v). This suspension was disrupted mechanically in a 60 mL cooling jacketed mill, containing 30 mL of glass beads with a 300 µm diameter and 20 mL of cell suspension with dry weight of 40 g/L. Beads were stirred with fifty 10s cycles produced by a coupled motor. The suspension was continuously cooled by circulating ethylene glycol solution at -5 °C in the jacket.

2.3. OBTAINMENT OF CELL-FREE EXTRACT

The cell-free extract was obtained by centrifuging the cell homogenate at 6000 x g, 4 °C.

2.4. PREPARATION OF AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

Ten-gram systems were prepared by weighing stock solutions of the phase-forming components and solid NaCl in flasks to reach the final concentrations determined for each assay (Tables 5.1 and 5.2). A phosphate potassium buffer, pH 6.5, was used as the salt component in design no. 1, and a sodium/potassium phosphate buffer, pH 6.5, was used in design no. 2. In design no. 1, the homogenate was added to complete the final mass, whereas in design no. 2, aliquots of 2 mL of cell extract were added to each assay and the final mass was reached with deionized water. The systems were stirred in magnetic stirrer and after thorough homogenization, transferred to graduated centrifuge tubes. The phases were then separated by centrifugation at $1600 \times g$, for 5 min.

2.5. DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY

The activities of XR were determined through the oxidation of the coenzyme (NADPH) by the change of absorbance at 340 nm at 38°C. Assays were run in a 1-mL cuvette containing 50 μ l 1 M phosphate buffer, pH 6.5; 100 μ l 0.1 M mercaptoethanol; 100 μ l 1.2 mM NADPH; 100 μ l 0.5 M D-xylose and 650 μ l diluted sample. The reaction was started up by the addition of D-xylose. Total proteins concentration was determined by a colorimetric method using bovine serum albumin as the standard. One unit of XR activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 μ mol of NADPH per minute.

2.6. ELECTROPHORESIS

SDS electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in 12% homogeneous gel (13). The gel was stained with silver nitrate, and the molar mass (M_r) markers were bovine albumin (66 kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic

anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), soybean trypsin inhibitor (20 kDa) and α -lactalbumin (14 kDa) available as a standard kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, U.S.A.)

2.7. DETERMINATION OF THE TIE LINE LENGTHS

The binodal curves and the tie lines of the systems composed of PEG and sodium/potassium phosphate were determined according to the method described by Snyder *et al* (14), and are shown in Figure 5.1. The tie-line lengths were calculated by using the following equation:

$$TLL = \sqrt{(P_S - P_I)^2 + (F_S - F_I)^2}$$

where TLL is the tie-line length; P_T is the concentration of PEG in the top phase; P_B is the concentration of PEG in the bottom phase; S_T is the concentration of salt in the top phase; and S_B is the concentration of salt in the bottom phase.

The compositions of the systems corresponding to the tie lines used in the experimental design no. 2 are shown in Table 5.1.

2.8. EXPERIMENTAL DESIGNS

The influence of the variables molar mass of PEG, concentration of PEG, concentration of phosphate and concentration of NaCl was evaluated according to a 2^4 factorial design with 4 repetitions at the central point (Table 5.2). In a second step, a 2^2 central composite design was employed to optimize the extraction parameters as a function of the molar mass of PEG (MMPEG) and the tie-line length (TLL) of the systems (Table 5.3).

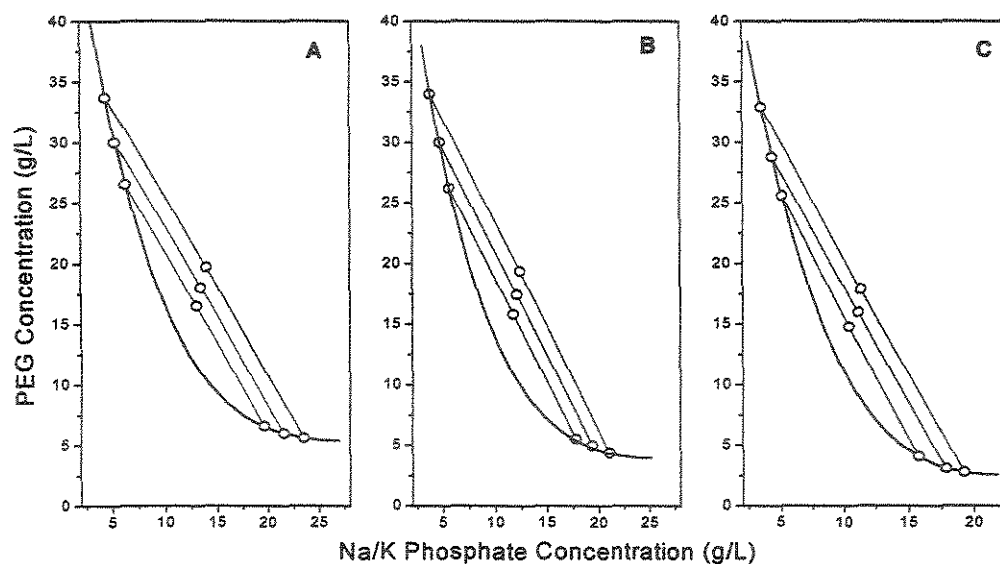


Figure 5.1 – Phase diagram of systems composed of Na/K phosphate buffer and PEG 600 (A), PEG 1000 (B), and PEG 1500 (C) at room temperature and pH 6.5. Tie lines with lengths of 24, 29 and 34 are shown.

Table 5.1 – Total composition of the aqueous two-phase systems used in the central composite design for XR extraction in ATPS

MMPEG	TLL	System composition (% w/w)	
		PEG	Na/K Phosphate
600	24	16.5	12.9
	29	18.0	13.4
	34	19.7	13.9
100	24	16.1	11.4
	29	17.5	12.0
	34	19.3	12.4
1500	24	14.8	10.4
	29	16.0	11.1
	34	17.9	11.3

Table 5.2 – 2⁴ Factorial design for the extraction of xylose reductase in ATPS (design no. 1)

Assay	Real Values of the Variables				Coded Levels of the Variables			
	MMPEG [A]	PEG Conc. (% w/w) [B]	Phosph. Conc. (% w/w) [C]	NaCl Conc. (% w/w) [D]	[A]	[B]	[C]	[D]
1	1500	16	10	0	-1	-1	-1	-1
2	6000	16	10	0	+1	-1	-1	-1
3	1500	22	10	0	-1	+1	-1	-1
4	6000	22	10	0	+1	+1	-1	-1
5	1500	16	13	0	-1	-1	+1	-1
6	6000	16	13	0	+1	-1	+1	-1
7	1500	22	13	0	-1	+1	+1	-1
8	6000	22	13	0	+1	+1	+1	-1
9	1500	16	10	9	-1	-1	-1	+1
10	6000	16	10	9	+1	-1	-1	+1
11	1500	22	10	9	-1	+1	-1	+1
12	6000	22	10	9	+1	+1	-1	+1
13	1500	16	13	9	-1	-1	+1	+1
14	6000	16	13	9	+1	-1	+1	+1
15	1500	22	13	9	-1	+1	+1	+1
16	6000	22	13	9	+1	+1	+1	+1
17	4000	19	11.5	4.5	0	0	0	0
18	4000	19	11.5	4.5	0	0	0	0
19	4000	19	11.5	4.5	0	0	0	0
20	4000	19	11.5	4.5	0	0	0	0

2.9. DETERMINATION OF THE PARTITION COEFFICIENT, THE PURIFICATION FACTOR, YIELD, AND SELECTIVITY

The XR partition coefficient (k) was calculated by the ratio of the volumetric activity in the top phase to that in the bottom phase. The protein partition coefficient is

the ratio between protein concentration in the top and bottom phases. The purification factor (PF) was calculated by the ratio of the specific activity in the phase sample to the specific activity in the cell extract. XR yield (Y) was determined by the ratio between total activity in the phase(s) and total activity in initial extract (x100). Selectivity (S) is defined as the ratio of XR partition coefficients to the protein partition coefficient for each assay.

Table 5.3 – 2^2 Central composite design for XR extraction by partitioning in ATPS (design no. 2)

Assay	Levels of the variables		Values of the variables	
	MMPEG	TLL	MMPEG	TLL
1	-1	-1	600	24
2	+1	-1	1500	24
3	-1	+1	600	34
4	+1	+1	1500	34
5	0	0	1000	29
6	0	0	1000	29
7	0	0	1000	29
8	0	0	1000	29
9	-1	0	600	29
10	+1	0	1500	29
11	0	-1	1000	24
12	0	+1	1000	34

3. RESULTS

3.1. 2⁴ FACTORIAL DESIGN

Table 5.4 shows the results of the assays for extraction of the XR enzyme from *Candida mogii*. Some assays did not show detectable enzymatic activity. In these cases, for parameters calculation purposes, the minimum values of the volumetric activities were set at the minimum detectable value using the method (0.01 U/ml). This value was determined by analysis of a sample with initial XR activity of 0.63 U/ml, successively diluted, to the point where it was no longer possible to get a steady decay of the absorbance.

The responses purification factor in the top phase (PF_T), purification factor in the bottom phase (PF_B), and partition coefficient (K) were statistically analyzed but only PF_T showed significant effects. For responses PF_B and K no variable had significant effect. Therefore, only the parameter PF_T was considered for XR extraction in this step of the work.

The Pareto chart represents the estimated effects of the variables and the interactions on PF_T in decreasing order of magnitude (Figure 5.2). The length of each bar is proportional to the standardized effect. The vertical line can be used to judge which effects are statistically significant. Bars extended beyond this line correspond to effects statistically significant at a confidence level of 95%. It can be observed that only the main effects MMPEG (A) and PEG concentration (B) were significant. In addition, a significant interaction between these two variables (A*B) was also observed. The negative interaction effect means that a decrease in MMPEG with a simultaneous increase in PEG concentration lead to higher PF_T values.

After a regression analysis of the significant factors on PF_T, a linear mathematical model was adjusted (Eq. 1):

$$PF_T = 0.534 - 0.381 * A + 0.164 * B - 0.162 * A * B \quad [\text{Eq. 1}]$$

where A is the coded value for MMPEG and B is the coded value for PEG concentration.

Table 5.4 – Composition of the ATPS studied and purification factor (PF) and partition coefficient (k) of xylose reductase

Assay	MMPEG	PEG Conc. (% w/w)	Phosph. Conc. (% w/w)	NaCl Conc. (% w/w)	PF _T	PF _B	K
1	1500	16	10	0	0.65	0.81	0.15
2	6000	16	10	0	0.24	0.87	0.02
3	1500	22	10	0	0.60	0.70	0.13
4	6000	22	10	0	0.25	1.00	0.01
5	1500	16	13	0	0.31	1.15	0.06
6	6000	16	13	0	0.25	0.91	0.02
7	1500	22	13	0	1.70	0.72	0.84
8	6000	22	13	0	0.16	1.06	0.01
9	1500	16	10	9	0.34	1.34	0.02
10	6000	16	10	9	0.13	1.11	0.03
11	1500	22	10	9	1.19	1.19	0.96
12	6000	22	10	9	0.10	1.65	0.04
13	1500	16	13	9	1.14	1.26	0.62
14	6000	16	13	9	0.09	1.43	0.04
15	1500	22	13	9	1.56	0.07*	26.61*
16	6000	22	13	9	0.21	0.06*	3.48*
17	4000	19	11.5	4.5	0.64	1.00	0.02
18	4000	19	11.5	4.5	0.28	0.93	0.02
19	4000	19	11.5	4.5	0.42	1.62	0.02
20	4000	19	11.5	4.5	0.25	1.08	0.02

* Tubes which showed turbidity in the bottom phase

The statistical significance of the first-order model equation was evaluated by the *F*-test (ANOVA), which revealed that this regression is statistically significant ($p < 0.01$) at a confidence level of 99% (Table 5.5). In addition, the model did not show lack of fit and had a correlation coefficient (R^2) that explains 70% of the variability in the response. The

linear model fitted indicates that there is no optimal region in the design studied. This suggests that a change in the ranges of significant variables would result in higher values for this response.

