

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0803481-8 A2**

(22) Data de Depósito: 19/09/2008  
(43) Data da Publicação: 15/06/2010  
(RPI 2058)



(51) *Int.Cl.:*  
C12P 7/18

(54) Título: **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA XILOSE ATRAVÉS DE BIOCONVERSÃO ENZIMÁTICA EM REATOR COM MEMBRANA**

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade de São Paulo-USP

(72) Inventor(es): Ester Junko Yoriyaz, Maria das Graças de Almeida Felipe, Michele Vitolo

(57) Resumo: A presente invenção refere-se ao método de obtenção de xilitol a partir da bioconversão multienzimática da xilose com utilização de enzimas, por exemplo, xilose redutase (XR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em um reator com membrana de ultrafiltração. Adicionalmente, o presente pedido ainda provê os usos do xilitol resultante do dito processo em indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica.



**“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA XILOSE ATRÁVES DE BIOCONVERSÃO ENZIMÁTICA EM REATOR COM MEMBRANA”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5                   A presente invenção refere-se ao método de obtenção de xilitol a partir da bioconversão multienzimática da xilose com utilização de enzimas, por exemplo, xilose redutase (XR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em um reator com membrana de ultrafiltração. Adicionalmente, o presente pedido ainda provê os usos do xilitol  
10                   resultante do dito processo em indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

                  As bioconversões são reações químicas catalisadas por enzimas, células ou organelas celulares e executadas em meio com alta  
15                   ou baixa atividade de água, vêm apresentando interesse crescente na síntese orgânica.

                  O sucesso da biocatálise se deve ao fato da transformação poder ser rigorosamente controlada e conduzida de modo contínuo sob condições brandas de pH e temperatura, favorecendo a manipulação de  
20                   substâncias sensíveis a condições extremas de processo. Associam-se, também, a alta seletividade (do ponto de vista químico, da regioseletividade e enantioseletividade), a formação de efluentes menos tóxicos e facilmente tratáveis e a possibilidade de se executarem reações simultâneas. A disponibilidade de biocatalisadores tem  
25                   aumentado em decorrência dos avanços da biotecnologia (novas técnicas de cultivo celular, isolamento e manipulação genética: cruzamentos, mutações, DNA recombinante, hibridoma), resultando em

aumento do número de aplicações em processos industriais, por exemplo, a conversão da insulina suína em humana, a produção de aspartame, acrilamida e penicilinas semi-sintéticas.

Outro aspecto é a competição vantajosa da biocatálise, quando possível de ser aplicada, frente aos processos tradicionais de extração (fortemente dependente da disponibilidade da matéria-prima e baixo rendimento em produto final), fermentação (só é econômica, quando se operam grandes volumes) e de síntese química (mais poluente, maior consumo de energia, menos enantiosseletiva).

A eficiência da biocatálise depende do binômio biocatalisador/biorreator.

Os biorreatores são equipamentos nos quais os agentes de natureza biológica (células, enzimas, organelas celulares ou anticorpos) são utilizados para transformar um dado substrato em produto. Em termos operacionais o biorreator pode ser do tipo descontínuo ou contínuo.

O biorreator descontínuo, no qual o tempo de residência é igual para reagentes, produtos e catalisador, é preferido nos casos em que o biocatalisador é barato, não requer co-fator ou possui meia-vida curta. Apesar de ser o tipo mais simples para operar e modelar tem o inconveniente de dificultar ou até mesmo impossibilitar a recuperação do biocatalisador no final do processo. No caso do biocatalisador ser solúvel, uma enzima, por exemplo, dever-se-ia adaptar na linha de saída uma unidade de ultrafiltração, a qual permitiria recuperá-lo e reciclá-lo no processo. Por outro lado, se o biocatalisador é suscetível à inibição por substrato, passa a ser recomendável o emprego do processo descontínuo-alimentado, porque ao se adicionar o substrato

paulatinamente ter-se-ia a possibilidade de manter sua concentração abaixo do limite inibitório.

O biorreator contínuo surgiu como uma extensão aplicativa da técnica de imobilização de biocatalisadores, introduzida efetivamente no início da década de setenta. Com o biocatalisador ligado por método físico ou químico em matrizes inertes e insolúveis foi possível operar biorreatores contínuos com diferentes configurações, a saber, colunas com o material imobilizado empacotado (reator de fluxo pistonado) ou mantido suspenso em meio líquido através da alimentação da solução substrato sob pressão gerada por bomba peristáltica (reator de leito fluidizado).

Uma variante para manter o biocatalisador imobilizado em suspensão é o biorreator de tanque continuamente agitado (CSTR), cuja configuração básica seria a de um reator descontínuo, ao qual se adaptou um sistema contínuo de introdução e de retirada de material. Os biorreatores dos tipos leito fluidizado e tanque continuamente agitado não possuem problemas relacionados ao estabelecimento de gradientes radiais ou axiais de pH, temperatura e concentrações de substrato e produto.

Em geral, o biorreator tipo tanque continuamente agitado acaba sendo a primeira escolha para o desenvolvimento de um novo processo, porque possui grande flexibilidade operacional (por exemplo, pode-se trabalhar com um amplo intervalo de velocidades de agitação) e de utilização (não é desenhado para um processo em particular, podendo, inclusive, ser usado na configuração descontínua).

No contexto dos biorreatores contínuos, o biorreator com membrana (BM), pode ser configurado de dois modos distintos, tal

como, um reator continuamente agitado (CSTR) ao qual se acopla uma membrana ou um recipiente cilíndrico desprovido de sistema de agitação contendo grande número de membranas de filtração tangencial do tipo fibra oca dispostas em um arranjo tipo feixe. Este último tipo de BM é conhecido pelo nome “hollow-fiber reactor” (HFR).