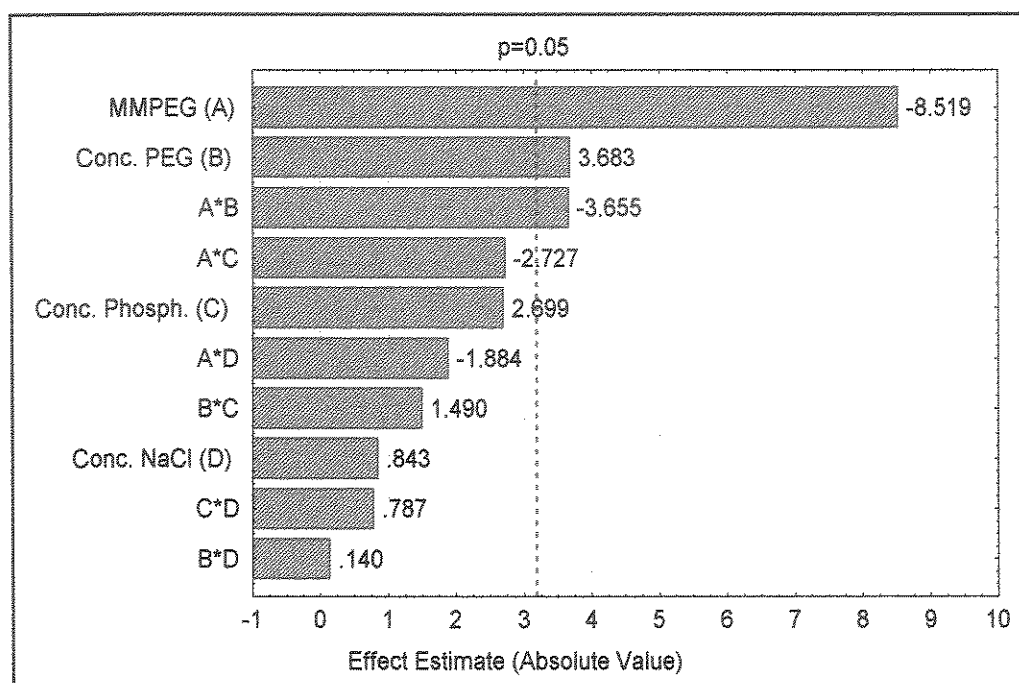


Figure 5.2 – Pareto chart for the effects of the variables MMPEG (A), PEG concentration (B), phosphate concentration (C), and NaCl concentration (D) on the purification factor in the top phase

The response surface determined by the model equation is shown in Figure 5.3. The maximum PF_T value predicted (1.24) corresponded to the point defined by the lowest MMPEG (1500) and a PEG concentration of 22 % w/w with the lowest level of phosphate concentration (10 % w/w) but without the addition of NaCl.

Table 5.5 – Anova for the effects of variables on PF_T in xylose reductase extraction by partitioning in aqueous two-phase systems.

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	p-Value
Model	3.18429	3	1.06143	12.67	<0.0001
Residual	1.34041	16	0.08378		
<i>Lack of Fit</i>	1.24553	13	0.098698	3.12	0.1962
<i>Pure Error</i>	0.09488	3	0.031625		

$R^2 = 0.70$

Listed F with confidence level of 95 %: $F_{3,16} = 3.24$; $F_{13,3} = 8.72$

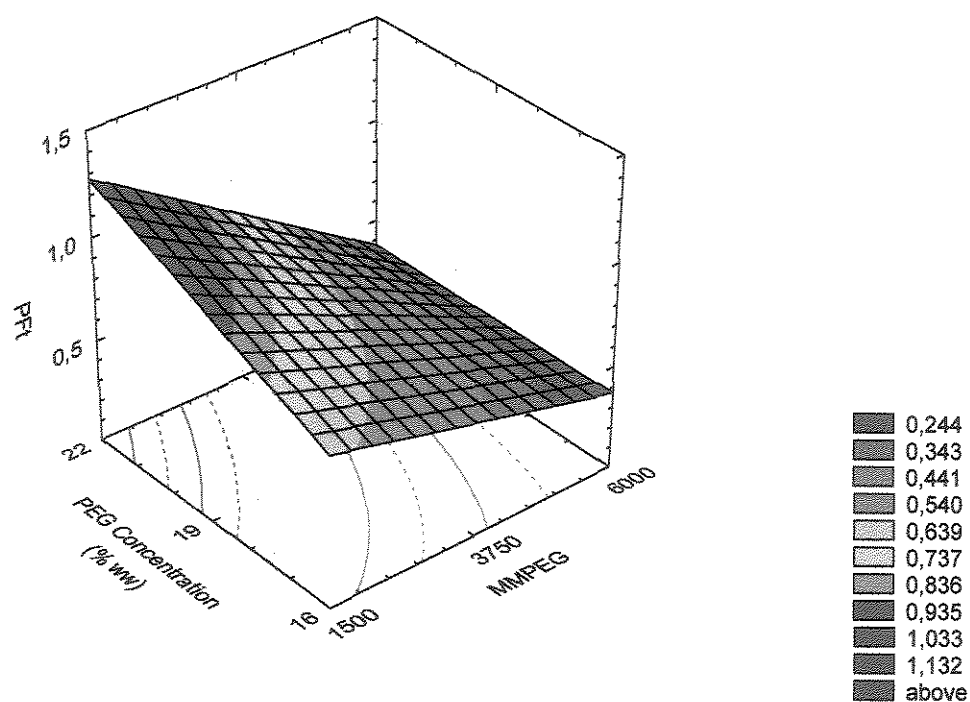


Figure 5.3 – Response surface plot of experimental design no. 1 for the purification factor in the top phase

3.2. 2² CENTRAL COMPOSITE DESIGN

Table 5.6 shows the values found for the parameters partition coefficient (K) of enzyme XR and total protein, purification factor of the top (PF_T) and the bottom phase (PF_B), XR yield (%) in each phase and in the total system, and selectivity (S) in design no. 2.

Table 5.6 – Parameters of the extraction of the enzyme XR in ATPS (design no. 2)

Assay	Values of the Variables		K		PF		Yield			S
	MMPEG	TLL	XR	Total Protein	Top	Bottom	Top	Bottom	Total	
1	600	24	14.54	5.42	0.93	0.35	89.3	3.2	92.5	2.7
2	1500	24	0.06	0.21	0.27	0.88	7.9	89.3	97.2	0.3
3	600	34	14.67	3.37	0.93	0.21	76.6	4.0	80.6	4.4
4	1500	34	0.10	0.26	0.35	0.95	10.2	89.2	99.4	0.4
5	1000	29	3.90	0.80	1.47	0.30	94.1	16.1	110.2	4.9
6	1000	29	3.86	0.80	1.57	0.33	92.4	16.9	109.3	4.8
7	1000	29	3.56	0.93	1.44	0.38	87.4	18.0	105.3	3.8
8	1000	29	3.84	0.89	1.51	0.35	85.9	17.0	102.9	4.3
9	600	29	23.50	4.02	1.32	0.23	117.2	3.6	120.8	5.8
10	1500	29	0.05	0.21	0.20	0.95	6.2	75.1	81.3	0.2
11	1000	24	1.13	0.68	1.20	0.72	69.9	47.8	117.7	1.7
12	1000	34	19.04	0.98	1.69	0.09	92.6	4.1	96.7	19.5

MMPEG = molar mass of PEG; TLL = tie-line length; K = partition coefficient; PF = XR purification factor; S = Selectivity

High values of K found for the enzyme XR (above 14.00) as well as for total proteins (above 3.00) were observed mainly in the assays employing the polymer with the lowest molar mass (PEG 600), independently of the level of the TLL. The values for these responses decreased sharply (below 0.30) in the assays in which the PEG with the highest molar mass (1500) was used. The effect of MMPEG was first described by Albertson (15). Interaction between the polymer and the protein was suggested as the main reason for this behavior. Smaller proteins and amino acids are less affected than larger ones (16). However, the aim of a successful extraction by ATPS is to find the suitable phase systems where the separation selectivity is achieved.

The purification factor (PF) showed the highest values (varying from 1.44 to 1.69) in the top phases of the assays employing the polymer with a molar mass of 1000. All other values observed were below 1.00, indicating that only in the top phases of the assays employing level 0 for the variable MMPEG was there purification of the XR in relation to contaminant proteins.

Regarding the XR yield it can be observed that, except for assay 10, all assays employing PEG with a molar mass of 1000 or 600 had high yield values in the top phase (above 75%), also independently of the TLL. The XR yield in the bottom phase had only high values for assays 2, 4 and 10.

The selectivity of the systems also had higher values (above 4.0) in assays employing PEG with a molar mass of either 600 or 1000. Assays that employed the higher value of MMPEG had lower selectivity values (below 0.5). A 19-fold increase of the selectivity factor was achieved for a system with PEG 1000 and TLL 34 (assay 12).

A regression analysis was carried out to fit mathematical models to the experimental data in a search for an optimal region for the responses studied. This analysis allowed determination of quadratic models that describe the relation between responses PF_T and Y_T and the MMPEG and TLL. The models can be described by the following equations in terms of coded values:

$$PF_T = 1,51 - 0,39 * MMPEG + 0,10 * TLL - 0,78MMPEG^2 - 0,10TLL^2 \quad [\text{Eq. 2}]$$

$$Y_T = 91,12 - 43,13 * MMPEG - 31,75MMPEG^2 - 12,20TLL^2 \quad [\text{Eq. 3}]$$

Figures 5.4 and 5.5 show the response surfaces for PF_T and Y_T obtained by the models.