Segundo GIORNO e DRIOLI, (GIORNO, L., & DRIOLI, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: Applications and perspectives. Trends in Biotechnology, 18(8), 339–349) em um biorreator com membrana, que não o HFR, o arranjo biocatalisador/membrana pode ser de dois tipos. Em um deles o biocatalisador não está ligado à membrana, a qual, neste caso, atua como uma unidade de separação, impedindo o escape do biocatalisador no permeado. No outro tipo, o biocatalisador encontra-se unido à membrana, a qual atua tanto como sítio de catálise quanto como unidade de separação. Quando não há interação entre o biocatalisador e a membrana, têm-se as situações em que a membrana está em um módulo acoplado em série ao biorreator (caso de um CSTR típico), sendo o biocatalisador impelido e removido continuamente de sua superfície (caso em que o biocatalisador é reciclado ao CSTR) ou o biocatalisador é confinado dentro do módulo com a membrana (caso em que não há reciclo do biocatalisador).

Existe, ainda, o arranjo em que o CSTR tem uma membrana como integrante de sua base (nesta configuração o sistema funciona como CSTR e módulo de separação simultaneamente, sem a necessidade de reciclo). Quando existe união entre o biocatalisador e a membrana, pode-se ter o biocatalisador aprisionado na membrana, depositado na forma de gel sobre a superfície da membrana ou ligado através de interação química (adsorção, ligação iônica ou ligação

covalente). Para este caso, pode-se, também, dispor de um único sistema CSTR/módulo de separação.

Os biorreatores com membrana aparecem como alternativa viável aos reatores tradicionais de enzimas imobilizadas (leito fixo, CSTR-Tradiciona

5 CSTR-Tradiciona

leito fluidizado), já que o biocatalisador não precisa estar necessariamente ligado a um suporte insolúvel. Neste último aspecto, diferencia-se do reator agitado tradicional (CSTR-TRAD), embora mantenha todos os atributos favoráveis deste tipo de reator contínuo. Lembra-se que o BM, em princípio, permite integrar em uma

10 única etapa a conversão catalítica, a separação/concentração do produto e a recuperação do biocatalisador. Estes aspectos podem promover significativa produtividade e redução de custos por ocasião da ampliação de escala. O BM apresenta as seguintes vantagens: catálise homogênea, ausência de limitações difusionais, estéricas e

15 conformacionais, alta atividade por unidade de volume, possibilidade de se trabalhar em condições assépticas, produtividade constante garantida pela constância da dosagem da enzima e possibilidade de uso de sistemas multienzimáticos.

Os primeiros estudos sobre os biorreatores com membrana

20 tiveram início em 1970, resumindo-se na tentativa de hidrolisar o amido à glicose, usando  $\alpha$ -amilase retida em um sistema de filtração convencional. O principal problema observado relacionou-se à concentração de polarização da membrana, acarretando diminuição do fluxo ao longo do tempo e perda da enzima. O BM só começou a se

25 tornar viável após os avanços ocorridos na tecnologia de membranas, as quais passaram a ser produzidas com espessura adequada, diâmetro e formato dos poros uniformes (microfiltração: 0,1 – 0,5 $\mu$ ; ultrafiltração:

0,001 $\mu$  - 0,1 $\mu$ ; nanofiltração: menor que 2 nm), além das características químicas definidas das mesmas (hidrofílicas, hidrofóbicas, neutras ou carregadas), as quais resultam da natureza dos materiais empregados, a saber, polímeros orgânicos (por exemplo, polisulfonas, celulose, acetato de celulose, politetrafluoretileno) e inorgânicos (representados basicamente pelas cerâmicas porosas).

O BM configurado como CSTR é o mais usado, podendo-se identificar estudos recentes preconizando sua aplicação na obtenção de ciclodextrinas, frutoligossacarídeos, catecol, proteólise da caseína, da hemoglobina e síntese de ésteres.

Ainda, de acordo com GIORNO e DRIOLI, (GIORNO, L., & DRIOLI, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: Applications and perspectives. Trends in Biotechnology, 18(8), 339–349) identificou-se o uso do BM nos setores agro-alimentar (na hidrólise da pectina por pectinase em sucos de fruta, em enologia, na remoção da lactose do soro e/ou leite integral e modificação de óleos e gorduras), químico-farmacêutico (dentre outros, citam-se a título de exemplos, as conversões do ácido fumárico e L-aspartico, respectivamente, em ácido L-aspartico e L-alanina, a obtenção do ibuprofeno a partir de seu cianoéster e a obtenção de oligonucleotídeos a partir de DNA) e biomédico (órgãos artificiais para uso extra-corpóreo).

A versatilidade do BM se reflete no grande número de processos desenvolvidos até agora, para a obtenção dos mais variados produtos, tais como: hidrolisados de caseína e de hemoglobina, ciclodextrinas, frutooligossacarídeos, catecol e ésteres. Inclusive os BM estão sendo preconizados para uso no tratamento da água.

O BM configurado desta maneira foi descrito na patente americana US 4.304.858, de propriedade da Degussa AG/GBF, visando o seu uso industrial em processo contínuo para a produção de L-aminoácidos (metionina e valina), estando a aminoacilase retida em  
5 uma membrana de ultrafiltração.

O BM configurado como HFR mostrou-se útil no caso de se usar células íntegras (de origem animal ou microbiano) como biocatalisadores. O HFR, atualmente, está sendo preconizado no tratamento de águas residuais, usando o lodo ativado como  
10 “biocatalisador” ou, ainda, como simples sistema de microfiltração, bem como de ultrafiltração para a sanitização da água e quando combinado com o tratamento biológico prévio da biomassa, a conjunção deste com o uso da membrana mostrou-se muito mais eficiente.

Embora o transporte através da membrana possa se dar por  
15 difusão (a separação se baseia, apenas, no gradiente de concentração estabelecido entre as duas faces da membrana) ou por convecção (resultante do estabelecimento de um gradiente de pressão ou temperatura através da membrana), os BM's mais usados, que requerem fluxos elevados, valem-se deste mecanismo de transporte.

20 A direção do fluxo introduzido no BM e a travessia do fluido através da membrana podem ser paralelos, ambos perpendiculares à superfície da membrana, ou perpendiculares entre si (o fluido alimentado tangencia a superfície da membrana e a travessia se dá perpendicularmente à superfície da mesma). Este último padrão de  
25 operação do BM é o mais indicado para evitar o fenômeno da polarização da membrana. Caso se faça o reciclo do efluente, a eficiência do BM é, ainda, mais aumentada. Atualmente o custo das



membranas não afeta substancialmente o custo global do reator, porque são bastante estáveis e podem ser regeneradas várias vezes. Por isso, ao invés de minimizar a área da membrana para um determinado fluxo, prefere-se fornecer área de membrana suficiente para otimizar o tempo de operação de um BM.

Apesar da retenção de enzimas por membranas e a imobilização em suportes sólidos serem consideradas duas técnicas distintas de retenção do biocatalisador, a linha divisória entre elas não é nítida, sobretudo quando se imagina a membrana como uma superfície de imobilização, sendo o BM, neste caso, considerado como um tipo especial de reator para enzimas imobilizadas.

Finalmente, os biorreatores de membrana podem ser utilizados em escala de laboratório para monitoramento contínuo da atividade de enzimas, avaliando-se a desativação por pH ou pela temperatura em condições operacionais. Pode ser útil, também, na identificação de mecanismos de inibição enzimática. Em escala industrial para recuperação e reutilização de biocatalisadores solúveis, na facilidade de separação dos produtos e como técnica de reator de enzimas imobilizadas com elevada área superficial.

A xilose redutase (XR) de *Candida guilliermondii* é uma aldo-ceto redutase com massa molar de 36 kDa, formada por uma cadeia peptídica, requer o co-fator NADPH, pI 5,7,  $pH_{ótimo}$  7,2, estável em  $5,5 < pH < 7,5$ , estável até 45°C,  $K_M$  (xilose)  $6,4 \times 10^{-2} \text{mM}$  e  $K_M$  (NADPH)  $9,5 \times 10^{-3} \text{m}$ . Apesar de estar sendo amplamente estudada recentemente, inclusive com sua estrutura já estabelecida, ainda não é encontrada no comércio, devendo, por isso, ser obtida em laboratório através do cultivo descontínuo da *Candida guilliermondii*. Nesta linha,

KITPREECHAVANICH e seus colaboradores (KITPREECHAVANICH, V., HAYASHI, M., NISHIO, N., NAGAI, S. (1984). Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with the oxireductase system of methanogen strain Hu. Biotechnology Letters, 6(10), 651-656) reportou a produção de xilitol a partir de XR de *Candida pelliculosa* (usando células ou extrato livre de células) acoplado a um sistema de óxido-redução de *Methanobacterium sp* (NADP → NADPH, sendo o H<sub>2</sub> o doador de elétrons), usando uma proporção co-fator reduzido/xilose de 1/30 e NIDETZKY e seus colaboradores (NIDETZKY, B., NEUHAUSER, W., HALTRICH, D., KULBE, K.D. (1996). Continuous enzymatic production with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. Biotechnology & Bioengineering, 52, 387-396) utilizou em reator descontínuo o sistema acoplado xilose redutase/NADH//glicose desidrogenase/NAD, obtendo 96% de conversão. Executando a reação de modo contínuo em reator com membrana, obtiveram produtividade de 80g de xilitol/L.dia, sem a necessidade de repor o co-fator por um período de 150 dias. Estes resultados depõem a favor da exploração de outros arranjos para executar a bioconversão xilose/xilitol, como o uso de reator com membrana uni-modular (BMU), co-fator imobilizado e diferentes enzimas auxiliares.

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, G6PDH, (D-glicose-6-fosfato: NADP-oxidorreductase) é encontrada em células animais, vegetais e microorganismos, podendo se destacar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A enzima é a primeira do processo oxidativo da via pentose-fosfato convertendo a glicose-6-fosfato a 6-fosfoglicono-δ-lactona, sendo classificada bioquimicamente como oxidorreductase.

A G6PDH é de grande importância para a sobrevivência das células, uma vez que é responsável pela manutenção de um nível adequado da coenzima reduzida NADPH e participa da regulação do ciclo das pentoses. A necessidade celular por G6PDH está relacionada ao fornecimento de NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH é usado em biossínteses redutoras, enquanto que a ribose-5-fosfato é usada na síntese de DNA e RNA.

Na maioria dos microrganismos, a G6PDH apresenta uma subunidade com massa molar de 50-60 kDa, correspondendo aproximadamente a 500 aminoácidos. Esta enzima aparece normalmente na forma de dímeros ou tetrâmeros, sendo que as G6PDHs provenientes de *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae* são dímeros. O pH ótimo de atividade da enzima é 7,8 e o ponto isoelétrico é 4,6. A enzima nativa pura é estável durante muitas semanas tanto a 0°C como a 20°C. Pode, ainda ser mantida por muitas horas a 40°C, sem apreciável perda de atividade.

O mercado da enzima G6PDH movimentou 7 milhões de dólares no mercado mundial de kits, no ano de 1995, e foi a quarta enzima mais comercializada para esse fim. Esses kits podem ser utilizados para medidas de teores de glicose, frutose, manose, ATP e de atividade enzimática de hexoquinase e creatino-quinase. Usando a G6PDH, é possível determinar glicose na presença de outros sacarídeos, como a frutose. Além disso, a G6PDH pode ser empregada para a determinação de glicose em sistema de reator em fluxo contínuo, pois o NADPH formado pela reação enzimática pode ser facilmente detectado espectrofotometricamente ou fluorimetricamente.

Essa enzima pode ainda detectar baixíssimos níveis de estreptavidina e biotina por ensaios de bioluminescência em reações de hibridização de DNA, sem perda da atividade enzimática. Como biossensor, a G6PDH pode monitorar rapidamente a concentração de G6P (glicose-6-fosfato) no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia. Esse monitoramento é importante porque ele pode refletir diretamente a atividade relativa da G6PDH na via metabólica e tem sido utilizado por possibilitar o controle de G6PDH em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos.