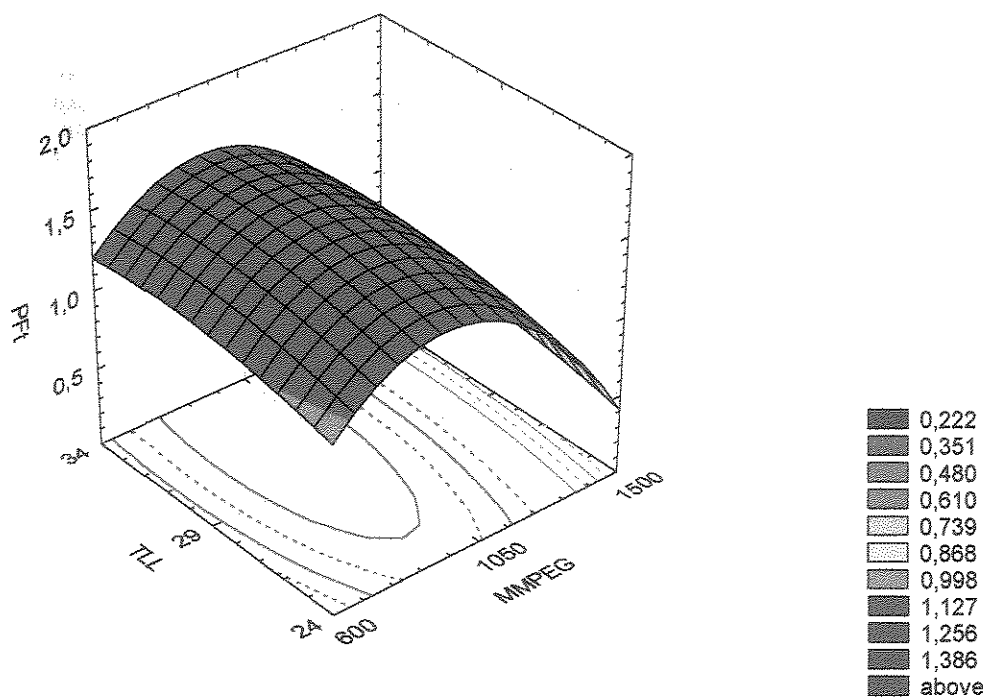


Figure 5.4 – Response surface plot of experimental design no. 2 for the optimization of the purification factor in the top phase

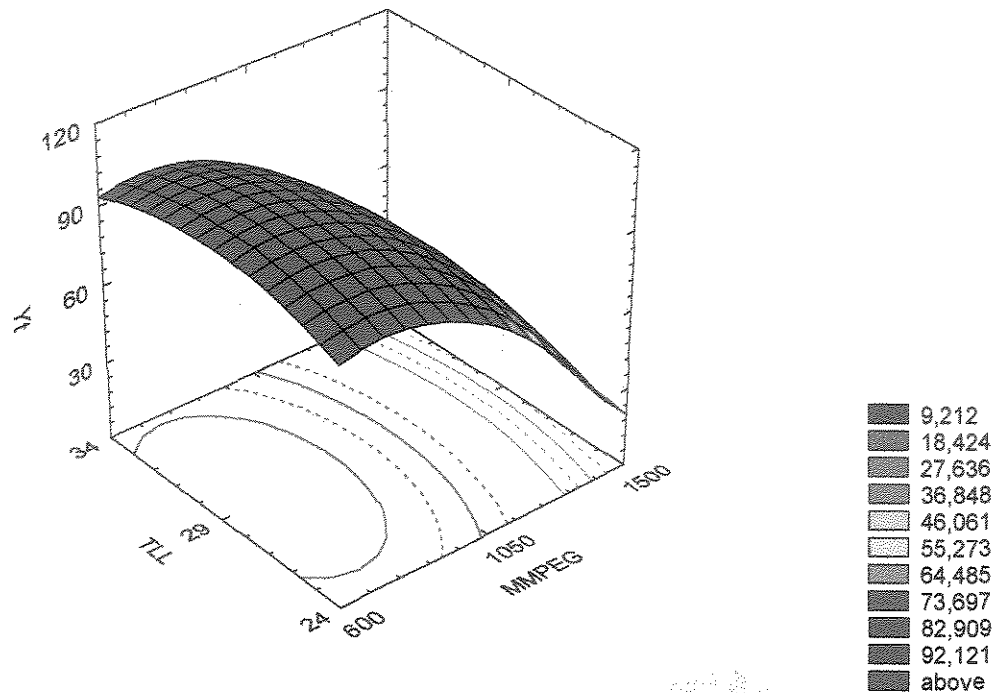


Figure 5.5 – Response surface plot of experimental design no. 2 for the optimization of the XR yield in the top phase

The analysis of variance (Table 5.7) shows that the models adjusted for the responses PF_T and Y_T were adequate, with high values of R^2 and significant values of p at confidence level of 99%. The lack of fit of the models for these two responses was also evaluated, and p values > 0.01 were found for both responses. According to a criterion for model validation presented by Moldavsky and Cohen (17), mathematical models that have $R^2 > 0.90$ and p value for lack of fit > 0.01 are adequate to represent the relationship between the variables.

Table 5.7 - ANOVA for the quadratic models predicted for the purification factor and the XR yield in design no. 2

Source	Parameter	Responses	
		PF _T	Y _T
Model	Sum of Squares	2.99	15433.53
	Mean of Squares	0.75	3858.38
	<i>p</i> - Value	0.0001	0.0001
	R ²	0.95	0.95
	Degrees of Freedom	4	4
Pure Error	Sum of Squares	9.48*E ⁻³	46.13
	Mean of Squares	3.16*E ⁻³	15.38
	Degrees of Freedom	3	3
Lack of Fit	Sum of Squares	0.16	807.19
	Mean of Squares	0.039	201.80
	<i>p</i> - value	0.0326	0.0304
	Degrees of Freedom	4	4

The model for response PF_T predicted the maximum value (1.59±0.40) with a MMPEG of 937 and a TLL of 31.5. The maximum value for the response Y_T (105.8±26) is predicted for MMPEG of 744 and TLL of 29. Yield values above 100% are frequently reported in enzyme extraction using liquid-liquid systems (18,19,20). This fact is probably explained by the elimination of inhibitors during the purification process and by the composition of the systems that favor the enzymatic activity. It is known that there is no MMPEG of 937 or 744 available; however, this result enables the prediction that if less polydisperse PEG were found commercially, these two MMPEGs would lead to best PF_T and Y_T values.

An overlay plot of the response surfaces for the purification factor and the XR yield in the top phase (Figure 5.6) allows delimitation of a region in which high values for both responses can be obtained.

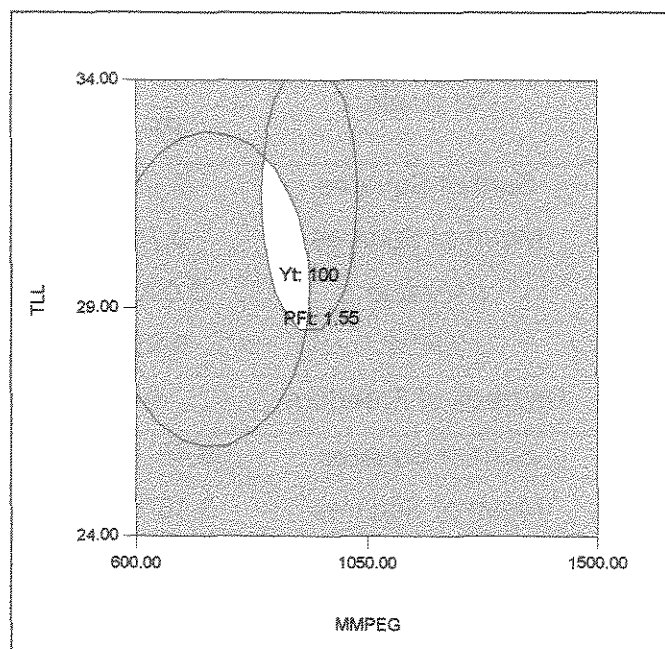


Figure 5.6 – Overlay plot of the response surfaces for PF_T and Y_T in design no. 2

The analysis of variance for response KXR (data not shown) did not indicate a significance of either a linear or quadratic model at the confidence level of 95%, as a function of the values of $p > 0.05$ observed. Besides, the R^2 values below 0.80 calculated for both models do not indicate an adequate correlation between the experimental data and the model points. The analysis of significance of the lack of fit for both models had F values higher than the F values listed, which indicates lack of fit in both cases.

An XR extraction run for model validation was carried out under experimental conditions at which selectivity was the highest (assay 12). The values of PF_T and Y_T were 1.89 and 103.5, respectively. These results are in the range of values predicted for the extraction under these conditions, a PF_T of 1.51 (± 0.45) and Y_T of 89 (± 28). Values of K and S close to those obtained in assay 12 were achieved in this run (21.21 and 18.80), showing the reproducibility of the results at these conditions.

Figure 5.7 illustrates the SDS-PAGE electrophoresis of the proteins in the cell extract and in the top and bottom phases of the assay 12. A selective partitioning of the proteins with apparent molar mass (M_r) from 24 to 36 kDa to the top phase of the system, which contain most of the XR activity, can be observed. Ditzelmüller *et al* (21) purified an XR from *Pachysolen tannophilus* with M_r of 35–40 kDa. Ho *et al* (22) obtained an XR with 33 kDa from *Candida shehatae*. Kise *et al* (23) also found a molar mass of 33 kDa for an aldose reductase from *Cryptococcus lactativorus* using SDS-PAGE electrophoresis. Handumhongkul and Silva (24) purified a XR from *Candida guilliermondii* with M_r of 36 kDa.

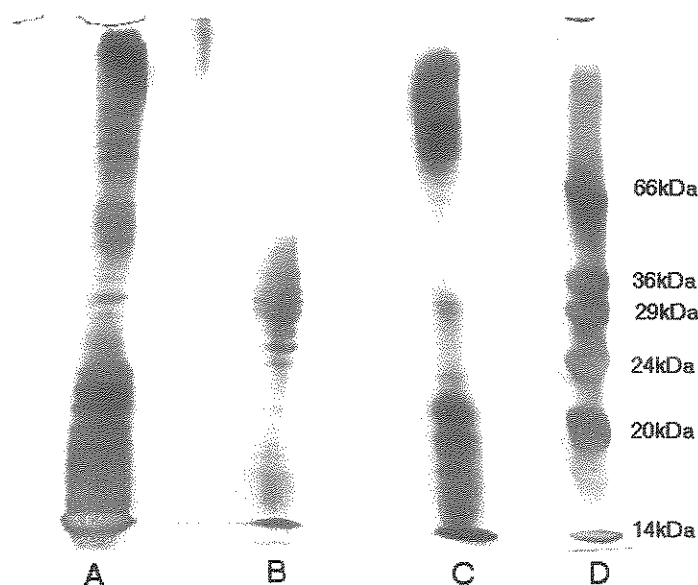


Figure 5.7 – SDS-PAGE electrophoresis of purification step in ATPS. Column (A) cell extract; (B) top phase of system 12; (C) bottom phase of system 12; and (D) molecular markers

4. CONCLUSIONS

Liquid-liquid extraction by partitioning in aqueous two-phase systems selectively extracted the enzyme XR from *Candida mogii* in a single step operation. A 19-fold increase in the selectivity factor was experimentally achieved for a system with PEG 1000 and TLL 34. Values of K , PF_T and Y_T of respectively 21.21, 1.89 and 103.5 were also obtained at these experimental conditions. It was possible to obtain representative models for purification factor and yield in the top phase, and the optimal conditions for these parameters could be established.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support received from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brazil.

References

1. Tjerneld, F., Berner, S., Cajarville, A., Johansson, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 417-423, 1986.
2. Schmidt, A.S., Ventom, A.M., Asenjo, J.A. Partitioning and purification of α -amilase in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 131-141, 1994.
3. Franco, T.T. Andrews, A.T., Asenjo, A.A. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein characteristics in aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 49,300-308, 1996.

4. Menge, U. Optimization of extractions in aqueous two-phase systems. In: Hatti-Kaul. *Methods in Biotechnology. V.11:Aqueous Two-Phase Systems. Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc., 2000.
5. Roberto, I.C., Mancilha, I.M., Souza, C.A., Felipe, M.G.A., Sato, S., Castro, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* 16, 1211-1216, 1994.
6. Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Nishio, N., Nagai, S. Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with the oxidoreductase system of methanogen strain HU. *Biotechnology Letters* 6, 651-656, 1984.
7. Parajó, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M. Production of xylitol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426. *Biochem. Eng.* 13, 125-131, 1995.
8. Chiang, C., Knight, S.G. Metabolism of the D-xylose by moulds. *Nature* 188, 79-81, 1960.
9. Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D., Kulbe, K.D. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 387-396, 1996.
10. Hyvönen, L., Koivistoinen, P. Food technological evaluation of xylitol. *Adv. Food Res.* 28, 373-403, 1982.
11. Mayerhoff, Z.D.V.L., Roberto, I.C., Silva, S.S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotech. Lett.*, 19, 407-409, 1997.
12. Mayerhoff, Z.D.V.L., Roberto, I.C., Franco, T.T. Activity of xylose reductase from *Candida mogii* grown in media containing different concentrations of rice straw hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotech.* 91/93, 729-737, 2001.
13. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

14. Snyder S.M., Cole, K.D., Szlag, D.C. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, 37, 268-274, 1992.
15. Albertsson, P.A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. 1st ed. New York: Willey Interscience. 1971.
16. Albertsson, P.A., Cajarville, A., Brooks, D.E., Tjerneld, F. Partition of proteins in aqueous two-phase systems and the effect of molecular mass of the polymer. *Biochim. Biophys. Acta*, 926, 87-93, 1987.
17. Moldavsky N., Cohen S. Determinants of liposome partitioning in aqueous two-phase system: evaluation by means of a factorial design. *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 529-537, 1996.
18. Duarte, M.C.T., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Bim, M.A., Tagliari, C.V., Franco, T.T. Production and purification of alkaline xylanases. *Biores. Technol.*, 68, 49-53, 1999.
19. Falco, A.L.P., Durrant, L.R., Franco, T.T. Purification of α -galactosidade from seeds of *Sesbania marginata*. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 17, 819-825, 2000.
20. Cortez, E.V. Felipe, M.G.A., Roberto, I.C., Pessoa J.R., A., Vitolo, M. Extraction by reversed micelles of the intracellular enzyme xylose reductase. *Appl. Biochem. Biotech.*, 91-93, 753-759, 2001.
21. Ditzelmüller, G., Kubicek, C.P., Wöhrer, W., Röhr, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. *Can. J. Microbiol.*, 30, 1330-1336, 1984.
22. Ho, N.W.Y., Lin, F.P., Huang, S., Andrews, P.C., Tsao, G.T. Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 33-39, 1990.
23. Kise, S., Koizumi, N., Maeda, H. Properties of NAD(P)H-linked aldose reductase from *Cryptococcus lactativorus*. *J. Ferment. Technol.*, 66, 615-623, 1988.

24. Handumrongkul, C., Silva, D-P. Ma. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xyl1) in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 399-404, 1998.

CAPÍTULO 6

Este capítulo apresenta um estudo preliminar da utilização de ligantes bioespecíficos na purificação de XR em SDFA. Dois corantes da classe clorotriazina (Drimaren e Cibacron) foram investigados quanto à propriedade de atuar como ligantes para as moléculas de XR em sistemas de duas fases aquosas. O corante Drimaren foi adicionado aos sistemas sob a forma livre e também ligado covalentemente ao polímero (PEG). A cinética de inibição da atividade enzimática da XR em presença do corante foi também estudada.

ESTUDO PRELIMINAR DO USO DE CORANTES COMO LIGANTES BIOESPECÍFICOS NA EXTRAÇÃO DA XR EM SDFA

1. INTRODUÇÃO

Corantes têxteis de triazina imobilizados têm sido usados como ferramentas de cromatografia por afinidade por cerca de 30 anos, devido ao seu baixo custo, sua facilidade de imobilização e sua resistência à degradação química e biológica, entre outros fatores (CLONIS *et al*, 2000). De acordo com HERMANSON *et al* (1992), o uso de moléculas de corantes como ligantes por afinidade introduziu a cromatografia de pseudo-afinidade, na qual a estrutura do corante se assemelha a um ligante bioespecífico. O corante é capaz de se ligar ao sítio ativo de uma proteína ou enzima em virtude de sua similaridade com um substrato de ocorrência natural. O uso de ligantes bioespecíficos tem sido relatado também na purificação de proteínas por partição em sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Segundo KOPPERSCHLÄGER e KIRCHBERGER (2000), os corantes são geralmente ligados a um dos polímeros formadores de fase, o que leva à sua partição em favor da fase enriquecida neste polímero. A partição da proteína em sistemas de duas fases aquosas contendo ligante é governada pela formação de complexos ligante-proteína, e é favorecida para a fase contendo o complexo polímero-ligante.

No presente trabalho, dois corantes da classe triazina foram empregados, visando a purificação da XR de *Candida mogii* em SDFA: Drimaren VM BR A4-G e Cibacron Blue F3-G. De acordo com HERMANSON *et al* (1992), Cibacron Blue é o corante mais popular empregado em técnicas de afinidade, pois, devido à sua estrutura que mimetiza certos substratos para enzimas, pode ser usado com sucesso na purificação de enzimas que requerem NAD ou NADP como cofatores. Ainda segundo este autor, um outro corante com propriedades ligantes grupo-específicas similares ao Cibacron é o Procion Red HE-3, sendo que este último possui maior afinidade por enzimas NADP-dependentes, enquanto o Cibacron é mais específico para enzimas NAD-dependentes. O corante Drimaren empregado neste trabalho possui estrutura

idêntica ao Procion Red HE-3, sendo, então, considerado o corante mais apropriado para a extração da XR.

Neste trabalho, o corante Drimaren foi inicialmente adicionado aos sistemas de duas fases aquosas sob a forma livre, a fim de se observar a sua partição natural nestes sistemas. A extração da XR foi primeiramente avaliada nestes sistemas. Posteriormente, o corante foi ligado ao polietilenoglicol (PEG), e este complexo foi adicionado aos sistemas contendo XR como uma proporção da massa final de polímero. O corante Cibacron foi testado apenas sob a forma livre.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS

Para o teste da partição dos corantes livres nos SDFAs, foram preparados sistemas PEG/fosfato de sódio-potássio empregando os polímeros de massa molar 600, 1000 e 1500. A composição dos componentes das fases foi de 17,5 % PEG (p/p) e 12 % tampão fosfato. Nos testes de extração, foi adicionado 0,5 ml de extrato enzimático com 0,99 U XR/ml. Os corantes foram adicionados em concentrações crescentes até 0,1 g/g.

2.2. LIGAÇÃO DO CORANTE DRIMAREN AO PEG

O corante foi ligado ao PEG de massa molar 1500, de acordo com o método de acoplamento direto descrito por KOPPERSCHLÄGER e KIRCHBERGER (2000), com algumas alterações, e que compreendeu as seguintes etapas:

1. Reação de 20 g de PEG e 3,1 g do corante em 30 ml de água, a 85 °C, em presença de 0,8 g de LiOH, por 105 min, e, depois, durante uma noite à temperatura ambiente.

2. Diluição da solução com 250 ml de água e adição de NaH_2PO_4 até pH 7,0.
3. Adição de KCl até a concentração final de 1,5 M.
4. Extração da mistura de reação com 100 ml de clorofórmio por 5 vezes, em funil de separação; secagem do clorofórmio com Na_2SO_4 anidro para retirada de água e filtração em papel de filtro.
5. Remoção do solvente por destilação.
6. Checagem da pureza por cromatografia de camada delgada em placas de sílica, usando 1-butanol/2-propanol/acetato de etila/água (20:35:10:35) como eluente. Sob estas condições, o corante ligado ao polímero não migra, em contraste com o corante livre, que se move com o eluente.

3. RESULTADOS

A partição dos corantes livres para a fase superior dos sistemas (rica em PEG) foi observada visualmente nos sistemas empregando polímeros com as 3 massas molares diferentes até a concentração final de corante de 0,05 g/g. Com a concentração de 0,1 g/g, foi possível observar que parte do corante permaneceu na fase inferior dos sistemas, devido à saturação da fase superior. A Figura 6.1 mostra a partição do corante Drimaren na concentração final de 0,05 g/g.

Considerando a partição natural do corante para a fase superior, o polímero escolhido para ser empregado nos estudos de partição foi o PEG 1500, uma vez que sistemas empregando este polímero não apresentaram partição de XR ou de proteínas para a fase superior. Assim, no caso de haver especificidade do corante pela XR, a sua purificação na fase de topo seria favorecida. Os resultados da extração da XR em sistemas contendo o corante Drimaren estão mostrados na Tabela 6.1.

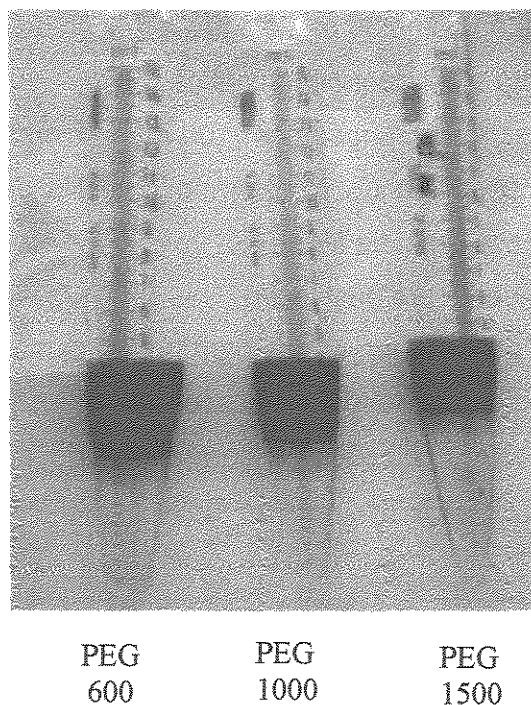


Figura 6.1 – Partição do corante Drimaren Vm BR A4-G sob a forma livre em sistemas de duas fases aquosas compostos por polímeros de diferentes massas molares e fosfato de sódio/potássio

Tabela 6.1 – Resultados da extração da XR de *Candida mogii* em SDFA, empregando o corante Drimaren Vm BR A4-G como ligante

Conc. Cor. (g/g)	Fator de Purificação				
	K XR	K Pt	S	Topo	Fundo
0	0,025	0,047	0,529	0,507	1,129
0,001	0,024	0,046	0,532	0,398	1,433
0,025	0,033	0,027	1,245	1,228	0,986
0,05	0,047	0,029	1,632	1,658	1,016
0,1	0,000	0,041	0,000	0,000	0,775

K XR = coeficiente de partição da enzima; K Pt = coeficiente de partição das proteínas totais; S = seletividade

Aumento nos valores do coeficiente de partição da XR, na seletividade e no fator de purificação de XR na fase superior podem ser observados nos sistemas contendo 0,025 e 0,05 g/g de corante. Entretanto, sistemas contendo 0,1 g/g de corante não apresentaram atividade de XR detectável na fase superior. Este fato ocorreu provavelmente em função de interferência da alta concentração de corante nas análises enzimáticas. Nos ensaios realizados empregando o corante Drimaren ligado ao PEG e o corante Cibacron livre, não foi possível detectar atividade enzimática de XR na fase de topo dos sistemas contendo qualquer das concentrações de corante.