O xilitol é um poliol de massa molecular 125,15 g/mol ( $C_5H_{12}O_5$ ), índice de dulçor semelhante ao da sacarose, PF 92-96°C, PE 216°C, hidrossolúvel (169g/100g  $H_2O$  a 20°C), pH 5,0-7,0 (solução 5% p/v), densidade 1,03g/mL (solução 10% p/v), viscosidade 1,23 cP (solução a 10% p/v), calor de dissolução -34,8 cal/g, valor calórico 4 Kcal/g e estável nas condições usuais de processamento de alimentos.

O xilitol é utilizado como componente de formulações alimentícias, odontológicas e farmacêuticas. Em alimentos é usado como adoçante em produtos dietéticos (indicados para diabéticos, porque o metabolismo do xilitol independe da ação da insulina) e em confeitos (balas “Smints®”, chiclete “Trident®”, por exemplo); em odontologia na formulação de cremes dentais pelas suas propriedades não cariogênica (os microrganismos bucais não o metabolizam), efeito refrescante ao paladar (devido ao calor de dissolução ser endotérmico) e possível auxiliar na remineralização de lesões dentárias iniciais; em medicamentos como coadjuvante (adoçante e/ou excipiente) de formulações.

O xilitol ocorre naturalmente em pequenas quantidades em certos frutos e vegetais, sendo sua extração a partir destas fontes economicamente inviável.

5 A xilose com alto grau de pureza, obtida pela hidrólise da hemicelulose de madeiras e purificação do hidrolisado por colunas de troca iônica e fracionamento cromatográfico, é convertida em xilitol através do processo de hidrogenação catalítica (pressão de 50 atm, temperatura entre 80-140°C e níquel como catalisador). Após a hidrogenação, o catalisador é removido empregando sucessivamente a  
10 filtração e a passagem por colunas de troca iônica. O efluente é concentrado, passado em colunas contendo resinas catiônicas e no final o xilitol é recuperado por cristalização fracionada. A principal desvantagem desta via é o custo do xilitol obtido, já que é fortemente influenciado pela necessidade de se empregar xilose com alto grau de  
15 pureza (não pode estar contaminada com galactose, arabinose e manose, açúcares normalmente presentes nos hidrolisados de madeira), a fim de otimizar o rendimento da hidrogenação catalítica. Além disso, durante a hidrogenação uma fração do xilitol pode ser convertida em xilulose, resultando na diminuição do rendimento da reação e devendo  
20 ser removida para não contaminar o produto final. O tratamento dos resíduos resultantes é outro ponto a ser considerado.

Uma outra via para a produção de xilitol é a conversão microbiológica da xilose, utilizando-se diferentes espécies de leveduras, dentre as quais a *Candida guilliermondii*.

25 O processo fermentativo comparado ao da hidrogenação catalítica tem a vantagem de não exigir xilose com alto grau de pureza. A levedura consegue metabolizar a xilose presente em hidrolisados

hemicelulósicos obtidos de diferentes fontes, inclusive de resíduos agroindustriais, tais como, bagaço de cana, palha de arroz e cavacos de eucalipto.

Outros aspectos atraentes da via microbiológica são as menores gerações de resíduos agressivos ao meio ambiente, a plena disponibilidade do substrato, condições operacionais mais brandas, menor consumo de energia no processo como um todo (o gasto maior de energia ocorre na preparação do hidrolisado), menos etapas de purificação (“downstream”) até o produto final (separação das células do caldo fermentado, concentração do caldo e cristalização do xilitol) e a presença de outros açúcares no hidrolisado não impedem a conversão xilose/xilitol, inclusive alguns deles servem até de substrato para a levedura (por exemplo, a arabinose).

A fermentação da xilose (presente no hidrolisado hemicelulósico) pela *Candida guilliermondii* requer o controle de vários parâmetros de processo, a saber, concentração inicial de xilose, pH, temperatura e suprimento de oxigênio. Nos hidrolisados provenientes de resíduos agrícolas encontram-se várias substâncias (glicose, fenóis, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e arabinose, principalmente) que podem influir no crescimento e na produção de xilitol pela levedura. Porém, a maior parte dos contaminantes voláteis é removida pela concentração a vácuo do hidrolisado e a quantidade de ácido acético mantida em nível não inibitório para o crescimento.

Em *Candida guilliermondii* a xilose é isomerizada a xilulose através das reações de redução e oxidação catalisadas pela ação seqüencial da xilose redutase (enzima NAD(P)H-dependente) e da xilitol desidrogenase (enzima NAD(P)-dependente), sendo o xilitol um

metabólito intermediário deste processo. Por conseguinte, para se ter sucesso no aumento da formação de xilitol pela levedura, deve-se favorecer a etapa redutora (xilose  $\rightarrow$  xilitol) frente à etapa oxidativa (xilitol  $\rightarrow$  xilulose). Isto só pode ser conseguido ou através de condições de cultivo bem equilibradas ou pelo uso de levedura mutante (incapaz de produzir a xilitol desidrogenase, sendo, portanto, xilulose dependente).

Até o momento, os esforços para otimizar a formação de xilitol por via microbiológica têm se concentrado no aperfeiçoamento das condições de cultivo, sobretudo, em termos do fornecimento de oxigênio, que no caso da *Candida guilliermondii* deve ser fornecido em quantidade controlada (0,6 vvm). A influência do oxigênio na bioconversão xilose/xilitol está na dependência do estado óxido-redutivo da célula, representado, ao menos em parte, pelo balanço entre as concentrações intracelulares de NADH e NAD e de NADPH e NADP (este afetando diretamente a atividade da xilose redutase intracelular).