Foi realizado um estudo da interferência do corante na análise de XR, e, em seguida, um estudo da cinética de inibição da atividade da XR em presença dos corantes. O efeito de diferentes concentrações dos corantes sobre a atividade de XR está apresentado na Figura 6.2. Pode-se observar que a atividade de XR é reduzida com o aumento na concentração do corante. Este efeito é mais pronunciado para o corante Drimaren do que para o corante Cibacron.

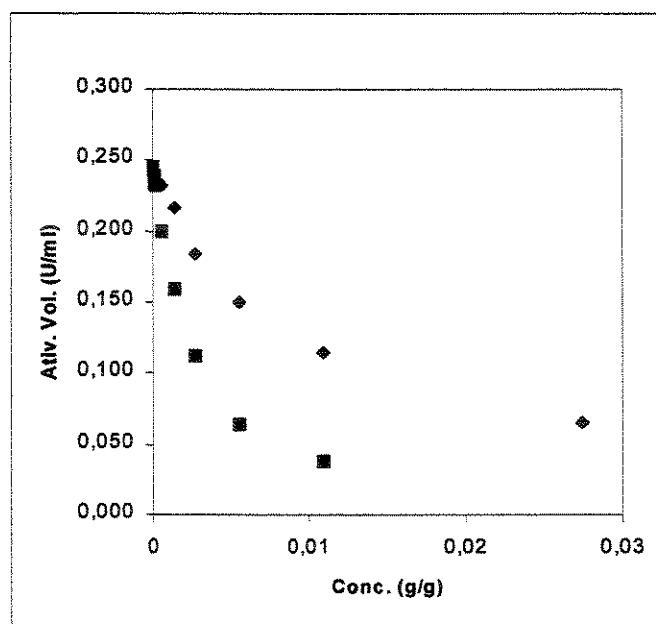


Figura 6.2 – Efeito da concentração dos corantes Drimaren Vm BR A4-G (■) e Cibacron Blue F3-G (◆) sobre a atividade da XR de *Candida mogii*

A inibição da atividade enzimática pode ocorrer em função da formação de um complexo enzima-inibidor. Este complexo pode ser formado pela ligação do inibidor ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato, ou por ligação em qualquer outra porção da molécula, causando mudanças na sua conformação que podem impedir a formação do complexo enzima-substrato ou a liberação do produto já formado. O tipo de inibição causado por uma substância na atividade de uma enzima pode ser determinado através de um estudo da cinética de inibição. Estudos da cinética da atividade da XR com variação da concentração do cofator NADPH em presença dos corantes foram realizados.

A Figura 6.3 apresenta os perfis da velocidade de reação da XR (expressa como velocidade de formação de NADPH) em presença de diferentes concentrações dos corantes Drimaren e Cibacron. A Figura 6.4 apresenta a linearização dos perfis através do gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk. O gráfico de Lineweaver-Burk é um meio de visualização dos efeitos de inibidores, e este método pode ser usado para distinguir o tipo de inibição. A comparação entre os valores de velocidade máxima de reação ($V_{\max}$) calculado com base na equação de Lineweaver-Burk para cada uma das concentrações de inibidor permite distinguir se a inibição é competitiva, não-competitiva ou mista. Inibidores competitivos reduzem a especificidade da enzima pelo substrato, mas não alteram a $V_{\max}$; inibidores não competitivos não afetam a especificidade da enzima pelo substrato, mas reduzem a $V_{\max}$. A inibição não competitiva pode ser contornada com a adição de concentrações significativamente maiores de substrato no meio reacional. Altas concentrações de substrato, no entanto, não são suficientes para minimizar o efeito de inibidores não-competitivos.

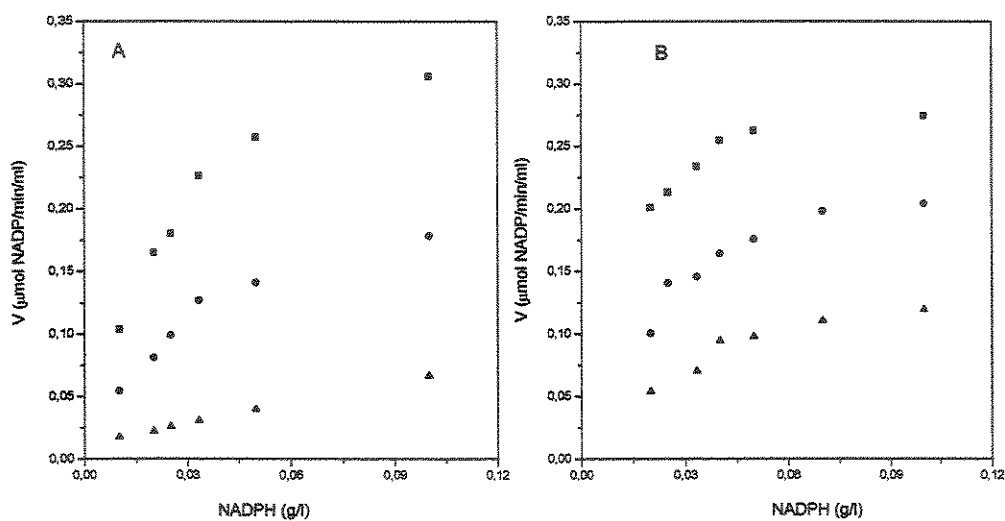


Figura 6.3 – Variação da velocidade de reação da XR em função do NADPH em presença de diferentes concentrações dos corantes Drimaren (A) e Cibacron (B): sem corante (■); 0,0025 g/l (●); 0,01 g/l (▲).

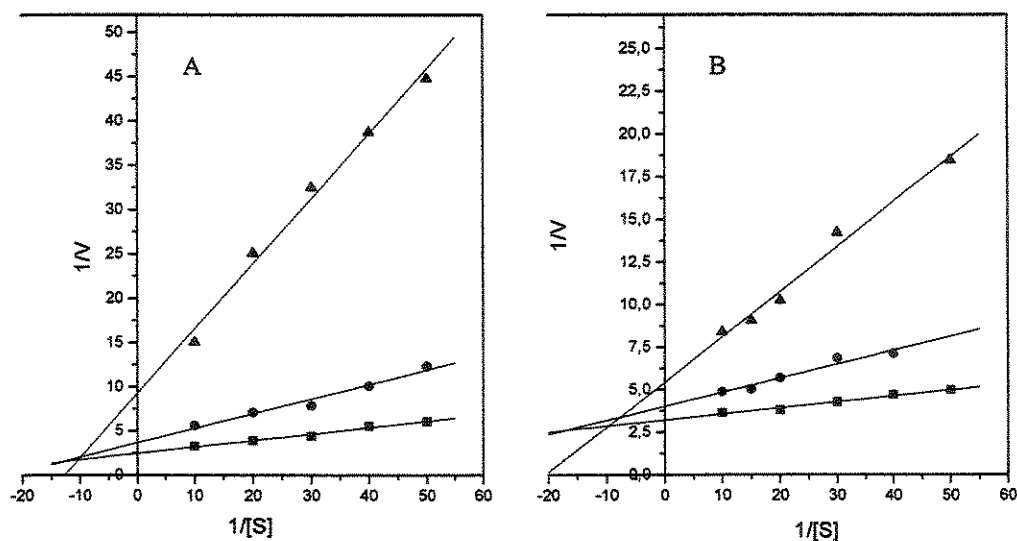


Figura 6.4 – Gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk para a variação da velocidade de reação da XR em função do NADPH em presença de diferentes concentrações dos corantes Drimaren (A) e Cibacron (B): sem corante (■); 0,0025 g/l (●); 0,01 g/l (▲).

De acordo com CLONIS *et al* (2000), se um corante interage com o sítio ativo de uma substância, então, uma substância competitiva apropriada pode ser usada como um eluente específico para a enzima. Se, entretanto, o modo de interação entre o corante e a enzima não é conhecido, muitas substâncias podem ser testadas para a eluição da enzima, esperando-se que algum deles atue como um competidor seletivo nesta eluição.

Neste trabalho, volumes da fase superior dos ensaios foram coletados e misturados com diferentes soluções salinas a fim de se obter um novo sistema de duas fases, no qual a XR fosse eluída para a fase isenta de corante. Foram testadas soluções de NaCl, KCl e fosfato de sódio potássio em diferentes concentrações. Uma solução de NADPH também foi testada pura e combinada com as soluções salinas. Embora em todos os casos tenha ocorrido a formação de novos sistemas de duas fases nas quais o corante permaneceu na fase de topo, não foi detectada atividade de XR na fase inferior de nenhum desses sistemas.

A Tabela 6.2 mostra os resultados de V_{max} calculadas para a XR em presença de cada concentração de corante. Como pode ser observado, para ambos os corantes utilizados, a V_{max} de XR diminuiu com o aumento da concentração dos inibidores. Isto indica que a inibição apresentada pelos corantes não é exclusivamente competitiva, e, portanto, apenas o aumento na concentração do substrato não é eficiente para impedir a inibição.

Tabela 6.2 – Variação da $V_{\max}$ de XR com diferentes concentrações dos corantes Drimaren e Cibacron

$V_{\max}$ XR	Concentração corante (g/g)		
	0	0,0025	0,011
Drimaren	0,41	0,27	0,11
Cibacron	0,41	0,35	0,19

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram um efeito do corante Drimaren livre na purificação da XR em SDFA, entretanto, o efeito inibidor deste corante impediu a determinação da extensão deste efeito. Novos estudos para a eluição da XR ligada ao corante podem fornecer subsídios para uma melhor avaliação do uso destes corantes como ligantes bioespecíficos para a XR.

CONCLUSÕES

Os tópicos apresentados a seguir resumem as principais conclusões extraídas dos diversos estudos realizados ao longo deste trabalho.

- Foi avaliada a produção da enzima xilose redutase (XR) e de xilitol em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de hidrolisado hemiicelulósico de palha de arroz. Os resultados indicaram um comportamento semelhante para os dois produtos, tendo sido determinada uma condição ótima de concentração de xilose de 49 g/l tanto para a produção quanto para a produtividade de ambos os produtos. Nesta mesma condição também foi encontrada a máxima razão entre a enzima XR e a enzima responsável pela oxidação do xilitol (XDH).
- A atividade da XR *in vitro* foi dependente do pH e da temperatura. As condições ótimas para a atividade de XR foram pH de 6,5 e 38 °C. Uma região de trabalho com alta atividade de XR e baixa atividade de XDH foi estabelecida. Observou-se, neste mesmo estudo, que a XR de *Candida mogii* é exclusivamente dependente do cofator NADPH.
- No estudo de estabilidade foi determinado o intervalo de tempo de manuseio no qual a XR não apresenta perda de atividade (180 min) a 4 ou 38 °C. Observou-se também que, em um período de congelamento de 4 meses não houve perda de atividade enzimática.
- Foram determinados os parâmetros cinéticos da enzima XR presente no extrato celular. Os valores encontrados mostraram a XR produzida por *Candida mogii* (K_m de 65 mM para a xilose e 0,032mM para NADPH) possui uma alta especificidade para o substrato, quando comparada com as enzimas produzidas por outros microrganismos.
- No estudo de avaliação de eficiência do rompimento celular de *C. mogii* em moinho de pérolas de vidro, as condições que resultam em maior liberação de XR foram

determinadas ($\varnothing$ de 300 μm ; 45 g cel./L; 50 ciclos de agitação). A maior atividade específica obtida apenas com o congelamento e descongelamento das amostras sugere que este processo pode ser explorado como um método seletivo para a liberação da XR de leveduras.

- O estudo da influência das variáveis na extração de XR indicou a necessidade de alteração da composição dos sistemas pelo emprego de PEG de massas molares inferiores e pela substituição do fosfato K por uma combinação de fosfato Na/K para aumentar a solubilidade do sistema.
- Estudos empregando essas novas condições permitiram a proposição de modelos quadráticos para o FP_{sup} e $\%\text{Rec}_{\text{sup}}$. Não foi possível prever modelos para o K e a S; entretanto, os valores para estas respostas obtidos em condições próximas às do FP_{sup} ótimo foram elevadas em relação à maioria dos outros ensaios (19,04 e 19,5, respectivamente). A extração em SDFA mostrou ser eficiente com relação à recuperação da XR (>100 %) e seletiva para a partição da enzima em relação às proteínas totais.
- A adição de corantes aos SDFA foi investigada preliminarmente para melhorar a extração da XR. Os resultados mostraram um efeito do corante Drimaren livre na purificação da XR em SDFA, entretanto, a inibição da atividade causada por este corante impediu a determinação da extensão do seu efeito como ligante. Novos estudos para a eluição da XR ligada ao corante podem fornecer subsídios para uma melhor avaliação do uso destes corantes como ligantes bioespecíficos para a XR.

Os tópicos a seguir são apresentados como sugestões para próximos trabalhos, visando dar continuidade a este:

- Estudo das melhores condições de congelamento e descongelamento para a liberação seletiva da XR de *C. mogii*.
- Extração da XR por partição em SDFA utilizando colunas de extração.

- Estudo de um sistema acoplado para rompimento celular e extração da XR.
- Novos estudos para a utilização de corantes têxteis como ligantes bioespecíficos para a extração da enzima em SDFA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANEN P., ISOKANGAS P., GUTMAN K. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children. *Community dentistry and oral epidemiology*, v.28, p.218-224, 2000.
- ALBERTSSON, P-Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. New York: Willey Interscience, 1 ed., 1971.
- ALBERTSSON, P-Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. New York: Willey Interscience, 3 ed., 1986.
- ALRED, P.A., KOZLOWSKI, A., HARRIS, J.M., TJERNELD, F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. *J. Chromatogr. A*, v.659, p.289-298, 1994.
- ANDREWS, B., ASENJO, J.A. In: HARRIS, E.L.V., ANGAL, S. *Protein Purification Methods: a Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1989.
- ASENJO, J.A., FRANCO, T.T., ANDREWS, A.T., ANDREWS, B.A. In: WHITE, M., VEUVENY, S., SHAFFERMAN, S. *Biological for Recombinant Microorganisms and Animal Cells - New Strategies in Production and Recovery*. VCH Publisher, 1990.
- BAMBERGER, S.B., BROOKS, D.E., SHARP, K.A., van ALSTINE, J.M., WEBBER, T.J. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: WALTER, H., BROOKS, D.E., FISCHER, D. *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology*. Orlando: Academic Press, 1985. p.85-130.
- BÄR, A. In: O'BREIN NABORS, L., GELARDI, R. *Alternative Sweeteners*. New York: Marcel Dekker, p.185-216, 1986.
- BARBOSA, M.F.S., MEDEIROS, M.B., MANCILHA, I.M., SCHNEIDER, H., LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.*, v.3, p.241-251, 1988.

- BERGGREN, K., CARLSSON, M., LINSE, P., VEIDE, A., TJERNELD, F. Partition of Recombinant Protein-A Derivatives in PEG-dextran and UCON-dextran Aqueous Two-Phase Systems. *Pharmacology and Toxicology*, suppl.2, p.181, 1995.
- BICHO, P.A., RUNNALS, P.L., CUNNINGHAM, J.D., LEE, H. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, n.1, p.50-54, 1988.
- BIM, M.A., FRANCO, T.T. Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. *J. Chromatogr. B*, v.743, p.349-356, 2000.
- BISARIA, V.S., GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.*, v.3, p.90-103, 1981.
- BOLEN, P.L., BIETZ, J.A., DETROY, R.W. aldose reductase in the yeast *Pachysolen tannophilus*: purification, characterization and N-terminal sequence. *Biotechnol. Bioeng.*, v.15, p.129-148, 1986.
- BOLEN, P.L., DETROY, R.W. Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose, or D-galactose. *Biotechnol. Bioeng.*, v.27, p.302-307, 1985.
- BOLEN, P.L., McCracken, D.A. Properties of aldose reductase from the methanol yeast *Candida boidinii*. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 69, n. 4, p. 211-214, 1990.
- BRUINENBERG, P.M., de BOT, P.H.M., van DIJKEN, J.P., SCHEFFERS, W.A. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.18, p.287-292, 1983.
- BRUINENBERG, P.M., de BOT, P.H.M., van DIJKEN, J.P., SCHEFFERS, W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.19, p.256-260, 1984.
- CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-Liquid extration of Biomolecules Using Aqueous Two-Phase Systems. In: Jonh Wiley & Sons Ltd (eds), *Recovery Process For Biological Materials*, New York, p. 273-301, 1993.

- CASCONE, O., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. Partitioning and Purification of Thaumatin in Aqueous Two-Phase Systems. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 13, p. 629-635, 1991.
- CHEN, L-F., GONG, C-S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.*, v.50, p.226-228, 1985.
- CHEN, W.P., ANDERSON, A.W. Extraction of hemicellulose from ryegrass straw for the production of glucose-isomerase and use of the resulting straw residue for animal feed. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 22, p. 519-531, 1980.
- CHIANG, C., KNIGHT, S.G. Metabolism of the D-xylose by moulds. *Nature*, v. 188, p. 79-81, 1960.
- CLONIS, Y.D., LABROU, N.E., KOTSIRA, V.Ph., MAZITSOS, C., MELISSIS, S., GOGOLAS, G. Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification. *J. Chromatogr. A*, v.891, p.33-44, 2000.
- CORTEZ, E.V. FELIPE, M.G.A., ROBERTO, I.C., PESSOA JR, A., VITOLO, M. Extraction by reversed micelles of the intracellular enzyme xylose reductase. *Appl. Biochem. Biotech.*, v.91-93, 2001.
- DASHIYA, J.S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 14-18, 1991.
- DIAMOND, A.D., HSU, J.T. Aqueous Two-Phase System for Biomolecule Separation. *Adv. Biochem., Eng. Biotech.*, v.47, p. 339-348, 1992.
- DITZELMÜLER, G., KUBICEK, C.P., WÖHRER, W., RÖHR, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. *Can. J. Microbiol.*, v.30, p.1330-1336, 1984.
- EL-MASRY, H.G. Utilisation of egyptian rice straw in production of cellulases and microbial protein: effect of various pretreatments on yields of protein and enzyme activity. *J. Sci. Food Agric.*, v.34, p.725-732, 1983.

- FAIR, J.R. Commercially attractive bioseparation technology. *Chem. Eng. Progress*, 1989.
- FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M., VITOLO, M., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S. ROSA, S.A.M. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. *Arq. Biol. Tecnol.*, v.36, n.1, p.103-114, 1993.
- FRANCO, T.T. *Use of Modified Proteins in Aqueous Two-Phase Systems. Effect of Surface Hydrophobicity and Charge*. University of Reading, 1992. 184p. (Tese de Doutorado).
- FRANCO, T.T., ANDREWS, A.T. ASENJO, A.A. Use Of Chemically Modified Proteins To Study The Effect Of A Single Protein Characteristics In Aqueous Two-Phase Systems. Conservative Modifications. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p. 290-299, 1996a.
- FRANCO, T.T., ANDREWS, A.T. ASENJO, A.A. Use Of Chemically Modified Proteins To Study The Effect Of A Single Protein Characteristics In Aqueous Two-Phase Systems. Effect Of Surface Hydrophobicity. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p. 300-308, 1996b.
- FRANCO, T.T., ANDREWS, A.T., CASCONI, O., HODGSON, C., ASENJO, J.A. Affinity separation of proteins in aqueous two-phase systems. In: PYLE, E.D. *Separations for Biotechnology*, v. 2. London: Elsevier Applied Science, 1990.
- GÍRIO, F.M., PELICA, F., AMARAL-COLLAÇO, M.T. Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Biochem. Biotech.*, v.56, p.79-87, 1996.
- GONG, C-S., CHEN, L.F., TSAO, G.T. Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnol. Lett.*, v.3, p.125-130, 1981.
- HALLBORN, J., GORWA, M.-F., MEINANDER, N., PETTILÄ, M., KERÄNEN, S., HAHN-HÄGERDAL, B. The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Sacharomyces cerevisiae* expressing the XYL1 gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.42, p. 326-333, 1994.

- HANDUMRONGKUL, C., SILVA, D-P. Ma. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xyl1) in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.49, p.399-404, 1998.
- HAN, Y.W., ANDERSON, A.W. Semisolid fermentation of ryegrass straw. *Applied Microbiol.*, v.30, n.6, p.930-934, 1975.
- HARRIS, P.A., KALSTRÖM, G., TJERNELD, F. Enzyme purification using temperature-induced phase formation. *Bioseparation*, v.2, p.237, 1991.
- SUOMEN XYROFIN OY, Kotka, FI, Heikkilä, H., Nurmi, J., Rahkila, L., Töyrylä, M., Kirkkonummi. *Method for the production of xylitol*. U.S.5,081,026. 1992.
- HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., SMITH, P.K. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. San Diego: Academic Press, Inc., 1992.
- HO, N.W.Y., LIN, F.P., HUANG, S., ANDREWS, P.C., PSAO, G.T. Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.*, v.12, p.33-39, 1990.
- HORITSU, H., YAHASHI, Y., TAKAMISAWA, K., KAWAI, K., SUZUKI, T., WATANABI, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.*, v.40, p.1085-1091, 1992.
- HORWATH, W.R., C. van KESSEL. Reassessing soil N availability and fertilizer recommendations under alternative rice residue management practices. *Annual Report, Comprehensive Rice Research*. University of California and U.S. Department of Agriculture, 1998.
- HUDDLESTON, J., VEIDE, A., KÖHLER, K., FLANAGAN, J., ENFORS, S.O., LYDDIATT, A. The Molecular Basis of Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *Trends in Biotechnology*, v. 9, p. 381-388, 1991.
- HUDDLESTON, J.G., WANG, R., FLANAGAN, J.A., O'BRIEN, S., LYDDIATT, A. Variation of protein partition coefficients with volume ratio in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. A*, v. 668, p.3-11, 1994.