Exatamente a dificuldade em se controlar o metabolismo da levedura, visando à formação otimizada do xilitol, muito dependente dos mecanismos de indução e repressão catabólica exercidos pelas oses, constitui-se no fator limitante da aplicação generalizada da via microbiológica. Apesar da ampla literatura existente sobre esta via de produção de xilitol (cultivos descontínuo, descontínuo-alimentado e contínuo, executados em fermentadores com as mais diferentes configurações), ainda, a síntese química com todas as desvantagens apontadas é o processo preferido para a produção industrial deste produto.

Se por um lado há dificuldades para a produção de xilitol, por outro a obtenção de biomassa não é problemática. Sendo a xilose redutase uma enzima constitutiva, e, por conseguinte, a quantidade formada ser função da biomassa produzida, então existe a possibilidade de extraí-la das células e utilizá-la em reator adequado para realizar a bioconversão direta da xilose em xilitol.

A bioconversão da xilose em xilitol em uma única etapa catalisada pela xilose redutase (XR) constitui-se em alternativa viável para as vias química e microbiológica. Esta perspectiva fundamenta-se no fato de poder ser conduzida sob condições operacionais brandas, não gerar resíduos poluentes e não apresentar os inconvenientes da levedura, a saber, usar o xilitol como metabólito intermediário nas reações intracelulares, limitações na transferência de massa (o substrato e o produto devem atravessar membranas) e susceptibilidade aos contaminantes existentes no hidrolisado de resíduos vegetais, sobretudo o ácido acético.

No entanto, a XR de *Candida guilliermondii* exige o NADPH como co-fator na redução da xilose a xilitol, o qual deve ser regenerado durante a catálise, tanto para sustentar a reação (a formação de 1 mol de xilitol requer 1 mol de NADPH) quanto evitar a sua perda, já que é um reagente de custo elevado. Quando se usa a levedura, a regeneração do co-fator é garantida pelo metabolismo celular, mas no caso da enzima livre seu reciclo passa a ser um ponto crítico do processo. Para tanto, procura-se acoplar à reação que o oxida uma capaz de reduzi-lo.

A patente espanhola ES 2.275.437 refere-se a um processo de purificação de xilitol em meios fermentados (obtenção microbiológica) obtidos pela bioconversão de hidrolisados de massa vegetal.



A patente européia EP 527.758 provê no uso da tecnologia de DNA-recombinante, em linhagens de leveduras, no processo de conversão de xilose em xilitol.

5 A patente européia EP 432.015 descreve um processo de separação da xilose a partir de materiais lignocelulósicos por processo químico e físico-químico combinados.

A patente americana US 1.273.498 reivindica um processo de fabricação de xilose e xilitol a partir de material hemicelulósico livre de lignina através da conversão de polissacarídeos em monossacarídeos  
10 através em processos fermentativos.

O pedido de patente americano US 2005/0148055 trata de um método biotecnológico de produção de xilitol utilizando microorganismos capazes de metabolizar xilose em xilitol através da oxidação NADH por enzimas.

15 A patente americana US 5.081.026 refere-se a um método de produção de xilitol a partir de materiais contendo xilose e/ou xilano através de processo fermentativos.

O pedido de patente americano US 2007/0072280 trata da conversão xilose/xilitol por processo fermentativo, utilizando  
20 microrganismos "engenheirados", como a *Escherichia coli*.

Diante de todo o exposto, a Depositante, de forma inesperada, apresenta um processo de obtenção de xilitol por via multienzimática que é um processo alternativo e inovador às vias químicas e fermentativas presentes no estado da técnica.

25

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A figura 1 mostra o gráfico da bioconversão da xilose em xilitol empregando ambas as enzimas no biorreator com membrana

(membrana de ultrafiltração – corte molecular de 500Da ou 30kDa), sendo que ▲ [xilose] alimentada, mg/ml e ■ [xilose] consumida, mg/ml.

A figura 2 representa o fluxograma para a bioconversão da xilose (1-substrato; 2-bomba pistonada/peristáltica; 3 – retentor de bolhas; 4- pressurizador; 5-filtro estéril; 6-reator com membrana com agitador magnético; 7-coletor).

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se ao método de obtenção de xilitol a partir da bioconversão multienzimática da xilose com utilização de enzimas, por exemplo, xilose redutase (XR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em um reator com membrana de ultrafiltração. Adicionalmente, o presente pedido ainda provê os usos do xilitol resultante do dito processo em indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica.

Considerando que as enzimas, devido às suas propriedades inerentes, permitem a obtenção de alta percentagem de conversão em condições brandas, o presente pedido tem como objetivo descrever a aplicação seqüencial e conjunta do sistema xilose redutase/glicose 6-fosfato desidrogenase sobre a xilose, utilizando-se reator com membrana (RM) operado de modo contínuo e em regime permanente.

Em uma primeira realização o presente pedido provê um método de obtenção de xilitol a partir da xilose através de processos descontínuos e/ou contínuos.

Nos processos descontínuos e/ou contínuos de obtenção do xilitol, apresentados a seguir, utiliza-se o bioreator com membrana uni-modular (BMU) com membrana de corte molecular de 100-500 Da e/ou de 10-30 kDa. O sistema é mantido pressurizado, a temperatura é

controlada pela circulação de água na jaqueta de revestimento, sendo a alimentação feita com bomba adequada (peristáltica e/ou pistonada). A faixa de vazão específica de alimentação, definida como a razão entre a vazão volumétrica de alimentação e o volume do reator, varia entre 0,1 a 1 h<sup>-1</sup>.

A obtenção de xilitol da presente invenção, no processo descontínuo, realiza-se pelo (a) emprego de uma solução aquosa (tampão fosfato ou tampão Tris-HCl - pH 4,5-8,5), (b) adição do co-fator (NADP e/ou NADPH) solúvel e/ou imobilizado, em quantidades que variam de 0,1-100 mM, (c) adição das enzimas solúveis xilose redutase (1,0x10<sup>-3</sup>-1,0x10<sup>5</sup> - U/ mL) e G6PDH (1-500 - U/mL), (d) incorporação dos substratos, xilose nas concentrações de 0,1-5,0:1000 m/v e D-glicose 6-fosfato em concentrações de 1-100:10000 m/v e (e) agitação constante de 50 a 500 rotação por minuto por 1 a 10h à temperatura de 20 a 50°C.