- HUJOEL, P.P., MÄKINEN, K.K., BENNETT, C.A., ISOKANGAS, P.J., ISOTUPA, K.P., PAPE, H.R., JR., LAMONT, R.J., DEROUEN, T.A. AND DAVIS, S. 1996. Do caries explorers transmit infections within persons? – an evaluation of second molar caries onsets. *Caries Research*. v.29, p.461-466, 1995.
- HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P. VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. *Adv. Food Research*, v. 28, p. 373-403, 1982.
- ILLANES, A. *Biotecnologia de Enzimas*. Ed. Universitária de Valparaíso, 1994. p.10-30.
- ISOKANGAS P., SÖDERLING E., PIENIHÄKKINEN K., ALANEN P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum,, a follow-up from 0 to 5 years of age. *J. Dental Research*, v.79, p.885-889, 2000.
- JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. *Adv. Biochem. Eng.*, v. 27, p. 1-32, 1983.
- JOHANSSON, H-O., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F., HAYNES, C.A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, v.711, p.3-17, 1998.
- JOHANSSON,G. In: BROOKS, D.E., WALTER, H., FISHER, D. *Partitioning in Aqueous Two Phase Systems*. Orlando: Academic Press, 1985.
- KAUL, A. The phase diagram. In: HATTI-KAUL. *Methods in Biotechnology*. V.11: *Aqueous Two-phase Systems. Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc.,2000.
- KILIKIAN, B.V., BASTAZIN, M.R., MINAMI, N.M., GONÇALVES, E.M.R., PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological processes. *Brazilian J. Chem. Eng.*, v. 17, n.1, p.29-38, 2000.
- KISE, S., KOIZUMI, N., MAEDA, H. Properties of NAD(P)H-linked aldose reductase from *Cryptococcus lactativorus*. *J. Ferment. Technol.*, v.66, n.6, p.615-623, 1988.
- KITPREECHAVANICH, V., HAYASHI, M., NISHIO, N., NAGAI, S. Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from methanogen strain. *Biotechnol. Lett.*, v. 6, n. 10, p. 651-656, 1984.

- KLEIN, J.O. Nonimmune strategies for prevention of otitis media. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v.19, suppl. 5, p.89-32, 2000.
- KOPPERSCHLÄGER, G., KIRCHBERGER, J. Dye-ligand affinity partitioning of proteins. In: HATTI-KAUL. *Methods in Biotechnology. V.11: Aqueous Two-phase Systems. Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc., 2000.
- KUHN, A., van ZYL, C., van TONDER, A., PRIOR, B.A. Purification and partial characterization of an Aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, n.4, p.1580-1585, 1995.
- KULA, M.R., KRONER, K.L., HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In: FIECHTER A. *Advances in Biochemical Engineering*. New York: Springer-Verlag, 1982.
- KULA, M-R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, v.1, p.181-189, 1990.
- KULA, M.R., KRONER, K.H., HUSTED, H. Purification of Enzymes by Liquid-liquid Extraction. In: Fiechter A., *Adv. Biochem. Eng.* v.24, p.73-118, 1982.
- LAGACE, E. Xylitol for prevention of acute otitis media. *Journal of Family Practise*. p. 48-49, 1999.
- LAMARCA, C., LENHOFF, A.M., DHURJATI, P. Partitioning of Host and Recombinant Cells in Aqueous Two-Phase Polymer Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 36, p. 484-492, 1990.
- LEE, H., SOPHER, C.R., YAU, K.Y.F. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v.66, p.375-379, 1996.
- LU, J., TSAI, L.B., GONG, C-S., TSAO, G.T. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L-102. *Biotechnol. Lett.*, v.17, n.2, p.167-170, 1995.
- MÄKINEN, K.K. Xylitol – a procedure of caries prophylaxis for the new generation. *Revista Brasileira de Odontologia*. v.15, p. 4-50, 1983.

- MAKINEN K.K., OLAK, J., RUSSAK, S., SAAG, M., SEEDRE, T., VASAR, R., VIHALEMM, T., MIKELSAAR, M. AND MÄKINEN, P.-L. Polyol-combinant saliva stimulants: a 4-month pilot study in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica*, v.56 p.90-94, 1998.
- MAKINEN, K.K. Sweeteners and prevention of dental caries with special reference to xylitol. *Oral Health*, v.78, p.57-66, 1988.
- MAKINEN, K.K. Xylitol and oral health. *Adv. Food Research*, v. 25, p. 137-158, 1979.
- MATILLA, P. *Dietary xylitol in the prevention of experimental osteoporosis. Beneficial effects on bone resorption, structure and biomechanics*. Oulu: Oulu University Library. 1999. 67p.
- MAYERHOFF, Z.D.V.L. *Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz: Seleção de leveduras e determinação de parâmetros fermentativos por modelagem estatística*. Lorena: FAENQUIL, 1997. 94p. (Dissertação de Mestrado).
- MAYERHOFF, Z.D.V.L., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S. Production of xylitol by *Candida mogii* from rice straw hydrolysate. Study of environmental effects using statistical design. *Appl. Biochem. Biotech.*, v.70/72, p.149-159, 1998.
- MAYERHOFF, Z.D.V.L., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnol. Lett.*, v.19, n.5, p.407-409, 1997.
- MEINANDER, N., HAHN-HÄGERDAHL, B., LINKO, M., LINKO, P., OJAMO, O. Fed-batch xylitol production with recombinant xyl-1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* using ethanol as co-substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.42, p.334-339, 1994.
- MELAJA, J., HÄMÄLÄINEN, L. *Process for making xylitol*. U.S. n.4.008.285, 15 fev., 1977.
- MENGE, U. Optimization of extractions in aqueous two-phase systems. *Methods in Biotechnology. V.11: Aqueous Two-phase Systems. Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc., 2000.

- MEYRIAL, V., DELGENES, J.P., MOLETTA, R., NAVARRO, J.M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. *Biotechnol. Lett.*, v.13, n.4, p.281-286, 1991.
- MIDDELBERG, A.P.J., O'NEIL, B.K., BOGLE, I.D.L. A new model for the disruption of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization. Part I. Model development and verification. *Trans IchemE*, v.70, Part C, p.205-211, 1992.
- MORIMOTO, S., TAWARATANI, T. AZUMA, K., OSHIMA, T., SINSKEY, A.J. Purification and properties of aldose reductase from *Pachysolen tannophilus*. *J. Ferment. Technol.*, v.65, n.1, p.17-21, 1987.
- NIDETZKY, B., NEUHAUSER, W., HALTRICH, D., KULBE, K.D. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, v.52, p.387-396, 1996.
- NIGAM, P., SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. *Process Biochem.*, v. 30, n. 2, p. 117-124, 1995.
- NOLLEAU, V., PREZIOSI-BELLOY, L., NAVARRO, J.M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. *Biotechnol. Lett.*, v.17, n.4, p.417-422, 1995.
- OJAMO, H., YLINEN, L. LINKO, *Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivation of Candida guilliermondii*. WO n.88/05467, 28 jul., 1988.
- OLIVEIRA, G.G.G., SILVA, D.P., ROBERTO, I.C., VITOLO, M., PESSOA-Jr, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas*, v.37, n.2, 2001.
- OTTO, A., LORENZ, G., KOPPERSCHLAEGGER, G. Partitioning of Streptokinase in Aqueous Two-Phase Systems. *Bioseparation*, v.5, p.35-40, 1995.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Charcoal adsorption of wood hydrolysates for improving their fermentability: Influence of the operational conditions. *Biores. Technol.*, v.57, p.179-185, 1996.

- PEPPER, T., OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.*, v., p.98-106, 1988.
- PERSSON, J., JOHANSSON, H-O., TJERNELD, F. Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers. *J. Chromatogr. A*, v.864, p.31-48, 1999.
- PERSSON, J., NYSTRÖM, H., AGELAND, H., TJERNELD, F. *J. Chromatogr. B*, v. 711, p.97, 1998.
- PIZA, F.A.T., SILOTO, A.P., CARVALHO, C.V., FRANCO, T.T. Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. *Brazilian J. Chem. Eng.*, v.16, n.2, p.185-192, 1999.
- RIZZI, M., HARWART, K., BUI-THANH, N-A., DELLWEG, H. A kinetic study of the NAD⁺-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.67, n.1, p.25-30, 1989.
- ROBERTO, I.C. *Utilização da Fração Hemicelulósica de Palha de Arroz para Obtenção de Xilitol por Processo Fermentativo*. São Paulo: USP/FCF, 1997. 150p. (Tese de Doutorado)
- ROBERTO, I.C., FELIPE, M.G.A., LACIS, L., SILVA, S.S., MANCILHA, I.M. utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Biores. Technol.*, v. 36, n. 3, p. 271-275, 1991.
- ROBERTO, I.C., FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M., VITOLO, M., SATO, S., SILVA, S.S. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Biores. Technol.*, v.51, p.255-257, 1995.
- ROSA, S.M.A., FELIPE, M.G.A., SILVA, S.S., VITOLO, M. Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotech.*, v.70/72, p.127-135, 1998.
- ROSEIRO, J.C., PEITO, M.A., GÍRIO, F.M., AMARAL-COLLAÇO, M.T. The effects of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.*, v.156, p.484-490, 1991.

- SALAMANCA, M.H., MERCHUK, J.C., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. On the kinetics of phase separation in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, v.711, p.319-329, 1998.
- SCHMIDT, A.S., VENTOM, A.M., ASENJO, J.A Partitioning and Purification of α -amilase in Aqueous Two-phase Systems. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 16, p. 131-141, 1994.
- SCOPES, R.K. *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, 1994.
- SILVA, M. E., FRANCO, T. T. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing – a review paper. *Brazilian J Chem Eng.* V.17, p.1-17, 2000.
- SILVA, M. E., FRANCO, T. T. Purification of soybean peroxidase (Glycine max) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr. B.* , v.743, p.235-239, 2000.
- 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*. *J. Basic Microbiol.*, v.36, n.3, p.187-191, 1996.
- SINHA, R., SINGH, S.P., AHMED, S., GARG, S.K. Partitioning of a *Bacillus alkaline* Protease in Aqueous Two-Phase Systems. *Biores. Technol.*, v.55, p.163-166, 1996.
- SIRISANSANEEYAKUL, S., RIZZI, M., REUß, M. Microbial production of xylitol from wheat straw hydrolysates. ANNUAL MEETING OF BIOTECHNOLOGISTS, 10. Jun. 1-3, 1992.
- SIRISANSANEEYAKUL, S., STANISZEWSKI, M., RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *J. Ferment. Bioeng.*, v.80, n.6, p.565-570, 1995.
- SMILEY, K.L., BOLEN, P.L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.*, v.4, n.9, p.607-610, 1982.
- SNYDER, S.M., COLE, K.D., SZLAG, D.C. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, v.37, p.268-274, 1992.

- SODERLING E., ISOKANGAS P., PIENIHÄKKINEN K., TENOVUO J., ALANEN P.
Influence of maternal xylitol consumption on mother -child transmission of mutans streptococci: 6-year follow-up. *Caries Research*, v.35, p.173-177, 2001.
- SRINIVASAN, M.C. RAMARAO, R., DESHMUKH, S.S., SAHASRABUDHE, N.A..
Microbial biomass production from rice straw by fermentation with *Penicillium janthinellum*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 5, n. 4, p.269-272, 1983.
- TENOVUO, J. AND SÖDERLING, E. Chemical aids in the prevention of dental diseases in the elderly. *International Dental Journal*, v.42, p.335-364, 1992.
- TJERNELD, F., BERNER, S., CAJARVILLE, A., JOHANSSON, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 8, p. 417-423, 1986
- UHARI M., TAPIAINEN T., KONTIOKARI T. Xylitol in preventing acute otitis media. *Vaccine*, v.19, Suppl.1, p.144-147, 2000.
- VANDESKA, E., AMARTEY, S., KUZMANOVA, S., JEFFRIES, T.W. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *World J. Microbiol. Biotech.*, v.11, p.213-218, 1995.
- VERDUYN, C., van KLEEF, R., FRANK, J., SCHREUDER, H. van DIJKEN, J.P., SCHEFFERS, W.A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.*, v.226, p.669-677, 1985.
- VONGSUVANLERT, V., TANI, Y. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp) No. 2201. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 67, n. 1, p. 35-39, 1989.
- WASHÜTTL, J., RIEDERER, P., BANCHER, E.A. Qualitative and quantitative study on sugar-alcohols in several foods. *J. Food Sci.*, v. 38, p. 1262-1263, 1973.
- WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *J. Ferment. Bioeng.*, v.86, n.1, p.1-14, 1998
- WOODROW, J.R., QUIRK, A.V. Evaluation of the potential of a bead Mill for the release of intracellular bacterial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, v.4, p.385-389, 1982.

- YILIKARI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. *Adv. Food Research*, v. 25, p. 159-180, 1979.
- YOKOYAMA, S-I., SUZUKI, T., KAWAI, K., HORITSU, H., TAKAMIZAWA, K. J. *Ferment. Bioeng.*, v. 79, n. 3, p. 217-223, 1995.
- YOSHITAKE, J., SHIMAMURA, M., IMAI, T. Production of polyalcohol by a *Corynebacterium* sp. 2. Xylitol production by a *Corynebacterium* species. *Agr. Biol. Chem.*, v. 37, n. 10, p. 2251-2259, 1973.
- YOSHITAKE, J., SHIMAMURA, M., ISHIZAK, H., IRIE, Y. Xylitol production by *Enterobacter liquefaciens*. *Agr. Biol. Chem.*, v. 40, n. 8, p. 1493-1503, 1976.

ANEXO A

Este anexo descreve a metodologia empregada para a determinação das linhas de amarração e curvas binodais para os sistemas compostos por polietilenoglicol e fosfato de sódio/potássio.

DETERMINAÇÃO DAS CURVAS BINODAIS E DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO DOS SISTEMAS A SEREM EMPREGADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2² COMPLETO COM FACE CENTRADA PARA EXTRAÇÃO DA XR EM SDFA

Com base nos resultados obtidos na seleção de variáveis para o estudo de extração da XR em SDFA, uma nova variável foi escolhida para ser empregada nos estudos posteriores: as variáveis concentração de polímero e concentração de fosfato, que são interdependentes na formação das fases do sistema, passaram a ser avaliadas através de uma única variável, o comprimento da linha de amarração ou "tie-line length" (TLL). Esta variável determina as concentrações finais dos componentes do sistema em cada uma das fases, ao invés de apenas a concentração inicial, como foi estudado anteriormente. Para o emprego desta variável, fez-se necessária a determinação das curvas binodais e das linhas de amarração para os sistemas compostos pelos polímeros a serem estudados.

Para a determinação das curvas binodais, foi utilizada a metodologia descrita por Snider *et al* (1992). Os sistemas foram preparados empregando os polímeros polietilenoglicol de massa molar 600 ou 1500 e tampão fosfato de sódio/potássio no pH 6,5, valor ótimo determinado para a atividade enzimática da xilose redutase. A curva binodal e as linhas de amarração para o polímero PEG 1000 foram estimadas por interpolação dos dados obtidos experimentalmente para os polímeros de massa molar 600 e 1500.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação das Soluções-Estoque dos Polímeros e do Tampão

A solução de PEG 1500 foi preparada pela dissolução de uma determinada quantidade do polímero em água deionizada, sob constante agitação em agitador magnético. A água foi adicionada em pequenos volumes previamente pesados até a completa dissolução das escamas. A massa de água utilizada foi calculada e a concentração de 48,6 % p/p foi, assim, determinada.

O PEG 600 (líquido à temperatura ambiente), foi dissolvido em água deionizada para 50% p/p, reduzindo-se, assim, a sua viscosidade, o que facilita o seu manuseio.

O tampão de fosfato de sódio/potássio foi preparado pesando-se massas de fosfato de sódio monobásico e de fosfato de potássio dibásico na razão mássica 0,62, e, em seguida, adicionando-se água deionizada, sob agitação constante, até a completa dissolução dos cristais. A concentração obtida foi de 40% p/p. O pH de 6,5 foi conferido.

Preparo dos Sistemas de Duas Fases Aquosas para a Determinação das Linhas de Amarração e das Curvas Binodais

Para cada polímero (PEG 600 ou 1500) foram preparados cinco diferentes sistemas de duas fases, cujas concentrações iniciais de polímero e sal foram escolhidas de forma a ficarem distribuídas dentro da região bifásica das curvas previamente determinadas por COSTA (1998) para sistemas PEG/fosfato de Potássio. As composições dos sistemas preparados estão mostradas na Tabela 1.

Tabela1 – Composição total dos sistemas PEG/fosfato empregados na determinação das curvas binodais e linhas de amarração para os polímeros PEG 600 e PEG 1500

Sistemas	PEG 600		PEG 1500	
	PEG (% p/p)	Fosfato (% p/p)	PEG (% p/p)	Fosfato (% p/p)
1	9,5	17,0	7,8	13,0
2	12,4	17,0	10,2	13,0
3	16,0	17,0	12,7	13,0
4	20,2	17,0	14,8	13,0
5	25,6	17,0	17,8	13,0

Os componentes destes sistemas foram pesados em Béqueres, agitados em agitador magnético e pipetados para buretas, onde foram deixados até atingirem o equilíbrio de fases (volumes das fases constantes). As fases foram, então, coletadas separadamente e analisadas.

Determinação da Concentração de PEG e Sal nas Fases dos Sistemas

As amostras das fases coletadas foram congeladas a $-67\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h e liofilizadas (equipamento da marca Edwards, modelo Super Modulyo) sob vácuo de 10^{-1} mbar para a retirada da água. As amostras foram liofilizadas por um total de aproximadamente 20h, até estabilização das pesagens consecutivas em balança analítica. Em seguida, as mesmas foram calcinadas em mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 18h, até peso constante.

A massa residual correspondeu ao conteúdo de sal da amostra. A massa de PEG foi calculada pela diferença entre a amostra liofilizada e a amostra calcinada. As concentrações percentuais de PEG e sal nas amostras foram calculadas com base na massa inicial das mesmas.

Determinação das Linhas de Amarração

As linhas de amarração foram plotadas empregando-se o ponto referente à composição total dos sistemas e os pontos obtidos com as concentrações de PEG e sal das fases inferior e superior de cada sistema. Os comprimentos das linhas de amarração foram calculados através da equação:

$$CLA = \sqrt{(P_S - P_I)^2 + (F_S - F_I)^2}$$

onde: CLA = comprimento da linha de amarração; P_S = concentração de PEG na fase superior; P_I = concentração de PEG na fase inferior; F_S = concentração de fosfato na fase superior; F_I = concentração de fosfato na fase inferior

Determinação das Curvas Binodais

As curvas foram determinadas através da interpolação dos pontos das fases superiores e inferiores de todas as linhas de amarração obtidas para um mesmo polímero.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de concentração percentual de polímero e sal obtidos para cada sistema, bem como os comprimentos calculados para as linhas de amarração, estão mostrados na Tabela 6.

As Figuras 1 e 2 apresentam as curvas binodais e linhas de amarração determinadas para os polímeros PEG 600 e PEG 1500, respectivamente. As linhas de amarração foram determinadas pelo ajuste de retas usando o método dos mínimos quadrados aos pontos experimentais. As curvas binodais foram determinadas empregando uma interpolação polinomial que melhor se ajustou aos pontos experimentais.

A partir dessas curvas, foram escolhidos os níveis para a variável comprimento da linha de amarração, dentro de uma faixa encontrada em ambos os sistemas (PEG 600 e PEG 1500). As concentrações iniciais dos sistemas avaliados na etapa subsequente do estudo de extração foram escolhidas dentro das linhas de amarração cujos comprimentos atendem aos níveis que foram estabelecidos para esta variável.

Tabela 6 – Concentrações dos polímeros e do fosfato de sódio/potássio determinadas nas fases superior e inferior dos sistemas empregados para a determinação das curvas binodais e linhas de amarração

Polímero	Sistema	CLA	Fase Superior (concentração % p/p)		Fase Inferior (concentração % p/p)	
			Fosfato	PEG	Fosfato	PEG
PEG 600	1	22	6,6	25,1	18,8	6,8
	2	28,3	5,4	29,5	21,2	6,0
	3	34,9	4,2	34,4	23,9	5,5
	4	42,8	2,9	40,7	27,1	5,4
	5	49,6	1,8	46,6	30,0	5,7
PEG 1500	1	18,9	6,0	22,1	14,3	5,1
	2	24,3	5,0	25,8	15,8	4,0
	3	29,3	4,3	29,0	17,9	3,1
	4	34,9	3,3	33,7	19,4	2,7
	5	39,9	2,5	37,8	21,3	2,6

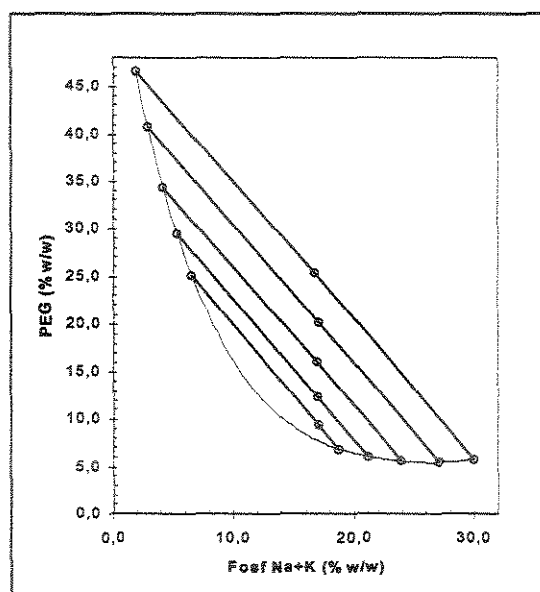


Figura 1 – Curva binodal e linhas de amarração determinadas para os sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG 600 e fosfato de sódio e potássio

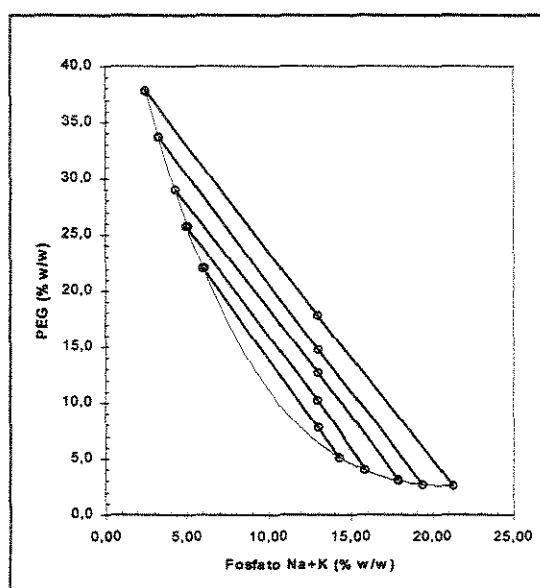


Figura 2 – Curva binodal e linhas de amarração determinadas para os sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG 1500 e fosfato de sódio e potássio