Por outro lado, a obtenção do xilitol através do processo contínuo se dá pelas etapas de (a) emprego de solução aquosa (pH 4,5-8,5), (b) adição do co-fator (NADP e/ou NADPH) solúvel ou imobilizado, em quantidades que variam de 0,1 a 100mM, (c) adição das enzimas solúveis xilose redutase (1,0x10<sup>-3</sup>-1,0x10<sup>5</sup> - U/mL) e G6PDH (1-500 - U/mL), (d) alimentação com a solução de substratos, xilose nas concentrações de 0,1-5,0:1000 m/v e D-glicose 6-fosfato em concentrações de 1-10:10000 m/v e (e) agitação constante de 50 a 500 rotação por minuto por pelo menos 12 a 720hs à temperatura de 20 a 50°C.

Em meio ao processo de obtenção de xilitol, do presente pedido, a regeneração do NADPH consumido pela XR é realizada pela

utilização da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) como enzima auxiliar. As razões para a escolha da G6PDH são seu amplo uso como reagente analítico, atividade catalítica de fácil medição, apresentar alta atividade em pH 7 a 8 (mesma faixa que a requerida pela XR), requerer  
5 o NADP como co-fator, não ser inibida pela xilose e xilitol e ser facilmente obtida.

A regeneração demonstrada no presente pedido resulta na bioconversão NADPH/XR//G6PDH/NADP em reator com membrana uni-modular (BMU). Alternativamente as enzimas podem ser utilizadas  
10 na forma solúvel, desde que a membrana tenha corte molecular máximo de 30 kDa (massas molares da XR e G6PDH da ordem de 36-40 kDa e 100-120 kDa, respectivamente). O não desprendimento do co-fator dos suportes permite o uso da membrana de ultrafiltração de 30 kDa.

A regeneração é enfrentada pelo uso combinado das  
15 enzimas XR e G6PDH, enquanto que a retenção do co-fator é realizada por imobilização (ligação do NADPH a um suporte inerte) ou pelo uso de membrana com corte molecular máximo de 500 Da (sendo a massa molar do NADPH de 760 Da).

Em particular, a presente invenção pleiteia a bioconversão  
20 da xilose em xilitol através da ação conjunta da XR e G6PDH com regeneração simultânea do NADPH em reator com membrana uni-modular utilizando as enzimas na forma solúvel e o co-fator na forma solúvel e/ou imobilizada em resina trocadora de ânions (copolímero de poli(estireno-divinilbenzeno)).

O processo de obtenção de xilitol a partir de xilose, de forma geral, se dá pelo preparo de seus substratos para posterior inserção ao bioreator através das seguintes etapas:

#### **OBTENÇÃO DE BIOMASSA**

5           A *Candida guilliermondii* FTI 20037 foi cultivada por processo descontínuo durante 24h em meio contendo 50 g/L de xilose, 2,0 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 20 g/L de solução de extrato de farelo de arroz. A seguir, as células foram separadas por centrifugação (2000xg; 15 min). Após lavagem com água destilada e  
10   centrifugada, as células foram recolhidas para posterior rompimento.

#### **ROMPIMENTO DAS CÉLULAS (ULTRASSOM OU POR PÉROLAS DE VIDRO)**

Por ultrassom, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio (5mM, pH 7,0), adicionado de 1mL de uma solução de inibidores de protease (2mM de ácido aminocapróico, 10mM de  $\beta$ -  
15   mercaptoetanol, 1mM fenil-metil-sulfonil-fluoride e 0,2mM de EDTA) e de 3,30mL de tampão fosfato (0,1M; pH7,2), em um tubo cônico em banho refrigerado, foi rompida por ultra-som (Vibra Cell 100W-Sonics & Materials), usando-se pulsos de 1s com intervalos de 1s por um período de 45 minutos à frequência de 20kHz. Os fragmentos celulares foram  
20   removidos por centrifugação (6700g; 10 min), recolhendo-se o extrato a ser usado como fonte de xilose redutase.

Já com uso de pérolas de vidro, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio (5mM, pH 4,5-8,5), adicionado de 1mL de uma solução de inibidores de protease (2mM de  
25   ácido aminocapróico, 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1mM fenil-metil-sulfonil-fluoride e 0,2mM de EDTA). O rompimento foi feito em um tubo cônico contendo 3 mL de suspensão de células e de 3 mL de pérolas de

vidro. Através de um auxílio de vórtice, o tubo cônico foi agitado durante 60 segundos seguidos de 30 segundos no banho de gelo. Este ciclo foi repetido durante 7 vezes. Os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação (6700g; 20min), recolhendo-se o extrato a ser usado como fonte de XR.

#### **PURIFICAÇÃO PARCIAL DA XILOSE REDUTASE**

O extrato foi passado através de uma membrana de ultrafiltração com membrana de 30 kDa (7000 rpm/20min), recolhendo-se o filtrado contendo a XR.

#### **IMOBILIZAÇÃO DO CO-FATOR**

Em 25 mL de água deionizada, tampão fosfato ou tampão Tris-HCl (pH 7,2 ou 7,4) foi adicionada a quantidade de resina trocadora de ânions (5, 10 ou 25mg), deixando-se a suspensão por 24h a 32°C sob agitação (100 rpm). A seguir, adicionou-se o co-fator (NADP ou NADPH; 100 µmol), deixando-se a mistura a 100 rpm e 32°C por um tempo (1, 2 ou 4 horas). O sistema imobilizado foi separado por centrifugação (4000g; 30min) e a quantidade de co-fator não ligada medida no sobrenadante.

#### **BIOCONVERSÃO DA XILOSE EM XILITOL**

Os processos descritos a seguir utilizaram o NADP na forma solúvel e/ou imobilizada, munindo-se, respectivamente, o BMU com membrana de corte molecular de 500 Da ou 30 kDa. O BMU empregado é da marca BIOENGINEERING® com capacidade operacional de 10 mL, temperatura controlada pela circulação de água na jaqueta de revestimento, tendo acoplados uma bomba peristáltica/pistonada e um sistema de pressurização até 6 bar.

Dez mililitros de solução aquosa (pH 7,2) contendo o co-fator solúvel ou imobilizado (e as enzimas solúveis XR (2mL do extrato enzimático) e G6PDH (100uL de 272U/mL) foram introduzidos no BMU, sendo, a seguir, alimentado com a solução substrato [D-glicose 6-fosfato (0,5mg/mL) e xilose (1mg/mL) a uma dada vazão específica de 4mL/h (primeiras 24 horas) e 2mL/h (48 horas seguintes) respectivamente. O processo contínuo foi operado por pelo menos 72h, à temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm. Nas amostras coletadas a cada 1h foram feitas as determinações analíticas.

#### **PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS**

##### **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA XILOSE REDUTASE**

A atividade da XR foi determinada medindo-se o decréscimo da absorbância a 340nm decorrente da oxidação do NADPH, usando a xilose como substrato. Uma unidade de atividade enzimática ( $U_{XR}$ ) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de  $1\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto. A atividade específica ( $U_{XRe}$ ) será expressa em ( $U_{XR}$ )/mg de proteína.

##### **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE**

A atividade da G6PDH foi determinada medindo-se o aumento da absorbância a 340nm decorrente da redução do NADP, usando D-glicose 6-fosfato como substrato. Uma unidade de atividade enzimática ( $U_{G6}$ ) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de  $1\mu\text{mol}$  de NADP por minuto. A atividade específica ( $U_{G6e}$ ) será expressa em ( $U_{G6}$ )/mg de proteína.

##### **DETERMINAÇÃO DO NADPH SOLÚVEL**

A quantidade de NADPH solúvel na amostra foi determinada por leitura direta em espectrofotômetro a 340nm, considerando o coeficiente de extinção molar de  $6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

#### **DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA SOLÚVEL**

- 5 Foi usado o método convencional do reagente azul-brilhante (Coomassie G-250) e a albumina bovina como proteína padrão.

#### **DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE XILOSE E XILITOL**

A xilose e o xilitol foram determinados em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

#### **10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)**

Os açúcares redutores representados pela xilose e D-glicose 6-fosfato em separado ou em mistura foram determinados pelo uso dos reagentes convencionais de Somogyi-Nelson.

#### **EFICIÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO (EI) DO NADPH**

- 15 A eficiência da imobilização foi calculada através da relação:

$$EI = 100.[(\text{NADPH}_{\text{ad}} - \text{NADPH}_{\text{sobr}})/\text{NADPH}_{\text{ad}}]$$

onde:  $(\text{NADPH}_{\text{ad}})$  = concentração do co-fator antes da imobilização;  
 $(\text{NADPH}_{\text{sobr}})$  = concentração do co-fator no sobrenadante.

#### **PURIFICAÇÃO PARCIAL DA XR**

- 20 O grau de purificação da XR foi expresso pela relação:

$$FP = (\text{U}_{\text{XRe}})_{\text{d}} / (\text{U}_{\text{XRe}})_{\text{a}}$$

onde: FP = fator de purificação;  $(\text{U}_{\text{XRe}})_{\text{d}}$  = atividade específica após o tratamento e  $(\text{U}_{\text{XRe}})_{\text{a}}$  = atividade específica antes do tratamento.

#### **BIOCONVERSÃO**

- 25 Pela bioconversão realizada em regime descontínuo quer com o NADPH solúvel quer imobilizado, foram estabelecidas as



concentrações das enzimas (XR e G6PDH), substratos (xilose e glicose 6-fosfato) e de NADPH que levam à maior conversão.

Os experimentos de bioconversão descontínua foram acompanhados através da diminuição das concentrações iniciais do ART e da xilose e do acúmulo de xilitol no meio reacional ao longo do processo. Os dados foram apresentados através de gráficos do tipo concentração (ART, xilose e xilitol) x tempo de reação.

A produtividade em xilitol ( $P_{xili}$ ) foi calculada através da relação:

$$(P_{xili}) = [(xilitol)_f - (xilitol)_i] / t$$

onde  $(xilitol)_f$  = concentração de xilitol no final do processo;  $(xilitol)_i$  = concentração de xilitol antes da reação (eventualmente presente no ELC ou no extrato de XR parcialmente purificado) e  $t$  = tempo total de reação.

Os experimentos de bioconversão contínua foram acompanhados pela determinação da quantidade de ART, xilose e xilitol presentes no efluente do biorreator ao longo do tempo. No estado estacionário - constatado através de gráficos concentração (ART, xilose e xilitol) x tempo de processo - foram calculadas a conversão da xilose (X) e a produtividade do processo ( $P_{PC}$ ) expressa em (mmol de xilitol formado/h. $U_{XR}$ ) através das relações:

$$X (\%) = [(XILOSE)_{cons} / (XILOSE)_0] \times 100$$

$$(P_{PC}) = \{[Q \times 60 \times (XILITOL)] / 1000 \times U_{XR}\}$$

onde:  $(XILOSE)_{cons} = (XILOSE)_0 - (XILOSE)_{saída}$ ,  $(XILOSE)_0$  = concentração de xilose na entrada do reator,  $Q$  = vazão volumétrica na saída do reator (mL/h),  $(XILITOL)$  = concentração de xilitol na saída do reator e  $U_{XR}$  = atividade da XR no meio reacional.

**REIVINDICAÇÕES**

1. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, caracterizado pelo fato da bioconversão ser multienzimática.

5 2. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da bioconversão multienzimática compreender particularmente, as enzimas xilose redutase (XR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

10 3. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato da bioconversão compreender processos descontínuos e/ou contínuos.

15 4. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato da bioconversão ser compreendida em um bioreator com membrana de ultrafiltração.

20 5. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato dos bioreatores compreenderem membranas de corte molecular de 100 a 500 Da e/ou de 10 a 30 kDa.

25 6. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato dos processos contínuos e/ou descontínuos compreenderem uma faixa de vazão específica de alimentação de cerca de 0,1 a 1 h<sup>-1</sup>.

7. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com as reivindicações 3 a 6, caracterizado pelo fato do processo descontínuo compreender as etapas (a) emprego de solução aquosa, (b) adição de co-fatores solúveis e/ou  
5 imobilizados, (c) adição das enzimas solúveis, (d) incorporação dos substratos e (e) agitação constante de 50 a 500 rpm por 1 a 10h à temperatura de 20 a 50°C.

8. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 7,  
10 caracterizado pelo fato da solução aquosa compreender um tampão fosfato e/ou tampão Tris-HCl com pH de 4,5 a 8,5.

9. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato dos co-fatores compreenderem NADP e/ou  
15 NADPH.

10. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato dos co-fatores solúveis e/ou imobilizados compreenderem quantidades que variam de 0,1 a 100mM.

20 11. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato das enzimas solúveis compreenderem xilose redutase em concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^5$  U/mL e G6PDH em concentrações de 1 a 500 U/mL.

25 12. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato dos substratos compreenderem xilose em

concentrações de 0,1 a 5,0:1000 m/v e D-glicose 6-fosfato em concentrações de 1 a 100:10000 m/v.

13. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com as reivindicações 3 a 6, caracterizado pelo fato do processo contínuo compreender as etapas (a) emprego de solução aquosa, (b) adição de co-fatores solúveis e/ou imobilizados, (c) adição das enzimas solúveis, (d) alimentação com a solução de substratos (e) agitação constante de 50 a 500 rpm, por pelo menos 12 a 720hs à temperatura de 20 a 50°C.

14. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato da solução aquosa compreender um tampão fosfato e/ou tampão Tris-HCl com pH de 4,5 a 8,5.

15. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato dos co-fatores compreenderem NADP e/ou NADPH em quantidades que variam de 0,1 a 100 mM.

14. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato das enzimas solúveis compreenderem xilose redutase em concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^5$  U/mL e G6PDH em concentrações de 1 a 500 U/mL.

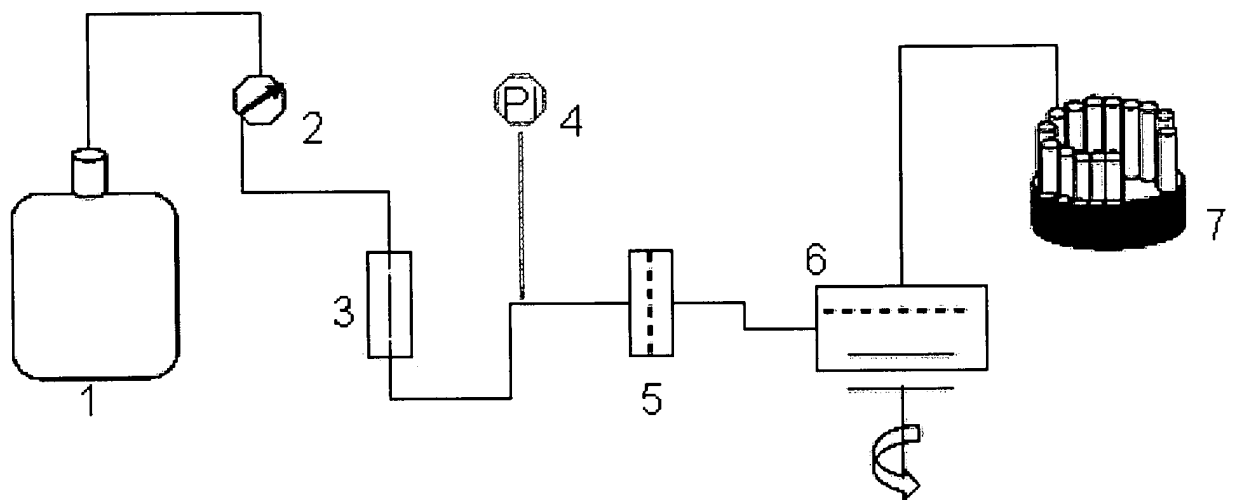
15. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato dos substratos compreenderem xilose nas concentrações de 0,1 a 5,0:1000 m/v e D-glicose 6-fosfato em concentrações de 1 a 100:10000 m/v.

16. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato do processo compreender particularmente a bioconversão da xilose em xilitol através da ação conjunta da XR e G6PDH com regeneração simultânea do NADPH em reator com membrana uni-modular utilizando as enzimas na forma solúvel e o co-fator na forma solúvel e/ou imobilizada em resina trocadora de ânions.

17. MÉTODO OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA BIOCONVERSÃO DA XILOSE, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato da resina de trocadora de ânions compreender o copolímero de poli (estireno-divinilbenzeno).

18. USO DO XILITOL, caracterizado pelo fato de ser aplicado em indústrias alimentícias, odontológicas e farmacêuticas.

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

**RESUMO****“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE XILITOL A PARTIR DA XILOSE ATRÁVES DE BIOCONVERSÃO ENZIMÁTICA EM REATOR COM MEMBRANA”**

5           A presente invenção refere-se ao método de obtenção de xilitol a partir da bioconversão multienzimática da xilose com utilização de enzimas, por exemplo, xilose redutase (XR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em um reator com membrana de ultrafiltração. Adicionalmente, o presente pedido ainda provê os usos do xilitol  
10   resultante do dito processo em indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica.