

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

## **CONVERSÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE EM ISOMALTULOSE**

**HAROLDO YUKIO KAWAGUTI**

Engenheiro de Alimentos  
Mestre em Ciência de Alimentos

**PROFa. DRa. HÉLIA HARUMI SATO**

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

K179c Kawaguti , Haroldo Yukio  
Conversão enzimática da sacarose em isomaltulose /  
Haroldo Yukio Kawaguti. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Hélia Harumi Sato  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Células Imobilizadas. 2. *Erwinia*. 3. Glicosiltransferase.  
4. Isomaltulose. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III. Título.

(ckn/fea)

Título em inglês: Enzymatic conversion of sucrose into isomaltulose

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Erwinia*, Immobilized Cells,  
Glucosyltransferase, Isomaltulose.

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Ana Lúcia Leite Moraes

Gabriela Alves Macedo

Hélia Harumi Sato

Marcia Nitschke

Ranulfo Monte Alegre

Severino Matias de Alencar

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

Tese defendida e aprovada em                    de                    de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores:

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Leite Moraes  
UNIFAL

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo  
FEA/UNICAMP

---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
Orientadora

---

Dra. Marcia Nitschke  
CTAA/EMBRAPA

---

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
FEA/UNICAMP

---

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar  
ESALQ/USP

À minha família: minha mãe Kimiko Kawaguti, meu pai Hisao Kawaguti e meus irmãos Carla Akimi Kawaguti e Hilário Hideo Kawaguti.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Hélia Harumi Sato pela oportunidade, dedicação e amizade

Aos professores da banca examinadora pela contribuição dada ao meu trabalho

Ao Dr. Sílvio Andrietta

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos Alice Fujita, Cristina Lui, Denise Yamamoto, Daniela Guimarães, Daniela Orsi, Giselle Nobre, Fernanda Paques, Gaby Suzuki, Juliana Macedo, Julio Paredes Guzman, Luciana Ferracini dos Santos, Mariana Uenojo, Márcia Nitschke, Marcela Matos, Mariana Uenojo, Milene Berbel, Vânia Battestin e em especial a Luciana Francisco Fleuri

Aos meus amigos de longa data Claudio Roethig Junior, Patrícia Akemi Makiyama e Patrícia de Souza Castro

Aos alunos de iniciação científica Eric Manrich, Michele Buzzato e Larissa Yamamoto

Aos estagiários técnicos Alina Tedrus, Priscila Lazarini e Melina Sanches

Aos companheiros da república Ana Camila, Clecios Vinicius, Daniela Cantane, Juliana Alonso e Luiz Campelo

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Beatriz Melo (Bia), Eliane Pereira (Lili), Maria das Dores (Dora) e Priscila Hoffmann

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

À GETEC Guanabara Química Industrial S/A pelo suporte financeiro

À FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo suporte financeiro

À Produtos Especiais para Alimentos S/A pela doação do extrato de levedura

À Corn Products do Brasil pela doação da água de maceração de milho

À Usina Santa Eliza pela doação do melaço de cana-de-açúcar

À CAPES pela bolsa concedida

## ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Conversão de sacarose em isomaltulose por via microbiana .....	4
3.1.1. Microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem sacarose em isomaltulose.....	5
3.1.2. Características da enzima glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose.....	13
3.2. Imobilização .....	16
3.3. Aplicações da isomaltulose .....	28
3.3.1. Cariogenicidade.....	29
3.3.2. Propriedades, nutrição e metabolismo da isomaltulose .....	31
3.3.3. Isomalte .....	34
4. MATERIAL e MÉTODOS .....	39
4.1. Microrganismo e manutenção da cultura .....	39
4.2. Otimização do meio de cultivo utilizando-se subproduto e resíduo agroindustrial para a produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D12 em frascos sob agitação .....	39
4.2.1. Pré-inóculo e fermentação.....	40
4.2.1.1. Determinação da atividade de glicosiltransferase .....	41
4.3. Produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D12 em fermentador de 6,6 litros utilizando-se meio de cultivo otimizado .....	41
4.3.1. Pré-inóculo e fermentação.....	42
4.3.1.1. Crescimento do microrganismo .....	42
4.4. Otimização do processo de imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp. D12 para a conversão de sacarose em isomaltulose .....	43
4.4.1. Imobilização da massa celular em alginato de cálcio .....	43
4.4.2. Estudo preliminar da influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose.....	49
4.4.2.1. Análise de carboidratos por cromatografia líquida .....	50
4.4.3. Otimização dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído para tratamento das células íntegras de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando-se planejamento experimental .....	50

4.4.4.	Influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 com aditivo glutaraldeído na estabilidade da produção de isomaltulose utilizando-se colunas de leito empacotado .....	51
4.4.5.	Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células de <i>Erwinia</i> sp. D12 cultivadas em diferentes meios, imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas com glutaraldeído, em colunas de leito empacotado.....	52
4.4.6.	Estudo do tempo de vida útil das células íntegras de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com aditivo glutaraldeído utilizando-se colunas de leito empacotado.....	57
4.4.6.1.	Comparação da vida útil das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com glutaraldeído.....	57
4.4.6.1.1.	Contagem de células viáveis.....	57
4.4.6.2.	Vida útil das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio tratadas com glutaraldeído.....	58
4.4.7.	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizados em alginato de cálcio, submetidos a diferentes tratamentos, em processo em batelada. ....	58
4.4.8.	Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos de extrato enzimático bruto e de células sonicadas de <i>Erwinia</i> sp. D12, imobilizados em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado .....	61
4.4.9.	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizadas com acetato de quitosana utilizando-se frascos sob agitação e metodologia de superfície de resposta. ....	62
4.5.	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres.....	63
4.5.1.	Produção de massa celular .....	63
4.5.2.	Influência da variação do pH, da temperatura, da concentração de solução de sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 .....	64
4.5.3.	Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: otimização da conversão de sacarose em isomaltulose .....	65
4.5.4.	Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: reativação da massa celular.....	66
4.5.5.	Estudo da alteração da quantidade de massa celular e de células viáveis durante a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 .....	67
4.5.6.	Estudo da vida útil das células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 na produção de isomaltulose em processo em batelada.....	68
4.6.	Produção de isomaltulose a partir de sacarose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 em escala piloto.....	69

4.6.1.	Pré- inóculo: frascos Erlenmeyers.....	69
4.6.2.	Pré -inóculo: vaso fermentador de 10 litros .....	71
4.6.3.	Fermentação .....	73
4.6.4.	Recuperação da massa celular por centrifugação.....	75
4.6.5.	Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres em escala piloto .....	77
4.7.	Cristalização do Xarope .....	79
4.7.1.	Clarificação do xarope .....	79
4.7.2.	Purificação do xarope.....	79
4.7.3.	Cristalização .....	79
5.	RESULTADOS e DISCUSSÕES .....	80
5.1.	Otimização do meio de cultivo utilizando-se subproduto e resíduo agroindustrial para a produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D12 em frascos sob agitação .....	80
5.2.	Produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D12 em fermentador de 6,6 litros utilizando-se meio de cultivo otimizado .....	89
5.3.	Otimização do processo de imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp. D12 para a conversão de sacarose em isomaltulose .....	98
5.3.1.	Estudo preliminar da influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose.....	98
5.3.2.	Otimização dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na imobilização das células íntegras de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio, utilizando-se planejamento experimental .....	101
5.3.3.	Influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 com aditivo glutaraldeído na estabilidade da produção de isomaltulose utilizando-se colunas de leito empacotado .....	107
5.3.4.	Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células de <i>Erwinia</i> sp. D12 cultivadas em diferentes meios, imobilizadas em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado .....	109
5.3.5.	Estudo do tempo de vida útil das células íntegras de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com aditivo glutaraldeído utilizando-se colunas de leito empacotado.....	115
5.3.5.1.	Comparação da vida útil das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com glutaraldeído .....	115
5.3.5.2.	Vida útil das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio tratadas com glutaraldeído .....	119
5.3.6.	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizados em alginato de cálcio, submetidos a diferentes tratamentos, em processo em batelada. ....	124

5.3.7.	Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos de extrato enzimático bruto e de células sonicadas de <i>Erwinia</i> sp. D12, imobilizados em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado .....	131
5.3.8.	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras de <i>Erwinia</i> sp. D12 imobilizadas com acetato de quitosana utilizando-se frascos sob agitação e metodologia de superfície de resposta. ....	136
5.4.	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres.....	143
5.4.1.	Influência da variação do pH, da temperatura, da concentração de solução de sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 .....	143
5.4.2.	Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: otimização da conversão de sacarose em isomaltulose .....	169
5.4.3.	Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: reativação celular .....	179
5.4.4.	Estudo da alteração da quantidade de massa celular e contagem de células viáveis durante a produção de sacarose em isomaltulose utilizando células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12.....	181
5.4.5.	Estudo da vida útil das células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 na produção de isomaltulose em processo em batelada.....	188
5.5.	Produção de isomaltulose a partir de sacarose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 em escala piloto .....	193
5.6.	Cristalização do Xarope .....	197
6.	CONCLUSÕES.....	199
7.	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....	201
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	202
9.	ANEXO- Artigos Publicados e No Prelo .....	211

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}$ codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho-Milhocina <sup>®</sup> , extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> , $K_2HPO_4$ e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	81
Tabela 2: Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial fracionário $2^{5-1}$ para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho-Milhocina <sup>®</sup> , extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> , $K_2HPO_4$ e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	82
Tabela 3: Efeitos principais dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho- Milhocina <sup>®</sup> , extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> , $K_2HPO_4$ e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	82
Tabela 4: Planejamento composto central rotacional $2^3$ codificado para otimização dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	84
Tabela 5: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central rotacional $2^3$ para otimização dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	84
Tabela 6: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	85
Tabela 7: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD <sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase .....	85
Tabela 8: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp. D12 em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, em fermentador de 6,6 L, a 25°C .....	91
Tabela 9: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp. D12 em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, em fermentador de 6,6 L, a 27°C .....	93
Tabela 10: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp. D12 em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, em fermentador de 6,6 L, a 30°C .....	95
Tabela 11: Planejamento composto central rotacional- $2^2$ codificado no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose .....	102

Tabela 12: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central rotacional-2 <sup>2</sup> codificado no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose.....	102
Tabela 13: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose .....	103
Tabela 14: Análise de variância no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose .....	104
Tabela 15: Planejamento fatorial composto central-2 <sup>3</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em acetato de quitosana.....	137
Tabela 16: Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial composto central-2 <sup>3</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em acetato de quitosana .....	137
Tabela 17: Análise dos efeitos principais e interações das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em acetato de quitosana.....	138
Tabela 18: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em acetato de quitosana.....	138
Tabela 19: Planejamento composto central rotacional-2 <sup>4</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada.....	148
Tabela 20: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central rotacional-2 <sup>4</sup> no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada .....	149
Tabela 21: Resultados do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação .....	150
Tabela 22: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.....	151
Tabela 23: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, t e p no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa	

celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação .....	152
Tabela 24: Resultados do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação .....	156
Tabela 25: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação .....	157
Tabela 26: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação .....	158
Tabela 27: Planejamento composto central 2 <sup>4</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada .....	162
Tabela 28: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada .....	163
Tabela 29: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação .....	165
Tabela 30: Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 em escala piloto em processo em batelada .....	195

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase microbiana. ....	5
Figura 2: Isômeros da sacarose. ....	7
Figura 3: Composição de alginatos. ....	17
Figura 4: Ilustração da formação do gel de alginato de cálcio. ....	21
Figura 5: Conversão de isomaltulose em isomalte por hidrogenação. ....	37
Figura 6: Fermentador de bancada de 6,6 litros New Brunswick Bioflo IIc. ....	45
Figura 7: Imobilização de células íntegras de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio. ....	47
Figura 8: Grânulos de células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio dispostas em colunas de leite empacotado. ....	53
Figura 9: Produção de isomaltulose, a partir de sacarose, por células íntegras imobilizadas em colunas de leite empacotado. ....	55
Figura 10: Frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho fermentado por células de <i>Erwinia</i> sp. D12. ....	71
Figura 11: Vaso fermentador contendo 6 litros de meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho fermentado com células de <i>Erwinia</i> sp. D12. ....	73
Figura 12: Fermentador de 100 litros New Brunswick modelo Mobile Pilot Plant Fermentor. ...	75
Figura 13: Centrífuga contínua de laboratório CEPA modelo LE. ....	77
Figura 14: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase. ...	87
Figura 15: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho a 25°C. ....	91
Figura 16: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho a 27°C. ....	93
Figura 17: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho a 30°C. ....	95
Figura 18: Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos contendo células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12, em alginato de cálcio, com e sem tratamento de aditivos polietilenoimina e glutaraldeído, em colunas de leite empacotado. ....	99
Figura 19: Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose em função da concentração de polietilenoimina e glutaraldeído. ....	105

Figura 20: Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos contendo células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12, em alginato de cálcio, com e sem tratamento do aditivo 0,06% de glutaraldeído, em colunas de leite empacotado. ....	109
Figura 21: Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células íntegras de <i>Erwinia</i> sp imobilizadas em alginato de cálcio tratadas ou não com 0,06% de glutaraldeído, em colunas de leite empacotado. ....	113
Figura 22: Comparação da produção de isomaltulose por células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com 0,06% de glutaraldeído em colunas de leite empacotado utilizando-se células provenientes da fermentação em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho. ...	117
Figura 23: Tempo de vida útil das células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio tratadas com 0,06% de glutaraldeído em colunas de leite empacotado utilizando-se células cultivadas em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho. ....	121
Figura 24: Grânulos contendo células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em alginato de cálcio.	125
Figura 25: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando grânulos úmidos ou secos de células íntegras, extrato de células sonicadas e extrato bruto de glicosiltransferase, imobilizados em alginato de cálcio com tratamento de glutaraldeído, em processo em batelada.....	129
Figura 26: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se grânulos de extrato enzimático bruto (EEI) e de células sonicadas (CSI) de <i>Erwinia</i> sp. D12, imobilizadas em alginato de cálcio, em colunas de leite empacotado. ....	133
Figura 27: Superfície de resposta e curva de contorno para a conversão de sacarose em isomaltulose a partir de células íntegras imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp. D12 em acetato de quitosana. ....	141
Figura 28: Cinéticas de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 variando-se o pH e a temperatura (a, b, c), e a concentração de massa celular e concentração de sacarose (d, e, f). ....	145
Figura 29: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.....	153
Figura 30: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação.....	159
Figura 31: Resultados do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.....	163

Figura 32: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.....	167
Figura 33: Produção de isomaltulose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12, em processo em batelada: otimização da conversão (Ensaio A- massa celular 10,0%, concentração de substrato sacarose 35% ,temperatura 35°C, pH 6,5 e 200rpm). ....	171
Figura 34: Produção de isomaltulose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12, em processo em batelada: otimização da conversão (Ensaio B- massa celular 12,5%, concentração de substrato sacarose 27,5%, 40°C, pH 6,0 e 200rpm). ....	173
Figura 35: Produção de isomaltulose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12, em processo em batelada: otimização da conversão (Ensaio C- massa celular 7,5%, concentração de substrato sacarose 27,5%, 40°C, pH 7,0 e 200rpm). ....	175
Figura 36: Produção de isomaltulose por células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12, em processo em batelada utilizando-se os parâmetros dos ensaios A, B e C. ....	177
Figura 37: Estudo da reativação das células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 utilizadas no processo em batelada na produção de isomaltulose. ....	181
Figura 38: Alteração da quantidade de massa celular e células viáveis durante a produção de isomaltulose utilizando células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 em processo em batelada. ....	185
Figura 39: Estudo da vida útil das células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 na produção de isomaltulose em processo em batelada.....	189
Figura 40: Estudo da vida útil das células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 na conversão de sacarose em isomaltulose em processo em batelada consecutiva sem pernoite. ....	191
Figura 41: Cristais de isomaltulose obtidos após etapas de clarificação e purificação do xarope obtido a partir de sacarose e células livres de <i>Erwinia</i> sp. D12 em processo em batelada.....	197

## RESUMO

A isomaltulose é um dissacarídeo redutor, isômero da sacarose, que possui um sabor adocicado suave e propriedades físicas e sensoriais muito similares, que tem sido considerado um substituto promissor da sacarose na indústria de alimentos, devido a algumas características como baixo potencial cariogênico e baixo índice glicêmico, promoção do crescimento de bifidobactérias benéficas da microbiota intestinal, e por apresentar maior estabilidade em relação à sacarose em alimentos e bebidas acidificados, além de poder ser convertido para isomalte, um açúcar álcool dietético e não cariogênico aplicado na indústria de alimentos e farmacêutica.

Os objetivos deste trabalho foram otimizar um meio de cultivo, de menor custo, para a produção da enzima glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12 e estudar a produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando-se células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio.

Na otimização do meio de cultivo, em frascos sob agitação, a máxima atividade obtida foi de 12,4 UA de glicosiltransferase/mL de meio de cultivo após 8 horas de fermentação a 30°C, em meio composto de 150 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 20 g/L de água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>, 15 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>, e pH ajustado a 7,5. No estudo da produção de glicosiltransferase, em fermentador de 6,6 litros, utilizando-se o meio de cultivo otimizado foi obtida máxima atividade de 22,5 UA de glicosiltransferase/mL de meio de cultivo, após 8 horas de fermentação a 27°C.

No estudo da produção de isomaltulose por células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio foi verificado que o tratamento dos grânulos de células imobilizadas com 0,06% de glutaraldeído, promoveu uma maior taxa de conversão, sendo obtido cerca de 72,3% de isomaltulose, após 12 horas de incubação em frascos sob agitação a 30°C. As células íntegras imobilizadas e tratadas com 0,06% de glutaraldeído,

em colunas de leito empacotado, apresentaram maior estabilidade do que aquelas imobilizadas sem tratamento com o aditivo, e mantiveram a conversão de sacarose em isomaltulose entre 50-60% por 10 dias, a partir de solução de sacarose 35% e fluxo de 0,56 mL/min a 30°C.

Foram estudados diferentes tratamentos para a preparação de células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto imobilizados em alginato de cálcio. Os métodos que mostraram melhores resultados, em processo em batelada, foi o extrato enzimático bruto imobilizado em alginato de cálcio (EEI), em que foram obtidas taxas de conversão entre 59,7% e 63,3%; e células lisadas por sonicação e imobilizadas (CSI), com taxas de conversão entre 47,6% e 62,3%. A coluna de leito empacotado contendo grânulos de células lisadas imobilizadas (CSI) apresentou maior estabilidade do que a coluna contendo os grânulos de extrato enzimático bruto imobilizado (EEI). A coluna de leito empacotado de CSI converteu 53-59% de sacarose em isomaltulose durante sete dias, posteriormente houve queda lenta e gradual da conversão não havendo mais transformação em isomaltulose após 21 dias.

No estudo da produção de isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada, foi verificado o efeito do pH, da temperatura, da concentração do substrato sacarose e da concentração de massa celular em frascos agitados a 150 rpm e 30°C. A conversão de sacarose em isomaltulose foi favorecida utilizando-se temperaturas superiores a 30°C, pH entre 6,0-6,5, massa celular entre 7,5-12,5% e solução de sacarose de 20-35%, obtendo-se rendimentos de isomaltulose acima de 50%.

No estudo da vida útil das células livres em escala de bancada, utilizando-se frascos Erlenmeyers sob agitação, foi verificado que os parâmetros de conversão fixados a: temperatura de 35°C, pH 6,5, concentração de substrato sacarose 35% e concentração de

massa celular 10% foram os mais favoráveis, promovendo um alto rendimento em isomaltulose entre 70-75%, por 16 bateladas.

Os ensaios realizados em escala piloto demonstraram a viabilidade da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres, em que foram obtidos cerca de 114 litros de xarope com alto teor de isomaltulose (63,40%). Os cristais de isomaltulose, após clarificação e purificação do xarope convertido, apresentaram pureza de 96,5%.

## SUMMARY

Isomaltulose is a reducing disaccharide and a structural isomer of sucrose. It has a mild sweet flavour and very similar physical and sensorial properties and has been considered as a promising substitute for sucrose in the food industry, due to some of its characteristics such as a low cariogenic potential and low glycemic index and the promotion of beneficial bifid bacteria in the intestinal microbial flora. It also shows greater stability than sucrose in acidified foods and drinks, and can be converted into isomalt, a dietetic sugar alcohol with no cariogenic potential for use in the food and pharmaceutical industries.

The objectives of this research were the optimisation of a culture medium with reduced costs for the production of the enzyme glucosyltransferase by the strain *Erwinia* sp. D12, and the study of isomaltulose production from sucrose by free and immobilized cells.

In the optimisation of the culture medium in shaken flasks, the highest glucosyltransferase activity achieved was 12.4 UA/mL of culture medium after 8 hours of fermentation at 30°C, in a medium composed of 150 g/L of sugar cane molasses, 20 g/L of corn steep liquor- Milhocina<sup>®</sup> and 15 g/L of yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>, with the pH adjusted to 7.5. In the study for glucosyltransferase production in a 6.6-liter reactor using the optimised culture medium, the highest glucosyltransferase production achieved was 22.5 UA/mL of culture medium, after 8 hours of fermentation at 27°C.

In the study for isomaltulose production using *Erwinia* sp. D12 cells immobilized in calcium alginate, it was shown that the addition of 0.06% glutaraldehyde during the immobilization process, promoted a higher conversion rate, reaching about 72.3% isomaltulose after 12 hours of incubation at 30°C in shaken flasks. The immobilized whole cells treated with 0.06% glutaraldehyde, used in packed-bed reactors, presented

greater stability than those immobilized without the addition of the additive, and maintained the conversion of sucrose into isomaltulose between 50-60% for 10 days, using a 35% sucrose solution with a flow rate of 0.56 mL/min at 30°C.

Different treatments were studied for the preparation of whole cells, lysed cells and a crude enzyme extract immobilized in calcium alginate. The methods that showed the best results in batch processes were the crude enzyme extract immobilized in calcium alginate (EEI), where conversion rates between 59.7% and 63.3% were achieved; and immobilized lysed cells (CSI), with conversion rates between 47.6% and 62.3%. The packed bed column containing granules of immobilized lysed cells (CSI) presented greater stability than that containing granules of immobilized crude enzymatic extract (EEI). The packed bed column with CSI converted 53-59% of sucrose into isomaltulose during seven days, and then showed a gradual decline in conversion, ceasing completely after 21 days.

In the study of isomaltulose production using free *Erwinia* sp. D12 cells in a batch process, the effects of pH, temperature, sucrose substrate concentration and cell mass concentration were determined in shaken flasks at 150 rpm and 30°C. The following conditions favoured the conversion of sucrose into isomaltulose: temperatures above 30°C, pH between 6.0-6.5, cell mass between 7.5-12.5% and a sucrose concentration between 20-35%; when isomaltulose yields above 50% were obtained.

The half-life of the free cells was studied on a bench scale in shaken Erlenmeyers flasks and it was shown that the following fixed conversion parameters were the most favourable: temperature of 35°C, pH 6.5, 35% sucrose substrate concentration and 10% cell mass concentration; promoting high isomaltulose yields between 70-75%, for 16 batches.

The pilot scale assays demonstrated the viability of the conversion of sucrose into isomaltulose by free cells, obtaining about 114 liters of high isomaltulose syrup (63.40%).

The isomaltulose crystals, after clarification and purification of the converted syrup, showed a purity of 96.5%.

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos está constantemente à procura de novos ingredientes para melhorar os produtos existentes ou para introduzir novos produtos no mercado. A sacarose é o adoçante mais utilizado na produção de alimentos devido as suas características físico-químicas e sensoriais. No entanto, devido ao alto valor calórico e propriedades cariogênicas da sacarose, adoçantes alternativos têm sido pesquisados. O Brasil é o maior produtor mundial de sacarose com uma produção estimada em 29,2 milhões de toneladas para a safra 2006/07 (Conab- Ministério da Agricultura, 2006) e diversos produtos de interesse industrial podem ser obtidos a partir da sacarose como, por exemplo, açúcar invertido, dissacarídeos (isomaltulose e trealulose), frutooligosacarídeos, polissacarídeos (goma xantana e dextrana), etanol, ácido glutâmico e ácido cítrico entre outros.

Nas últimas duas décadas houve um aumento crescente no interesse da produção de isomaltulose também conhecida como Palatinose<sup>®</sup> ou Lylose<sup>®</sup>, que ocorre naturalmente no mel e na cana-de-açúcar em pequenas quantidades, e tem sido considerado um promissor substituto da sacarose. A isomaltulose é um dissacarídeo redutor, isômero da sacarose, obtida por conversão enzimática microbiana a partir da sacarose (Siddiqui e Furgala, 1967; Krastanov e Yoshida, 2003). Pesquisas envolvendo a produção de isomaltulose iniciaram-se no Japão entre 1970-1975 (Nakakuki, 2002).

A isomaltulose possui um sabor adocicado suave, apresentando cerca de 50% da doçura da sacarose (Shimizu et al., 1982; Takazoe et al., 1985a; Hashimoto et al., 1987; Godshall, 1997; Huang et al., 1998) e tem propriedades físico-químicas e sensoriais muito similares e, quando utilizada em alimentos, como substituto da sacarose em confeitos e chocolates, não foram notadas diferenças na doçura (Huang et al., 1998; Cheetham et al., 1982; Takazoe, 1989).

A isomaltulose possui baixo potencial cariogênico sendo utilizada comercialmente no Japão como ingrediente e substituinte da sacarose na produção de gomas de mascar, iogurtes, doces e bebidas (Huang et al., 1998). Apresenta também baixa velocidade de hidrólise e formação de monossacarídeos no organismo, sendo recomendada para aplicação em alimentos e bebidas destinados aos diabéticos e esportistas (Krastanov e Yoshida, 2003). A produção mundial de isomaltulose pela Südzucker AG foi estimada em 60.000 toneladas/ano (Lichtenthaler e Peters, 2004).

O principal derivado da isomaltulose é o isomalte, um açúcar-álcool obtido por hidrogenação com a formação de uma mistura equimolar de [6-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-sorbitol] e [1-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-manitol], de baixo valor calórico e não cariogênico. O isomalte, também conhecido como Isomalt<sup>®</sup> e Palatinit<sup>®</sup>, tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua aplicação industrial como substituto da sacarose em processamento de alimentos sendo utilizado como adoçante dietético, não cariogênico e em formulações farmacêuticas (Maki et al., 1983; Ooshima et al., 1983; Irwin, 1990). Muitos produtos derivados da isomaltulose possuem potenciais aplicações industriais. Podem ser obtidos dissacarídeos intermediários, polímeros como detergentes biodegradáveis e surfactantes de interesse industrial (Lichtenthaler e Mondel, 1997; Lichtenthaler e Peters, 2004). Uma outra aplicação da isomaltulose consiste na obtenção de oligômeros de isomaltulose, que atuam como prebióticos, estimulando a proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal (Kashimura et al., 1996).

## **2. OBJETIVOS**

### **Estudo da produção da glicosiltransferase da linhagem de *Erwinia* sp. D12**

Otimização dos componentes do meio de cultivo de menor custo para fermentação do microrganismo e produção de glicosiltransferase, através de planejamento experimental. Estudo da produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 em fermentador de 6,6 L utilizando-se meio de cultivo otimizado em diferentes temperaturas.

### **Otimização do processo de imobilização das células de *Erwinia* sp. D12 para conversão de sacarose em isomaltulose**

Estudo do efeito do tratamento das células imobilizadas com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na estabilidade da glicosiltransferase e otimização dos aditivos através de planejamento experimental.

Estudo da imobilização de células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto de células lisadas em alginato de cálcio. Estudo da imobilização das células de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana.

Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 cultivadas em dois diferentes meios de cultivo otimizados, imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas com glutaraldeído em colunas de leito empacotado. Estudo do tempo de vida útil das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas com glutaraldeído.

### **Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres**

Influência dos parâmetros temperatura, pH, concentração de substrato sacarose e de massa celular úmida na conversão de sacarose em isomaltulose. Estudo da vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 em processo em batelada. Estudo da reativação das células livres.

Produção de isomaltulose a partir de sacarose (açúcar cristal) por células livres de *Erwinia* sp. D12 em escala piloto. Purificação e cristalização da isomaltulose.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Conversão de sacarose em isomaltulose por via microbiana

A conversão de sacarose em isomaltulose por via microbiana tem atraído grande interesse comercial, pois a síntese química é muito difícil. A isomaltulose [*O*- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -frutofuranose] é obtida através da conversão enzimática da sacarose [*O*- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-frutofuranosídeo], pela enzima  $\alpha$ -glicosiltransferase também conhecida como sacarose isomerase e isomaltulose sintase (EC 5.4.99.11), na qual a ligação 1,2- glicosídica entre a glicose e a frutose é rearranjada para ligação 1,6- glicosídica (Figura 1).

A enzima é produzida por microrganismos como *Protaminobacter rubrum* (Hashimoto et al., 1987; Tsuyuki et al., 1992; Kakinuma et al., 1998; Sarkki et al., 1999), *Erwinia carotovora* (Lund e Wyatt, 1973), *Erwinia* sp. D12 (Kawaguti et al., 2005; Kawaguti et al., 2006a; Kawaguti et al., 2006b), *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al., 1982; Cheetham et al., 1985), *Serratia plymuthica* (McAllister et al., 1990; Véronèse e Perlot; 1999; Krastanov e Yoshida, 2003), *Klebsiella planticola* (Huang et al., 1998) e *Klebsiella* sp. (Park et al., 1992; Park et al., 1996).

O uso de microrganismos como biocatalisadores para obtenção de determinadas substâncias tem suas vantagens, como a alta capacidade de multiplicação e alta flexibilidade de utilização, graças ao seu poder de adaptação às várias situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com a oferta de nutrientes do meio (Moraes et al., 2005).

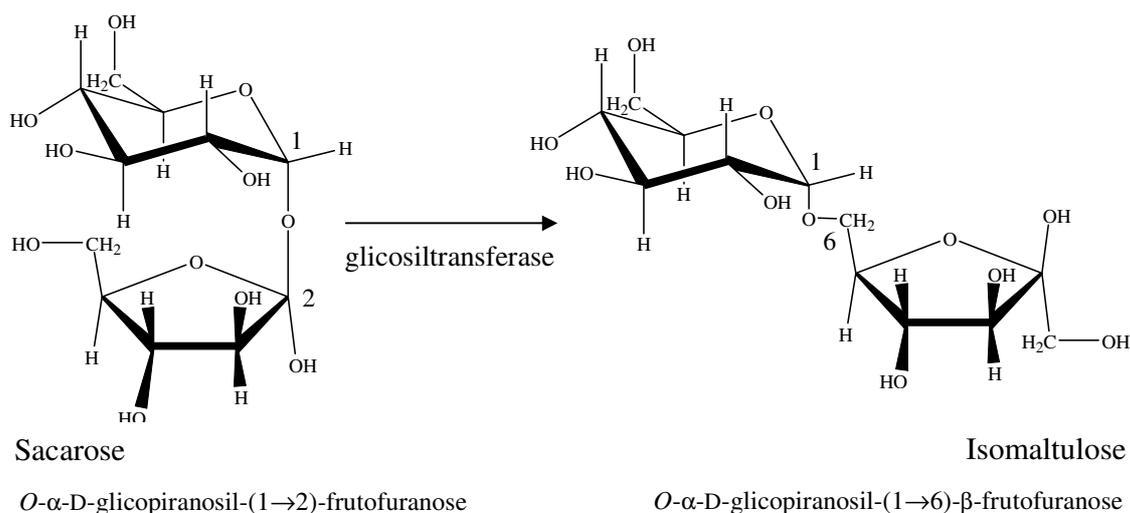


Figura 1: Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase microbiana.

Entre os sistemas de conversão de sacarose em isomaltulose, existem os de enzima livre (Lund e Wyatt, 1973; McAllister et al., 1990; Park et al., 1992; Park et al., 1996), células livres (Schiweck et al., 1980; Heikkila et al., 2000; Kawaguti e Sato, 2006) e células imobilizadas (Bucke e Cheetham, 1987; Shimizu et al., 1982; Cheetham et al., 1982; Lantero, 1983; Cheetham et al., 1985; Hashimoto et al., 1987; Tsuyuki et al., 1992; Sarkki et al., 1999; Krastanov e Yoshida, 2003; Ahn et al., 2003; Moraes et al., 2005; Kawaguti et al., 2006a; Kawaguti et al., 2006b).

### ***3.1.1. Microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem sacarose em isomaltulose***

O primeiro relato da obtenção da isomaltulose foi em 1957, quando Weidenhagen e Lorenz reportaram a conversão de sacarose em um novo e desconhecido dissacarídeo redutor pela ação da bactéria *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 isolada a partir de subprodutos de açúcar de beterraba. O dissacarídeo foi identificado como isomaltulose e nomeado como palatinose, derivado de “palatinum”, nome da província alemã onde o dissacarídeo foi encontrado. A partir deste estudo, outros trabalhos foram realizados enfocando o isolamento e cultivo de microrganismos, produção e caracterização da enzima e a conversão de sacarose em isomaltulose.



Lund e Wyatt (1973) verificaram que a bactéria *Erwinia carotovora var. atroseptica* GI20 produziu isomaltulose durante a fermentação em meio de cultivo contendo peptona 1% (p/v), sacarose 4% (p/v) e extrato de carne em pó 0,4% (p/v). Foram também detectados, no meio de fermentação, pequenas quantidades de outros açúcares como a glicose, frutose, maltose, sacarose e seus isômeros como a turanose, maltulose, leucrose e trealulose (Figura 2).

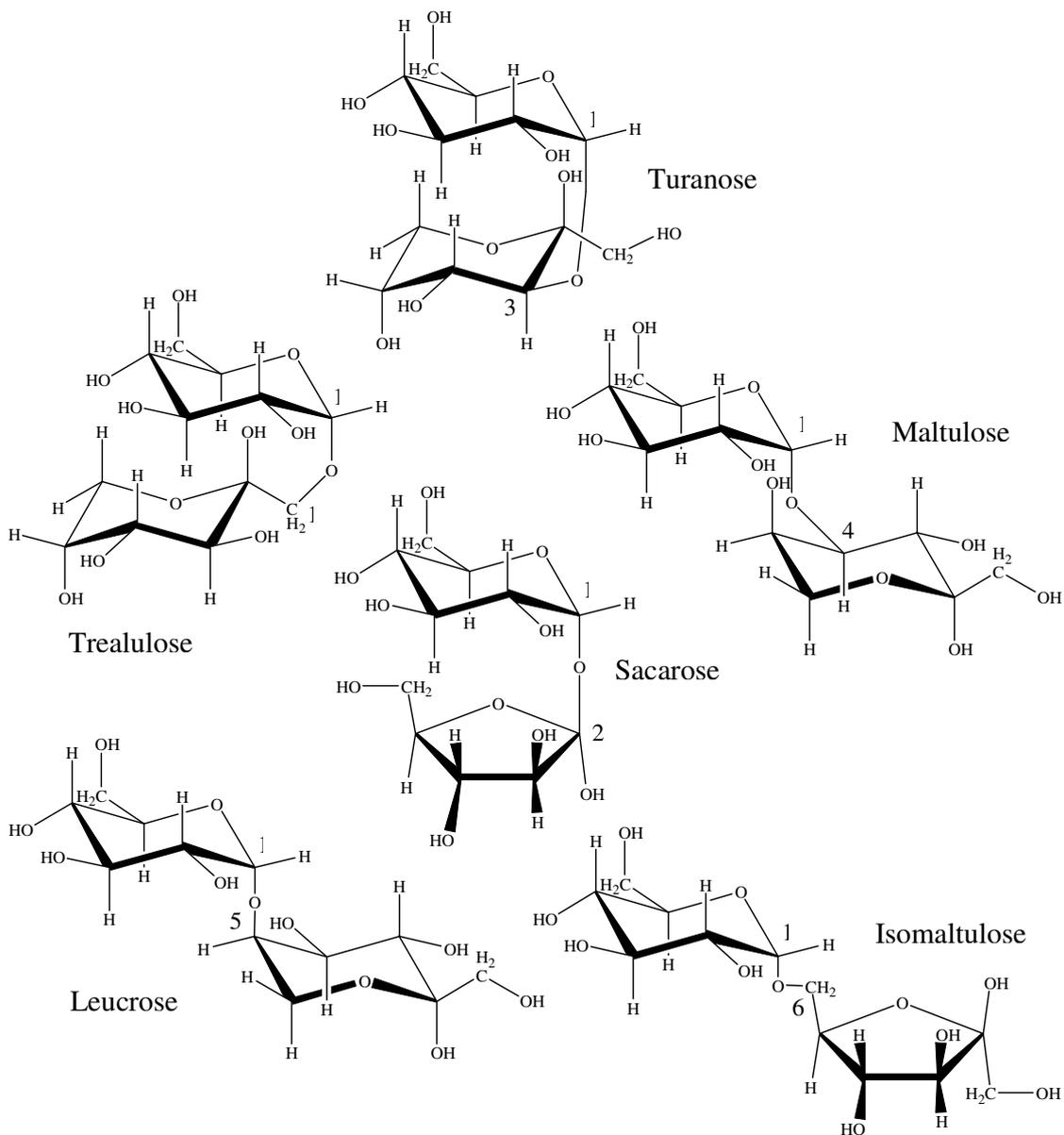


Figura 2: Isômeros da sacarose.



As células das linhagens *Protaminobacter rubrum* e *Serratia plymuthica* foram utilizadas na produção de isomaltulose a partir de sacarose (Schiweck et al., 1980). O meio de cultivo era composto de extrato de carne 0,3% (p/v), sacarose 10% (p/v), peptona 2% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 0,6% (p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4% (p/v), extrato de levedura 1,0% (p/v) e ajustado a pH 7,0. Após 24 horas de fermentação, a 30°C, o meio contendo bactérias foi inoculado em 16 Kg de solução de sacarose 25% (p/v), sob contínua agitação e aeração e, após 12 horas foram obtidos valores de conversão acima de 90%.

As células de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578, produtoras de glicosiltransferase intracelular, foram imobilizadas em alginato de cálcio para a produção de isomaltulose (Cheetham et al., 1985). Os autores descreveram que foi obtida conversão de 90% de sacarose em isomaltulose utilizando substrato sacarose 1,6M. Os carboidratos foram analisados em cromatógrafo líquido Waters Prep LC/system 500A com detector de índice de refração e coluna PrepPak 500/C18.

McAllister et al. (1990) descreveram a produção de uma glicosiltransferase intracelular de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 que convertia sacarose em isomaltulose. A atividade máxima foi obtida após 16 horas de fermentação a 30°C. Utilizando-se a enzima purificada, a conversão em isomaltulose foi de 85% após 10 minutos de reação a partir de solução de sacarose 5% (p/v), em tampão citrato-fosfato pH 6,0; e após 1 hora, com solução de sacarose 10% (p/v). A eficiência da conversão de uma solução de sacarose 40% (p/v), após 3 horas de reação, foi de 87%.

Park et al. (1992 e 1996) isolaram, de frutas deterioradas, a bactéria *Klebsiella* sp. produtora de glicosiltransferase intracelular. O microrganismo foi cultivado em meio de cultivo composto de sacarose 4% (p/v), peptona bacteriológica 1% (p/v) e extrato de carne em pó 0,4% (p/v). A maior atividade obtida foi de 2,95 UA/mL de meio de cultivo. A enzima converteu a solução 4% de sacarose com rendimento de 86% de isomaltulose quando incubada a 25°C.

Muitos microrganismos que produzem a isomaltulose, também produzem o isômero trealulose em grande quantidade. A bactéria *Klebsiella planticola* MX 10 converteu sacarose em isomaltulose e trealulose (Tsuyuki et al., 1992). Para a produção de biomassa foi utilizado fermentador contendo meio de cultivo composto de sacarose 10% (p/v), peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), extrato de carne 0,3% (p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,2% (p/v) e NaCl 0,3 % (p/v). A fermentação foi realizada a 30°C, com aeração de 0,25 vvm, por 16,5 horas. As células imobilizadas converteram solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose (65,4%) e trealulose (29,7%).

Nagai et al. (1994) relataram que a glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 produziu maior proporção de trealulose do que isomaltulose a partir do substrato sacarose. O microrganismo foi cultivado em fermentador de 5 litros contendo 3 litros de meio composto de peptona 1% (p/v), extrato de carne 0,3% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), melão 10% (p/v), NaCl 0,3% (p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,3% (p/v), ajustado a pH 7,0, a 28°C, durante 48 horas, a uma taxa de aeração de 1 vvm e agitação de 380 rpm. A conversão de sacarose para isomaltulose e trealulose foi de aproximadamente 9,0% e 91,0%, respectivamente.

Heikkila et al. (2000) estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando a bactéria *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 cultivada em frascos de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultivo composto de sacarose 5% (p/v), peptona 0,5% (p/v), extrato de carne 0,3% (p/v), em tampão Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M pH 7,0, sob agitação a 230 rpm a 30°C. Para a conversão de sacarose o microrganismo foi fermentado em dois substratos distintos, um contendo melão de beterraba (67,7% de sacarose em base seca) e outro, solução de sacarose 35% (p/v). Os meios foram ajustados a pH 7,0 com agitação de 350 rpm, aeração de 10 L/min, por 13 horas. Foram obtidos 81,9% de isomaltulose e 10% de trealulose utilizando-se o substrato melão de beterraba enquanto que, utilizando-se o substrato sacarose foram obtidos 85,9% de isomaltulose e 8% de trealulose.

A bactéria *Klebsiella planticola* CCRC 19112 foi descrita como produtora de glicosiltransferase que convertia sacarose em isomaltulose e trealulose (Huang et al., 1998). O microrganismo foi cultivado em frascos de 500 mL com meio de cultivo ajustado para pH 7,0 a 30°C, em agitador rotatório a 125 rpm. A produção máxima da enzima pelo microrganismo foi verificada entre 16-18 horas de fermentação. Utilizando-se tubos de ensaio agitados a 30 rpm contendo 1 mL de suspensão celular e 4 mL de solução 50% de sacarose foram obtidos 76%-84% de isomaltulose, 14%-16% de trealulose, 2%-6% de glicose, 2%-3% de frutose após 8 horas de reação a 40°C.

Véronèse e Perlot (1999) descreveram a conversão de sacarose por glicosiltransferase de *Serratia plymutica* ATCC 15928. O microrganismo foi cultivado em fermentador de 2 litros contendo 1,5 litros de meio composto de sacarose 5% (p/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5% (p/v),  $\text{MgSO}_4$  0,04% (p/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (p/v), extrato de levedura 0,75% (p/v), por 20 horas, com uma taxa de aeração de 1 vvm, a 600 rpm. A enzima purificada converteu sacarose em isomaltulose (72,6%), trealulose (6,6%), glicose (10,1%) e frutose (10,1%).

Novos microrganismos produtores de glicosiltransferase têm sido isolados, como a linhagem *Erwinia rhapontici* ATCC 29283 que converte sacarose em isomaltulose (Ahn et al., 2003). O microrganismo foi cultivado em fermentador de 5 litros, contendo 3 litros de meio composto de sacarose 5% (p/v), extrato de levedura 1,0% (p/v),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , mantido sob agitação a 500 rpm, aeração de 1 vvm a 30°C. Utilizando-se células imobilizadas em colunas de leito empacotado foi obtido 89% de conversão de sacarose em isomaltulose a 30°C.

Li et al. (2004) isolaram de solo uma nova linhagem produtora de glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose, trealulose e baixa quantidade de glicose. O microrganismo foi identificado através de testes bioquímicos e de sequenciamento do 16S rRNA como *Klebsiella singaporensis* sp.

Wu e Birch (2004) isolaram a bactéria *Pantoea dispersa* UQ68J com alta atividade de sacarose isomerase. O microrganismo foi cultivado em meio de cultivo composto de isomaltulose 0,2% (p/v), Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,5% (p/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45% (p/v), NH<sub>4</sub>Cl 0,1% (p/v), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05% (p/v), citrato férrico de amônio 0,005% (p/v) e CaCl<sub>2</sub> 0,005% (p/v). Usando as células livres para a conversão de solução 25% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 6,0 foi obtido máximo rendimento de isomaltulose 78-80%, com aproximadamente 20% de sacarose residual a 37°C. Posteriormente, os genes da sacarose isomerase da linhagem *Pantoea dispersa* UQ68J foram clonados e expressos em *Escherichia coli* (Wu e Birch, 2005). A linhagem *E. coli* clonada mostrou-se eficiente na produção da enzima sacarose isomerase que converte sacarose em isomaltulose.

A maioria dos microrganismos produtores de glicosiltransferase, que converte sacarose em isomaltulose, foi fermentada em meio de cultivo contendo peptona, sacarose, extrato de levedura, extrato de carne e sais. Tais componentes possuem alto custo encarecendo a produção de isomaltulose. Alguns trabalhos têm utilizado subprodutos e resíduos agroindustriais como componentes de meio de cultivo na tentativa de diminuir o custo de fermentação. Tem-se utilizado melaço de cana-de-açúcar como substituto da sacarose como fonte de carbono, água de maceração de milho como alternativa a peptona e extrato de carne e levedura, como fonte de carbono e nitrogênio. Shimizu et al. (1982) utilizaram meio de cultivo composto de sacarose 5% (p/v), água de maceração de milho 3%(p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3% (p/v) e NaCl 0,2% (p/v) ajustado a pH 7,0, para produção de células de *Serratia plymuthica* NCIB 8285 produtoras de α-glicosiltransferase intracelular que convertia sacarose em isomaltulose.

Moraes et al. (2002 e 2005) estudaram a produção de isomaltulose por células de *Erwinia* sp. imobilizadas com alginato de cálcio. As células foram obtidas a partir de fermentação em meio de cultivo composto de melaço-de-cana-de-açúcar 12% (p/v), peptona 4% (p/v) e extrato de carne 0,4% (p/v). Foi obtida maior atividade enzimática de 15,6 UA/mL de meio de cultivo após 8 horas de fermentação, em fermentador de 3 litros,

a 30°C. Foi obtido rendimento em torno de 50% de isomaltulose com soluções de sacarose entre 20-30% a 35°C. Kawaguti et al. (2005) otimizaram o meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. O meio de fermentação era composto pelos sub-produtos agroindustriais melaço de cana-de-açúcar (100 g/L), água de maceração de milho (60 g/L) e extrato de levedura comercial (8 g/L). Foi obtida atividade enzimática máxima de 6,65 UA/mL de meio de cultivo, após 8 horas de fermentação a 30°C, utilizando-se frascos sob agitação.

### ***3.1.2. Características da enzima glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose***

A glicosiltransferase microbiana é uma enzima intracelular e está localizada no espaço periplasmático das células (Cheetham et al., 1982; Cheetham, 1984; McAllister et al., 1990; Huang et al., 1998). Não existe glicosiltransferase comercial para a conversão de sacarose em isomaltulose, sendo pouco os trabalhos que utilizam a glicosiltransferase extraída para a conversão (Park et al., 1992; Park et al., 1996; Celestino, 1998; Véronèse e Perlot, 1999).

Diversos estudos foram realizados visando a purificação, a caracterização e o esclarecimento do mecanismo bioquímico da conversão de sacarose em isomaltulose. Constatou-se que a enzima de *Erwinia rhapontici* que mediava a bioconversão de isomaltulose estava localizada no espaço periplasmático das células, o que facilitaria seu uso como um biocatalisador industrial (Cheetham et al., 1982; Cheetham, 1984). A enzima foi descrita como sacarose específica com um mecanismo de transglicosilação intramolecular em que ambos os resíduos de glicose e frutose estavam associadas à enzima. A reação, não sendo seletiva, formou simultaneamente isomaltulose e trealulose a partir da hidrólise da sacarose seguida pelo rearranjo da glicose com as posições do carbono 6 e 1 da frutofuranose, respectivamente. Foi verificado que a razão

isomaltulose/trealulose foi constante nos estágios iniciais da reação sob diferentes condições de pH, temperatura e concentração do substrato; no entanto, após extensa incubação e quando toda sacarose foi consumida, houve uma lenta queda da concentração de isomaltulose e um lento aumento da trealulose. Quando enzimas ou células foram incubadas com isomaltulose e trealulose purificada houve pequena e lenta formação de trealulose. A trealulose mostrou-se inerte, sugerindo que a conversão da isomaltulose seria lentamente reversível e a da trealulose irreversível.

As glicosiltransferases que convertem a sacarose em isomaltulose descritas na literatura apresentam atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 6,5 e temperatura de 30°C a 40°C e são citadas como sendo termossensíveis (McAllister et al., 1990; Park et al., 1992; Park et al., 1996; Nagai et al., 1994; Véronèse e Perlot; 1999; Celestino, 1998; Wu e Birch, 2005). A enzima bruta de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 foi obtida após centrifugação a 10.000 rpm, por 20 minutos e rompimento da massa celular em prensa-X (McAllister et al., 1990). A glicosiltransferase obtida foi purificada 25 vezes em coluna Bio-Gel e apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 30°C. Park et al. (1992 e 1996) caracterizaram a enzima obtida da bactéria *Klebsiella* sp capaz de converter sacarose em isomaltulose. A enzima purificada apresentou melhor atividade entre pH 6 e 6,5 e temperatura ótima de 35°C.

A enzima denominada sacarose isomerase, clonada em *Escherichia coli* por Wu e Birch (2005), apresentou atividade ótima em pH 5,0 a 30°C e 35°C. A enzima purificada apresentou  $K_m$  de 39,9 mM e  $V_{max}$  de 423 UA/mg para o substrato sacarose. A enzima converteu sacarose em isomaltulose e trealulose na proporção 8:1, respectivamente. A glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, que produz maior proporção de trealulose a partir de sacarose, foi purificada (Nagai et al., 1994). A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,8 a 40°C, e maior estabilidade na faixa de pH 5,1 a 6,7 e em temperaturas inferiores a 40°C. A glicosiltransferase apresentou atividade máxima de 13,89 UA/mg.

Véronèse e Perlot (1998) investigaram o mecanismo bioquímico do sítio ativo da enzima glicosiltransferase produzida por *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e *Erwinia rhapontici*. Diferentes monossacarídeos foram utilizados na mistura de reação para verificar o efeito inibidor ou ativador na formação de isomaltulose. Foi verificado que, a maioria dos monossacarídeos apresentou efeito inibitório ou nenhum efeito. O modo de ação da enzima glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum* também foi estudado (Tsuyuki et al., 1992). A enzima catalisava a transglicosilação intramolecular da sacarose formando isomaltulose e também a transglicosilação intermolecular da sacarose, para outros aceptores, formando outros derivados de sacarose.

Celestino (1998) estudou a produção, purificação e a caracterização bioquímica da glicosiltransferase intracelular de *Erwinia* sp. D12. No estudo da produção da glicosiltransferase, em fermentador de 2 litros, foi verificado que a enzima é produzida na fase exponencial de crescimento, sendo que a produção máxima foi obtida após 3 horas de fermentação a 28°C, e após 4 horas de incubação a 30°C e 35°C. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40°C. A glicosiltransferase purificada mostrou-se termossensível, sendo inativada após 1 hora de tratamento a temperaturas superiores a 39°C e após 3 horas, a 35°C na ausência de substrato. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,7 a 6,3, após 24 horas de incubação, a 5°C. Utilizando-se a glicosiltransferase e solução de sacarose 5% e 10% (p/v) foram obtidos rendimentos de 73,5% e 72,3% de isomaltulose, respectivamente, após 4 horas de reação a 40 °C.

A enzima  $\alpha$ -glicosiltransferase purificada de *Serratia plymutica* ATCC 15928 converteu sacarose em 72,6% de isomaltulose, 6,6% de trealulose, 10,1% glicose e 10,1% de frutose (Véronèse e Perlot, 1999). A enzima foi obtida pelo rompimento celular em sonicador. O sobrenadante contendo a enzima foi obtido por centrifugação a 20.000 rpm, durante 30 minutos. A conversão máxima de solução de sacarose 292 mM ocorreu em pH 6,2 e a temperatura de 30°C. A proporção dos produtos foi dependente da temperatura de reação e o aumento da temperatura aumentou a formação de frutose. Foi verificado que a

adição de glicose ou frutose na mistura de reação também alterou a proporção dos produtos sendo que a glicose atuou como inibidor competitivo. Foi observado também que, a reversibilidade da reação ocorria somente com a isomaltulose e não com a trealulose.

### **3.2. Imobilização**

A primeira aplicação industrial de sistema de células imobilizadas foi utilizada na produção contínua de ácido L-aspártico (Chibata et al., 1974). Nos últimos anos houve um grande aumento das pesquisas na área de biocatálise envolvendo a imobilização de enzimas e células inteiras de microrganismos (Walsh e Malone, 1995). A imobilização de microrganismos pode ser definida como qualquer técnica que limita a livre migração das células (Scott, 1987) ou o confinamento físico ou localização de células intactas em uma certa região do espaço com a preservação de desejadas atividades catalíticas (Karel et al., 1985).

As células imobilizadas em uma matriz podem ser protegidas de condições ambientais desfavoráveis como pH, temperatura, solventes orgânicos, e substâncias tóxicas podendo ser manipuladas e recuperadas das soluções (Park e Chang, 2000). As técnicas de imobilização de células microbianas são divididas em quatro grandes categorias: adsorção na superfície de um suporte sólido; aprisionamento no interior de um suporte poroso; auto-agregação natural por floculação ou induzidas com agentes de reticulação ou ligantes; e contenção física dentro de uma barreira. Os métodos de aprisionamento são baseados na inclusão e retenção de células dentro de uma rede rígida ou interstícios das fibras ou poros do suporte para impedir que as células se difundam no meio circunvizinho, enquanto ainda permite a transferência de nutrientes e metabólitos (Kourkoutas, 2004).

O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas inteiras (Vorlop e Klein, 1983) por ser uma metodologia simples e barata; além de ser uma técnica reprodutível que utiliza condições suaves durante o processo de imobilização (Ogbonna et al., 1989; Hulst e Tramper, 1989). Os alginatos são heteropolímeros lineares de ácidos carboxílicos compostos de subunidades monoméricas de  $\beta$ -D-ácido manurônico (M) e  $\alpha$ -L-ácido gulurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas. Estes monômeros podem ser organizados em cadeias consecutivas de resíduos G ( $G$ )<sub>n</sub>, de resíduos M ( $M$ )<sub>n</sub>, ou alternando resíduos M e G ( $MG$ )<sub>n</sub> (Figura 3).

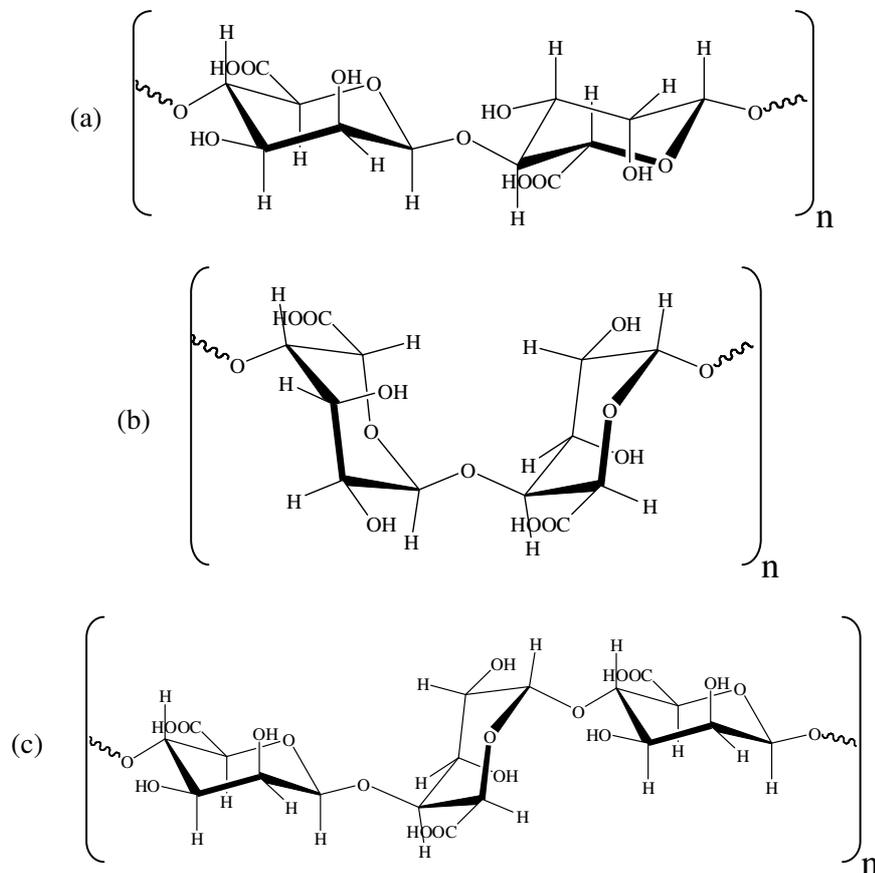


Figura 3: Composição de alginatos.

- (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos (M).
- (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos (G).
- (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados (MG).



A quantidade relativa de cada tipo de cadeia varia entre os diferentes alginatos. Existem distintas diferenças estruturais entre os tipos de cadeias (Klein et al., 1983; Ertesvag e Valla, 1998; Chan et al., 2002). Os  $(MG)_n$  formam as cadeias mais flexíveis e são mais solúveis em pH ácidos. Os  $(G)_n$  formam cadeias rígidas em que duas cadeias G, com mais de seis resíduos cada podem ser ligados por íons bivalentes levando a formação de gel. Em valores de pH baixos, alginatos de alta massa molecular protonados podem formar géis ácidos fracos. Nestes géis, a maior parte são cadeias homopoliméricas as quais formam junções, mas a estabilidade depende do conteúdo de cadeias G. Géis com grande quantidade de  $(G)_n$  exibem alta porosidade, baixo encolhimento durante a formação do gel e menor inchamento após secagem, no entanto, têm maior propensão em apresentar sinérese. Com o aumento da quantidade de  $(M)_n$ , os géis tornam-se mais macios e apresentam poros de menor tamanho.

Na imobilização com alginato uma suspensão de microrganismos é misturada a uma solução de alginato de sódio, suficiente para formar um gel firme. Essa mistura é submetida à extrusão com auxílio de mangueiras e bomba peristáltica, sendo gotejada em solução contendo sais de íons bivalentes como cloreto de cálcio formando grânulos. Após gelificação os microrganismos são retidos ou aprisionados dentro do gel. Durante a permanência na solução salina, os íons cálcio são transportados para o centro da esfera e um estado de equilíbrio é atingido variando de 15 min a 12 horas, como representado na Figura 4 (Hulst e Tramper, 1989). O tempo depende das condições experimentais como temperatura, concentração do sal, diâmetro da esfera, tipo e concentração de alginato, concentração da suspensão celular. Durante o procedimento de maturação da esfera, em solução de cloreto de cálcio, o aumento do volume pode chegar a 40% em relação ao tamanho original (Ogbonna et al., 1989; Klein et al., 1983).



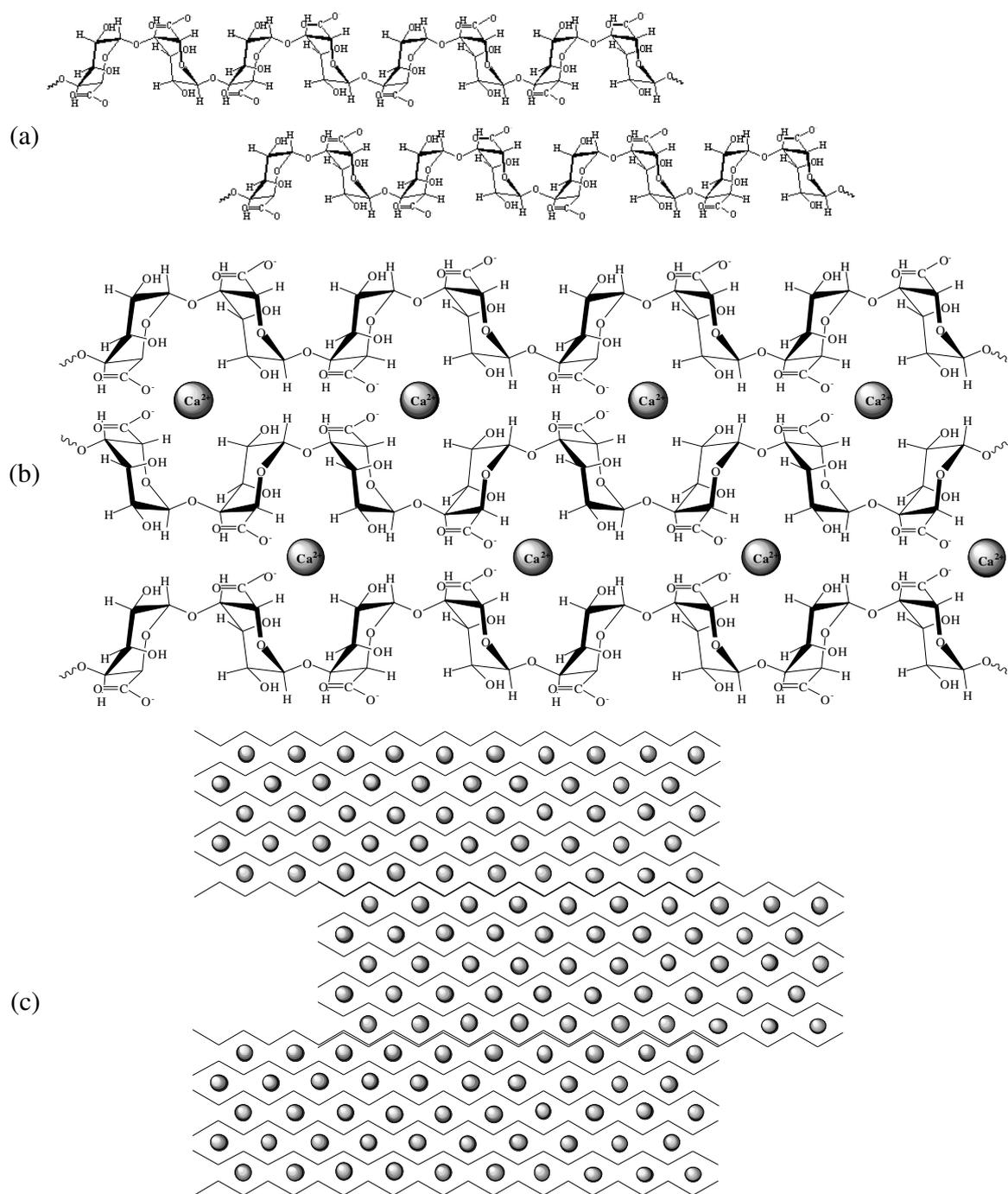


Figura 4: Ilustração da formação do gel de alginato de cálcio.

(a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução.

(b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa.

(c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio



Alguns aspectos durante a imobilização devem ser observados como a estabilidade mecânica que pode diminuir com o tempo devido à baixa concentração de alginato ou grande quantidade de células na suspensão; restrições ou limitações difusionais dependendo do tipo e concentração do gel. Uma das principais causas do rompimento dos grânulos de alginato é a quelação dos íons cálcio com outros compostos do meio, principalmente por íons fosfato que pode ser minimizada adicionando-se íons  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio.

A atividade das células imobilizadas depende do tamanho da superfície das esferas, da porosidade do gel formado, e das características hidrofílicas do suporte. A polietilenoimina é uma amina alifática polibásica utilizada nas técnicas de imobilização como um constituinte menor dando uma característica hidrofílica e maior força mecânica às preparações de células imobilizadas. Pode também ser usada como um constituinte primário do suporte como agente de reticulação ou ligação (Bahulekar et al., 1991). O glutaraldeído é empregado como aditivo no processo de imobilização como agente de ligação ou reticulação na preparação de esferas alginato de cálcio (Park e Chang, 2000).

O alginato é o suporte mais utilizado na imobilização de microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem a sacarose em isomaltulose. Shimizu et al. (1982) estudaram a produção de isomaltulose por células imobilizadas de *Serratia plymuthica* NCIB 8285 em alginato de cálcio utilizando aditivos glutaraldeído e polietilenoimina. A massa celular foi ressuspensa em solução de alginato de sódio 2% (p/v) e gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,1 N sob agitação, por 2 horas. Os grânulos formados foram recuperados por filtração e lavados com água. Todos os experimentos foram realizados em batelada, com sucessiva reutilização dos grânulos e temperatura próxima de 25°C para evitar a inativação da enzima  $\alpha$ -glicosiltransferase. A maior estabilidade durante a conversão de solução de sacarose 30% (p/p), ocorreu quando os grânulos contendo células imobilizadas foram tratados com solução de polietilenoimina 1,5% (30 g de grânulos para cada 100 mL de solução previamente neutralizada a pH 5,0-5,8 com ácido

clorídrico) e solução de glutaraldeído 1% (30 g de grânulos para cada 100 mL de solução, a 25°C, por 30 minutos).

Em estudos comparativos, foram demonstrados que células imobilizadas de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 em grânulos de gel de alginato de cálcio apresentaram estabilidade 350 vezes maior do que as células livres, alcançando-se uma meia vida de aproximadamente 8.600 horas (Cheetham et al., 1985). Após fermentação em frascos agitados a 30°C, as células foram recuperadas por centrifugação e suspensão celular 20 % (massa celular úmida/v) foi misturada com solução de alginato de sódio 5% (p/v) a pH 6,0. As células foram imobilizadas em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M pH 6,5, a temperatura ambiente. As células imobilizadas foram dispostas em colunas (200 x 15 cm), mantidas a 30°C e alimentadas com solução de sacarose 1,6M ajustada a pH 7,0. As células imobilizadas foram mais eficientes sendo obtida conversão de 90% em isomaltulose. A atividade das células imobilizadas diminuiu com o aumento da concentração das células, o que normalmente ocorre em sistemas difusionalmente limitados e também diminuiu a resistência mecânica.

Células imobilizadas de *Erwinia* sp foram utilizadas para a conversão de sacarose em isomaltulose (Bucke e Cheetham, 1987). Foram estudados diversos materiais para imobilização como ágar, κ-carragena, goma xantana, poliacrilamida, no entanto o alginato de cálcio apresentou maior eficiência. A massa celular foi ressuspensa em solução de alginato de sódio 5% (p/v) para formar, no final, uma suspensão com 20% de células (p/v). A suspensão foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,1 M a 30°C, contendo sacarose 15% (p/v) com a finalidade de estabilizar a atividade enzimática das células. As células imobilizadas foram dispostas em colunas (300 x 50 mm) e mantidas a 30°C. Foi demonstrado que a estabilidade e produtividade aumentaram com o incremento da concentração de sacarose, sendo que foi obtido maior produção de isomaltulose utilizando-se solução de sacarose 55% (p/v) e pH 7. Foram obtidos cerca de 85% a 90% de conversão inicial com meia vida de 8.500 horas.

Um novo método foi descrito para a obtenção de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, empregando-se 6-cloro-6-dioxi-sacarose, em vez de sacarose (Hashimoto et al., 1987). As células foram imobilizadas em gel de alginato de cálcio. A atividade máxima das células imobilizadas, em pH 5,5, ocorreu em 3 horas e foi proporcional a quantidade de células, sendo obtido conversão de 18%, 30% e 44% para 10, 20 e 40 mg de células/mL de solução, respectivamente.

Tsuyuki et al. (1992) utilizaram a bactéria *Klebsiella planticola* MX 10 para converter sacarose em isomaltulose. A massa celular foi misturada com solução de alginato de sódio 4% (p/v) na proporção 1:1 (v:v) e a suspensão celular foi gotejada em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,25 M sob agitação, formando grânulos com células imobilizadas. Os grânulos foram mantidos na solução por 1 hora e, posteriormente, lavados com água destilada e colocados em solução de polietilenoimina 2% pH 5,6. Após 5 minutos, os grânulos foram separados e misturados com solução de glutaraldeído 0,5 % a 5°C, por 20 minutos. As células imobilizadas foram separadas da solução de glutaraldeído e lavadas com água destilada. As células imobilizadas tratadas com polietilenoimina e glutaraldeído converteram totalmente a solução 25% de sacarose sendo obtido 65,4% de isomaltulose e 29,7% de trealulose.

A bactéria *Klebsiella* sp LX3 produtora de enzima denominada isomaltulose sintase, capaz de converter sacarose em isomaltulose e trealulose, foi imobilizada com solução de alginato de sódio 2%(p/v) em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,65% (p/v), e dispostas em colunas de leite empacotado (Li et al., 2003). Utilizando-se solução 10 % de sacarose como substrato, foram obtidos 87% de isomaltulose, 11,6% de trealulose e 1% de glicose.

Ahn et al. (2003) utilizaram a linhagem *Erwinia rhapontici* BN68089 para converter sacarose em isomaltulose. As células foram recuperadas do meio de fermentação por centrifugação a 1.000 x g a 4°C por 20 minutos e lavadas com NaCl 0,9% (p/v). A suspensão celular 40% (p/v) foi misturada com igual volume de solução de alginato de

sódio 5% (p/v). A mistura foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica, em solução de cloreto de cálcio 0,15 M para formar as células imobilizadas. Após permanecerem uma noite em solução de cloreto de cálcio a 4°C, as células foram tratadas com solução de sacarose 55% (p/v) a 30°C por 2 dias. Os grânulos foram empacotados em colunas (180 x 50 cm e capacidade de 300 mL) a 30°C e alimentados com solução de sacarose 55% (p/v) pH 7,0. Foram testadas temperaturas à 27°C, 30°C e 33°C e os rendimentos iniciais de isomaltulose foram respectivamente, 79%, 89% e 85% e diminuíram para 67%, 79% e 57% após 60 dias, respectivamente.

Moraes et al. (2002 e 2005) verificaram que a produção de isomaltulose a partir de sacarose, utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio em colunas de leito empacotado, foi em torno de 50% de isomaltulose com soluções de sacarose entre 20-30% a 35°C.

Posteriormente, Kawaguti et al. (2005 e 2006b) estudaram a influência da concentração de alginato de sódio, da suspensão de células e aplicação de aditivos glutaraldeído e polietilenoimina na imobilização de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio. As células inteiras, recuperadas após fermentação, foram ressuspendidas em água destilada e misturadas a uma solução de alginato de sódio na proporção 1:2. A mistura foi submetida à extrusão com auxílio de uma bomba peristáltica e gotejada em solução de cloreto de cálcio para a formação de esferas contendo as células imobilizadas. Foi verificado que as melhores concentrações de alginato de sódio e suspensão celular foram 2% (p/v) e 40% (massa celular úmida/v), respectivamente. Foi observado que a melhor concentração de aditivo glutaraldeído foi de 0,06% (v/v). Utilizando-se células imobilizadas em colunas de leito empacotado e solução 35% de sacarose foram obtidas taxas de conversão acima de 50% por 282 horas.

Outros suportes para imobilização celular também têm sido descritos. Células de *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 foram imobilizadas em DEAE-celulose para

conversão de sacarose em isomaltulose (Sarkki et al., 1999). Para a produção de massa celular, as células foram ressuspensas em 10 mL de solução salina e alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em frascos de 1.000 mL, contendo 300 mL de meio ajustado a pH 7,0. Os frascos foram incubados a 230 rpm por 20 horas, a 30°C. Para a imobilização da bactéria na resina trocadora aniônica, 750 mL de suspensão contendo as células foram bombeadas na coluna a um fluxo de 35 mL/h, a 25°C. Uma solução de sacarose 25% (p/v), pH 7,5 e 30°C foi bombeada continuamente na parte inferior da coluna. Este sistema permitiu a saída de CO<sub>2</sub>, proveniente da conversão, pela parte superior da coluna. O sistema foi mantido em operação por duas semanas, sendo que a conversão diminuiu com o tempo. O sistema foi renovado pela adição de meio de cultivo esterilizado. Após a conversão foi obtido 79% isomaltulose, 0,9% de trealulose, 0,9% de frutose, 0,4% de glicose e 18,5% de sacarose.

Krastanov e Yoshida (2003) estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em quitosana. As células úmidas foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) e misturadas com solução de acetato de quitosana e glutaraldeído. Após a gelificação, a mistura foi fragmentada em pequenas partículas, lavadas com tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 e mantida em solução de NaCl 0,9% (p/v) a 4°C por uma noite. Utilizando-se as células imobilizadas em frascos Erlenmeyers de 50 mL sob agitação verificaram o efeito da temperatura, do pH e da concentração do substrato na atividade enzimática. Observaram que os parâmetros ótimos foram temperatura 44-45°C, pH 6,2-6,3 e concentração de substrato de 40% de sacarose, no qual foram obtidos 80% de isomaltulose e 7% de trealulose.

Posteriormente, Krastanov et al. (2006) investigaram a conversão de sacarose em isomaltulose comparando-se os processos em batelada e contínuo, utilizando células imobilizadas de *Serratia plymuthica* em quitosana. No processo em batelada foi obtida uma produtividade específica entre 0,76 e 1,15/h (kg de sacarose convertida/kg de biocatalisador). No processo contínuo utilizando colunas de leito empacotado estudaram o

efeito da concentração do substrato sacarose (30-70%), da temperatura (30-60°C) e do tempo de residência do substrato na produtividade volumétrica específica do biocatalisador. A conversão de 98-100% de solução de sacarose de 30-50% foi obtida após tempo de residência de 1,7-3,0 horas. Utilizando-se concentrações maiores de substrato sacarose entre 60-70% foi necessário maior tempo de residência, entre 4 e 5 horas. Utilizando-se concentração de substrato de 40% foi obtido o maior rendimento em isomaltulose de 94%, sendo obtidos menores rendimentos quando se utilizaram concentrações abaixo de 40%. A estabilidade operacional das colunas de leito empacotado foi de 155 dias, quando se consideraram taxas de conversão acima de 50%. A quantidade de produto acumulado após o processo foi de 1488 Kg de isomaltulose produzida por  $\text{dm}^3$  de biocatalisador.

### **3.3. Aplicações da isomaltulose**

Os carboidratos da dieta compreendem um complexo grupo de alimentos que possuem diversas propriedades fisiológicas e nutricionais (Loo et al., 1999). A sacarose é o principal açúcar consumido no Brasil e tem a desvantagem de ser cariogênico. Bactérias do biofilme dentário, principalmente *Streptococcus mutans*, estão relacionados com o desenvolvimento de cáries dentárias como microrganismos patogênicos primários em humanos e animais. *Streptococcus mutans* produz glicosiltransferase extracelular, que catalisa a síntese de glucana extracelular solúvel e insolúvel a partir de sacarose. A síntese de glucana promove a aderência de *Streptococcus mutans* aos dentes. Estes microrganismos são capazes de metabolizar mono e dissacarídeos produzindo ácidos provocando a queda do pH da saliva e na interface biofilme-esmalte dos dentes favorecendo a desmineralização do esmalte e conseqüentemente desenvolvendo a cárie (Ooshima et al., 1983; Moynihan, 1998).

O interesse na produção de isômeros da sacarose tem aumentado devido às similaridades sensoriais e ao menor potencial cariogênico. A isomaltulose pode ser empregada na maioria dos alimentos industrializados como substituinte da sacarose sem qualquer alteração nos tradicionais processos de manufatura, sendo aplicada na confecção de produtos de panificação, caramelos, frutas enlatadas, gomas de mascar, produtos a base de chocolate, confeitos, pudins, recheios e coberturas, bebidas para esportistas e pasta de dente (Irwin e Sträter, 1991).

### **3.3.1. Cariogenicidade**

Estudos com isomaltulose, como substituto da sacarose, incluindo produção de ácidos em placa dentária *in vivo* e *in vitro*, produção de ácido em suspensão de material de biofilme dentário por *Streptococcus mutans* e efeito da isomaltulose na síntese de glucana têm sido realizados nas últimas décadas (Takazoe, 1985; Takazoe et al., 1985b).

Ooshima et al. (1983) realizaram estudos relacionados à cárie dentária em ratos utilizando a isomaltulose. A atividade cariogênica foi examinada em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Em meio contendo isomaltulose 1% (p/v), *Streptococcus mutans* pertencentes aos sorotipos a, d e g não fermentaram o carboidrato, no entanto os sorotipos b, c, e e f, fermentaram. A isomaltulose inibiu significativamente a síntese de glucana insolúvel a partir da sacarose por *Streptococcus mutans*. Em experimentos *in vivo*, ratos foram infectados com *Streptococcus mutans* 6715 e alimentados com uma dieta contendo 56% de isomaltulose e não desenvolveram cáries significativas comparadas com os grupos controles, os quais foram alimentados com sacarose, glicose, frutose ou glicose e frutose. Os autores comprovaram que a dieta em que se substituiu metade da sacarose por isomaltulose resultou em decréscimo no desenvolvimento de cáries.

O efeito de freqüentes enxágües com solução de isomaltulose e glicose na produção de ácido em placa dentária humana foram descritos (Topitsoglou et al., 1984). Após seis semanas e seis enxágües diários com solução de isomaltulose 15% (p/v) e glicose 15% (p/v) foi observado que a isomaltulose provocou menor queda de pH (de 7 a 6,2) em relação à glicose, sendo a isomaltulose considerada menos acidogênica.

Sasaki et al. (1985) compararam a cariogenicidade provocada por isomaltulose e sacarose em ratos infectados com *Streptococcus mutans* E-49. Três grupos de ratos Wistar foram alimentados com dietas contendo 56% de isomaltulose, outra contendo 56% de sacarose e uma outra composta de uma mistura de 17,5% sacarose e 38,5% isomaltulose. Os animais foram infectados com *Streptococcus mutans* E-49, sendo que metade dos animais foi mantida com a dieta por 8 semanas, e a outra metade, por 14 semanas. Somente cárie sulcal foi encontrada nos animais alimentados com isomaltulose. O grupo alimentado com sacarose apresentou lesões cáries buco-lingual, sulcal e superficial enquanto que o grupo alimentado com a mistura de açúcares apresentou menos lesões buco-lingual em relação aos animais alimentados somente com sacarose.

Takazoe et al. (1985a) indicaram a isomaltulose como possível substituto da sacarose em alimentos devido a sua baixa cariogenicidade. Foram realizados estudos incluindo produção de ácido em placa dentária e efeito da isomaltulose na síntese de glucana por *Streptococcus mutans*. Testes em humanos demonstraram que, após enxágüe da boca com soluções de isomaltulose e sacarose 25%, 40% e 50% (p/v), houve uma queda menor de pH naquelas pessoas que utilizaram isomaltulose. No estudo da determinação de produção de ácido em suspensões contendo biofilme dentário foi observado que a produção de ácido foi menor na presença de isomaltulose em relação à sacarose. Foi demonstrado que a produção de ácido foi muito baixa na presença de *Streptococcus mutans* E-49 em relação à sacarose e que nenhuma glucana insolúvel foi sintetizada a partir da isomaltulose pelo mesmo microrganismo.

Hamada (2002) citou que cárie dentária é uma doença multifuncional provocada pela interação de três fatores: dentes, bactérias cariogênicas (principalmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e fermentação de açúcares. Inicialmente há a adesão das bactérias na superfície dos dentes, acompanhada pela síntese de glucana insolúvel em água a partir da sacarose por via enzimática pela ação de glicosiltransferases. Foi demonstrado que restrições de sacarose em dietas ou uso de substituintes não fermentáveis da sacarose influenciaram na atividade de glicosiltransferases resultando em diminuição das cáries. Isômeros da sacarose como isomaltulose e trealulose não são substratos para glicosiltransferases dos *Streptococcus* e não são utilizados como fonte de energia.

### **3.3.2. Propriedades, nutrição e metabolismo da isomaltulose**

A isomaltulose possui ponto de fusão de 123-124°C, menor do que a sacarose (190°C). Possui cerca de 50% da doçura da sacarose e perfil similar, não deixando sabor residual. A solubilidade é metade da sacarose em temperatura ambiente. A viscosidade é ligeiramente menor. Não é higroscópica como a sacarose e a lactose. Resiste à hidrólise ácida (ácido cítrico 1,5-15%) e desta forma alimentos acidificados ou com vitamina C contendo isomaltulose são mais estáveis do que aqueles contendo sacarose. Soluções de isomaltulose 20% a pH 2,0 em ebulição não sofreram hidrólise, após 1 hora. A termo-estabilidade é ligeiramente menor do que a da sacarose (Takazoe, 1989; Irwin e Sträter, 1991).

A estabilidade microbiana de produtos preparados com isomaltulose é muito boa. A concentração de insulina e frutose encontrada no plasma humano, após a ingestão da isomaltulose, é aproximadamente metade daqueles encontrados após ingestão da sacarose. Em todas as quantidades testadas as taxas de aumento dos níveis de glicose, insulina e frutose no sangue, foram menores para isomaltulose do que para sacarose. Como

resultado da menor taxa de clivagem e conseqüentemente menor absorção dos monossacarídeos a partir da sacarose, nenhum aumento de desconforto intestinal foi observado. A isomaltulose é completamente absorvida, embora mais lentamente do que a sacarose (Takazoe, 1989; Irwin e Sträter, 1991).

Kawai et al. (1985) investigaram e compararam a concentração de glicose e insulina no plasma em resposta a ingestão de isomaltulose e sacarose. O nível de glicose no plasma aumentou gradualmente e atingiu um máximo de 110,9 mg/dL após 60 minutos, quando se administraram 50 g de isomaltulose, permanecendo no mesmo nível após 120 minutos. Ao se administrar 50 gramas de sacarose, o mesmo grupo de voluntários apresentou um nível máximo de glicose no plasma de 143,3 mg/dL após 30 minutos, com acentuada queda posterior. O aumento acumulativo de glicose no plasma devido a isomaltulose foi menor do que comparada à sacarose e as alterações dos níveis da insulina no plasma acompanharam paralelamente os níveis de glicose. Os resultados demonstraram que a isomaltulose é absorvida mais lentamente do que a sacarose sendo indicado como adoçante para pacientes diabéticos.

Posteriormente, foi demonstrado em experimentos *in vitro* com mucosa intestinal humana, que a isomaltulose foi metabolizada pela isomaltase independente da digestão da sacarose pela invertase e que o valor da digestão da isomaltulose foi cinco vezes menor quando comparada com a da sacarose (Kawai et al., 1989). Em estudos *in vivo* foi verificado que a administração oral de isomaltulose (1 g/Kg) provocou um leve aumento na glicose e insulina do plasma. Os resultados sugeriram que a isomaltulose pode ser utilizada como adoçante calórico por pacientes diabéticos devido ao baixo índice glicêmico.

Os efeitos teratogênicos e mutagênicos foram avaliados em fetos de ratos Wistar alimentados com dietas contendo diferentes níveis de isomaltulose (0 a 10%), do primeiro ao vigésimo primeiro dia de gestação (Lina et al., 1997). Não foram encontrados indícios

tóxicos, nenhum efeito na performance reprodutiva, em análises dos embriões, fetos, vísceras e esqueletos. A dieta contendo 10% de isomaltulose seria equivalente ao consumo de aproximadamente 7 g/Kg de peso corpóreo/dia.

O potencial toxicológico da isomaltulose também foi estudado, administrando-se dietas de 0 a 10% por 13 semanas em grupos de ratos Wistar (Jonker et al., 2002). Observações clínicas diárias como peso corporal, eficiência na conversão dos alimentos e consumo de alimentos e água, não foram afetados em nenhuma etapa do estudo. Exames oftalmológico, sanguíneo, de urina, dos tecidos, do sistema nervoso, da atividade motora e imunotoxicidade não revelaram nenhuma anormalidade devido à ingestão de isomaltulose. Foi concluído que a administração de isomaltulose na dieta até 10%, por 13 semanas, pode ser tolerado sem qualquer sinal de toxicidade.

Lina et al. (2002) relataram que a isomaltulose é um dissacarídeo de ocorrência natural comercialmente produzida pela conversão enzimática a partir da sacarose e tem sido utilizada como um adoçante no Japão desde 1985. Disponível como um substituto não cariogênico da sacarose e a disposição em produtos para diabéticos e pré-diabéticos. Estudos *in vivo* com ratos e porcos indicaram que a isomaltulose é completamente hidrolisada e absorvida no intestino delgado. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que diversas enzimas intestinais (incluindo humanas) podem hidrolisar isomaltulose. A taxa de hidrólise, no entanto, é muito baixa quando comparada com a da sacarose e maltose. Logo, os níveis de glicose e insulina no plasma sanguíneo em humanos, após administração oral, aumentaram lentamente e atingiram menor valor máximo em relação à administração da sacarose. Após absorção, frutose e glicose foram metabolizados normalmente. A administração de altas doses (de 7 e 8,1 g/Kg de massa corpórea/dia em ratos machos e fêmeas, respectivamente) de isomaltulose, não resultou em efeitos adversos. Isomaltulose não induziu toxicidade embrionária, efeitos mutagênicos ou efeitos teratogênicos em ratas grávidas e nenhum material tóxico nos fetos foi observado. Em estudos com pessoas saudáveis e diabéticas altas doses acima de 50 g foram toleradas

sem sinais de desconforto intestinal. Com bases nestes resultados conclui-se que o uso de isomaltulose como um adoçante alternativo é tão seguro quanto outros açúcares digeríveis contendo glicose e frutose.

### **3.3.3. Isomalte**

O isomalte também conhecido como Isomalt<sup>®</sup>, Palatinit<sup>®</sup>, palatinitol ou isomaltitol é uma mistura equimolar de [6-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-sorbitol] e [1-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-manitol] e é produzido por hidrogenação da isomaltulose, como representado pela Figura 5 (Snodin e Daniel, 1983; Havenaar, 1987; Irwin e Sträter, 1991; Goldscher, 1997; Degelmann et al., 2000; Duflot e Fouache, 2001). A doçura relativa do isomalte é cerca de 50% da sacarose e apresenta sabor agradável similar a da sacarose.

Ndindayino et al. (1999) relataram que há um grande interesse em açúcares alternativos, como mono e dissacarídeos álcoois, também chamados polióis, em formulações farmacêuticas. A razão deste interesse é a combinação do sabor natural adocicado, conteúdo calórico reduzido e características não cariogênicas. A maioria dos polióis pode ser consumida por diabéticos sem qualquer aumento significativo da glicose, insulina ou concentração de ácido lático. Dentre os polióis, o isomalte é um açúcar-álcool derivado da sacarose. Na primeira etapa de obtenção, a sacarose é convertida em isomaltulose pela transglicosilação enzimática. Este novo açúcar é considerado mais resistente a ácidos e à ação microbiana, pois a ligação 1-6 entre glicose e frutose é mais estável do que a ligação 1-2 da sacarose. No segundo passo do processo, o isomalte é obtido pela hidrogenação da isomaltulose em solução aquosa neutra. Além das vantagens técnicas em comparação a outros polióis, o isomalte tem a vantagem de ser similar à sacarose, muito menos higroscópico e com melhores propriedades sensoriais (Ziesenitz, 1996).

Em 1985, estimou-se que a produção de isomalte seria de aproximadamente 20.000-25.000 toneladas/ano e o preço estimado em US\$ 3/Kg. O consumo de isomalte na Europa correspondia à aproximadamente 15.000 toneladas/ano, nos Estados Unidos a 2.000-3.000 toneladas/ano e na América do Sul a 2.000 toneladas/ano (Sträter, 1985). O autor relatou que o isomalte pode ser obtido na forma cristalina, não é redutor e, ao contrário da sacarose, é extremamente estável à hidrólise enzimática. Também não pode ser fermentado por grande número de leveduras e microrganismos (Ziesenitz, 1996; Linke, 1987).

O isomalte não deixa sabor residual e tem sido utilizado como açúcar dietético em produtos de confeitaria, gomas de mascar, bebidas carbonatadas e sobremesas (Snodin e Daniel, 1983). O isomalte não é higroscópico, o ponto de fusão é de cerca de 145-150°C e não sofre reação de Maillard (Sträter, 1985; Willibald-Ettle e Schiweck, 1996). O isomalte pode ser facilmente triturado para serem obtidos grânulos de 100 µm, propriedade que é importante para a fabricação de chocolates e gomas de mascar.

O pó finamente granulado pode ser seco para uso como adoçante e pode ser moldado em tabletes (Grenby, 1983). O isomalte reforça a transferência de sabor aos alimentos e um efeito sinérgico ocorre quando é combinado com outros açúcares álcoois como xilitol, sorbitol, manitol (10%). O mesmo sinérgismo é obtido quando é combinado com outros adoçantes de doçura intensa como acessulfame-K, aspartame, ciclamato e sacarina. A adição de isomalte tende a mascarar o sabor amargo metálico residual desses adoçantes. O isomalte não tem efeito refrescante como outros açúcares álcoois (Irwin e Sträter, 1991).



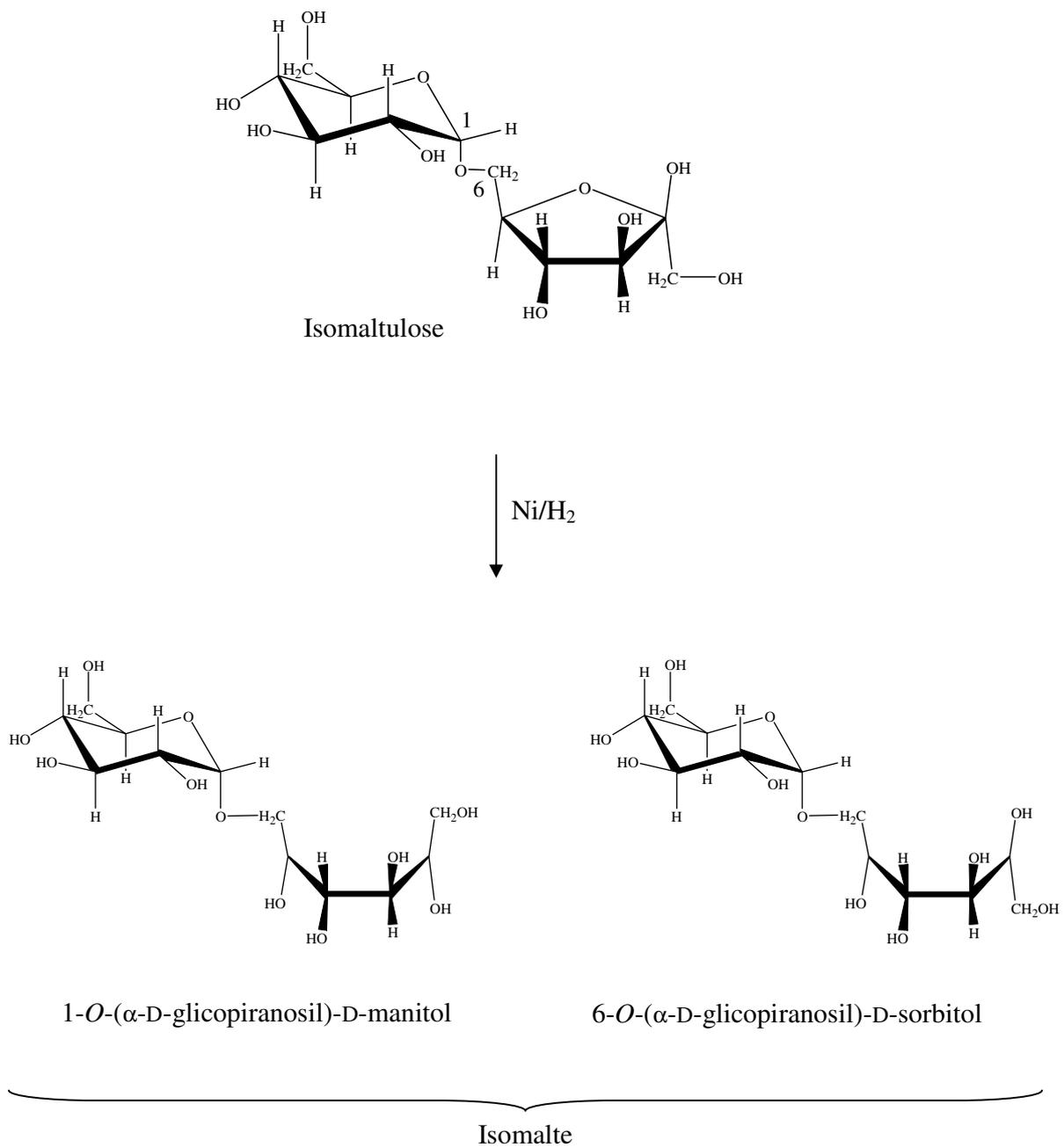


Figura 5: Conversão de isomaltulose em isomalte por hidrogenação.



## **4. MATERIAL e MÉTODOS**

### **4.1. Microrganismo e manutenção da cultura**

A linhagem *Erwinia* sp. D12 produtora da enzima intracelular glicosiltransferase, capaz de converter sacarose em isomaltulose foi utilizada neste trabalho. O microrganismo foi isolado no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP (Celestino, 1998). A cultura de *Erwinia* sp. D12 foi cultivada em tubos de meio de cultivo inclinado, composto de 6,0% de sacarose (p/v), 4,0% de peptona (p/v), 0,4% de extrato de carne (p/v) e 2,0% de ágar (p/v), durante 15 horas, a 30°C. Após incubação adicionou-se vaselina estéril aos tubos de ensaio e as culturas foram mantidas a 5°C com repicagem a cada 2 meses.

### **4.2. Otimização do meio de cultivo utilizando-se subproduto e resíduo agroindustrial para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 em frascos sob agitação**

O estudo visou a diminuição do custo do meio de fermentação do microrganismo para a produção de glicosiltransferase. Os experimentos foram realizados através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta e os dados foram tratados com auxílio do programa computacional STATISTICA<sup>®</sup>, StatSoft- versão 5.5 (2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, EUA).

Inicialmente realizou-se um planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ ) para determinar o efeito dos componentes do meio de cultivo melaço de cana-de-açúcar (Companhia Energética Santa Elisa), água de maceração de milho (Milhocina<sup>®</sup>- Corn Products do Brasil), extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (Prodesa Produtos Especiais para Alimentos

S/A),  $K_2HPO_4$  e do pH inicial na produção de glicosiltransferase (Tabela 1). Após a seleção das variáveis significativas, realizou-se a otimização da concentração das mesmas, através do planejamento composto central rotacional (Tabela 4).

#### **4.2.1. Pré-inóculo e fermentação**

A cultura de 15 horas da linhagem *Erwinia* sp. D12, descrita no item 4.1, foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Posteriormente, os frascos foram incubados em incubador com agitação New Brunswick Scientific Series 25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), a 200 rpm, a 30°C, por 15 horas.

Para o estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo na produção de glicosiltransferase foram utilizados pré-inóculos e respectivos meios de produção com a mesma composição, de acordo com os planejamentos experimentais descritos nas Tabelas 1 e 4. Alíquotas de 5 mL do pré-inóculo foram transferidas, para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultivo. Os frascos foram incubados sob agitação a 200 rpm, a 30°C, e a produção de glicosiltransferase determinada após 8 horas de fermentação. Após a incubação, os meios de cultivo foram centrifugados a 9.600 x g (centrífuga Beckman J2-21, Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA), a 5°C, por 15 minutos.

Para a extração da glicosiltransferase intracelular, a massa celular foi lavada 2 vezes com 50 mL de água destilada, ressuspensa em 50 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0. A suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a tratamento em sonicador Labline Ultra-Tip (Labline Instruments, Inc., IL, EUA) por 20 segundos, a 180-200 Watts. Após a lise da parede celular as amostras foram centrifugadas a 7.800 x g, a 5°C, por 15 minutos e a atividade da glicosiltransferase determinada no sobrenadante como descrito no item 4.2.1.1.

#### 4.2.1.1. *Determinação da atividade de glicosiltransferase*

A atividade de glicosiltransferase foi determinada através do aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose, como descrito por Uekane (1993), com modificações. A mistura de 450  $\mu$ L da solução de sacarose 4% (p/v) em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 50  $\mu$ L de solução enzimática foi incubada a 35°C por 20 minutos.

Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945), utilizando-se glicose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro, utilizou-se um “branco” substituindo-se 50  $\mu$ L de amostra por 50  $\mu$ L de água destilada na mistura de reação. Uma unidade de atividade de glicosiltransferase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou um  $\mu$ mol de isomaltulose/minuto/mL do meio de cultivo a partir de sacarose sob as condições de ensaio estabelecidas.

### **4.3. Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 em fermentador de 6,6 litros utilizando-se meio de cultivo otimizado**

A cinética de crescimento da linhagem *Erwinia* sp. D12, em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho composto de 150 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 20 g/L de água de maceração de milho, 15 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> e pH ajustado a 7,5 (Kawaguti et al., 2007), foi estudada em fermentador de 6,6 litros New Brunswick Bioflo IIc (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA).

#### ***4.3.1. Pré-inóculo e fermentação***

A cultura de 15 horas da linhagem *Erwinia* sp. D12, descrita no item 4.1, foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado como descrito acima. Os frascos foram incubados sob agitação a 200 rpm, a 30°C, por 15 horas. Uma alíquota de 300 mL de pré-inóculo, preparado como descrito anteriormente, e 3 mL de anti-espumante Dow Corning® FG-10 (D'altomare Química, São Paulo, SP, BR) foram adicionados assepticamente em fermentador de 6,6 litros contendo 2.700 mL de meio de cultivo otimizado.

A fermentação foi realizada em diferentes temperaturas (25°C, 27°C e 30°C), na qual a agitação e a aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 1 vvm (volume de ar/volume de meio de cultivo/minuto), respectivamente. Alíquotas de 20 mL de meio de cultivo foram coletadas em diferentes tempos de fermentação. A massa celular foi separada por centrifugação a 9.600 x g, a 5°C, por 15 minutos, lavada duas vezes com 20 mL de água destilada e o crescimento do microrganismo foi determinado como descrito no item 4.3.1.1. O pH do meio de cultivo foi determinado através de pHmetro Orion 710-A (Orion Research Inc, Boston, MA, EUA). A atividade de glicosiltransferase foi determinada como descrito no item 4.2.1.1.

##### ***4.3.1.1. Crescimento do microrganismo***

O crescimento celular no meio de cultivo foi monitorado através da medida da densidade ótica a 660 nm como descrito por Huang et al. (1998), com modificações. A massa celular obtida a partir das alíquotas de 20 mL como descrito anteriormente foi ressuspendida em 20 mL de água destilada. Utilizou-se espectrofotômetro Beckmann DU-70 (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA) para a leitura das amostras. Quando

necessário, a suspensão foi diluída para obtenção de absorvância na faixa de 0,1 a 0,9. Água destilada foi utilizada como branco.

#### **4.4. Otimização do processo de imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 para a conversão de sacarose em isomaltulose**

Foi estudada a imobilização das células de *Erwinia* sp. D12 e a conversão de sacarose em isomaltulose em frascos sob agitação e em colunas de leito empacotado. Foram testados o efeito do tratamento das células imobilizadas em alginato de cálcio com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na estabilidade da glicosiltransferase. Foram comparadas as imobilizações de células íntegras, células lisadas com sonicador e extrato enzimático bruto de células lisadas, em alginato de cálcio; e também, a imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana.

##### ***4.4.1. Imobilização da massa celular em alginato de cálcio***

A massa celular úmida da linhagem *Erwinia* sp. D12, para os estudos da conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas, foi obtida pela fermentação do microrganismo em meio de cultivo otimizado contendo peptona bacteriológica, sendo composto de 160 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 20 g/L de peptona bacteriológica e 15 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (Kawaguti et al., 2006b); ou em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, como descrito no item 4.2 e cultivada em fermentador de 6,6 litros por 8 horas a 27°C, como descrito no item 4.3 (Figura 6). Após a fermentação, a massa celular foi recuperada por centrifugação a 9.600 x g durante 15 minutos a 5°C e lavada duas vezes, em condições assépticas, com água destilada previamente esterilizada.





Figura 6: Fermentador de bancada de 6,6 litros New Brunswick Bioflo IIc.

Para a imobilização, uma suspensão celular contendo 40% (p/v) de células úmidas de *Erwinia* sp. D12, em água destilada esterilizada, foi misturada com solução esterilizada 2% (p/v) de alginato de sódio P.A. Synth<sup>®</sup> (Labsynth produtos para laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil), contendo 0,1% (p/v) de Tween<sup>®</sup> 80 (Riedel-deHaën, Seelze, Alemanha), na proporção 1:2 (v:v). Em seguida, a suspensão celular foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex<sup>®</sup> L/S (Cole-Parmer Instruments Co., Vernon Hills, IL, EUA) em 2% (p/v) de solução de CaCl<sub>2</sub> previamente esterilizada para formar pequenos grânulos os quais foram mantidos imersos na mesma solução de CaCl<sub>2</sub>, a 5°C, por 12 horas (Figura 7). Posteriormente, os grânulos foram lavados com água destilada para a remoção do excesso de CaCl<sub>2</sub>. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas.





(a)

(b)



(c)

Figura 7: Imobilização de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio.

- (a) gotejamento da mistura de solução de alginato de sódio e suspensão celular em solução de cloreto de cálcio com auxílio de bomba peristáltica.
- (b) grânulos de células íntegras imobilizadas em cloreto de cálcio.
- (c) grânulos de células íntegras imobilizadas.



#### ***4.4.2. Estudo preliminar da influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de Erwinia sp. D12 em alginato de cálcio com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose***

O efeito do tratamento das células íntegras imobilizadas com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído foi investigado em ensaio preliminar, pois a adição destes promoveria a estabilidade das células (Shimizu et al., 1982; Tsuyuki et al., 1992).

A massa celular de *Erwinia* sp. D12, proveniente do meio de cultivo otimizado contendo peptona bacteriológica como descrito no item 4.4.1, foi imobilizada em alginato de cálcio e tratada com solução 0,75% (p/v) de polietilenoimina, por 5 minutos sob lenta agitação. Posteriormente, os grânulos foram lavados com água destilada estéril. Em seguida, as células íntegras imobilizadas foram tratadas com solução 0,5% (v/v) de glutaraldeído por 20 minutos sob lenta agitação e depois, lavadas com água destilada estéril.

Em todos os ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose foi utilizado açúcar cristal, exceto nos itens 4.4.8 e 4.5.6. Os grânulos de células íntegras imobilizadas foram transferidos para colunas encamisadas (30 x 150 mm) e solução 35% (p/v) de sacarose foi circulada no sentido ascendente na coluna de leito empacotado, com fluxo de aproximadamente 0,33 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex<sup>®</sup> L/S.

A temperatura das colunas foi mantida a 30°C utilizando-se banho ultratermostático Quimis<sup>®</sup> Q-14M2 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Campinas, SP, BR). Utilizou-se uma coluna controle contendo células íntegras imobilizadas sem tratamento com aditivos. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 4.4.2.1.

#### *4.4.2.1. Análise de carboidratos por cromatografia líquida*

As análises dos carboidratos foram realizadas em cromatógrafo DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. A separação dos açúcares foi realizada utilizando-se coluna CarboPac™ PA 1 (4 mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPac™ PA 1 (4 mm x 50 mm) e solução de hidróxido de sódio 250 mM ou 400 mM como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, a 20°C. Os carboidratos foram analisados através do tempo de retenção, por comparação com padrões de frutose, glicose, sacarose e isomaltulose (Sigma Ultra®, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

#### *4.4.3. Otimização dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído para tratamento das células íntegras de Erwinia sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio, utilizando-se planejamento experimental*

Após verificar, em estudo preliminar, que o tratamento das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio com polietilenoimina e glutaraldeído promoveu maior estabilidade da glicosiltransferase foi realizada a otimização da concentração dos aditivos através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta utilizando-se frascos Erlenmeyers sob agitação.

A otimização foi realizada utilizando-se planejamento composto central rotacional com duas variáveis (2<sup>2</sup>-PCCR). A massa celular de *Erwinia* sp. D12 foi obtida, a partir da fermentação em meio de cultivo otimizado contendo peptona bacteriológica, como descrito no item 4.4.1 e imobilizada em alginato de cálcio como descrito anteriormente.

Os grânulos de células íntegras imobilizadas, após a permanência por 12 horas em solução de CaCl<sub>2</sub> a 5°C, foram lavados com água destilada estéril. Amostras de 20 g de

grânulos foram tratados com 100 mL de soluções de diferentes concentrações de polietilenoimina por 5 minutos, sob agitação. Posteriormente, os grânulos foram lavados com água destilada estéril e, em seguida, tratados com 100 mL de soluções de diferentes concentrações de glutaraldeído por 20 minutos (Tabelas 11 e 12) sob agitação e finalmente, lavados com água destilada estéril.

Após o tratamento com aditivos, os grânulos contendo células íntegras imobilizadas foram lavados com água destilada. Amostras de 20 g de grânulos foram ressuspendidas em 100 mL de solução 35% (p/v) de sacarose em frascos Erlenmeyers de 250 mL, sob agitação a 150 rpm, a 30°C. Alíquotas foram retiradas após 12, 24 e 36 horas de reação com substituição da solução de sacarose a cada batelada de 12 horas. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 4.4.2.1.

#### ***4.4.4. Influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de Erwinia sp. D12 com aditivo glutaraldeído na estabilidade da produção de isomaltulose utilizando-se colunas de leito empacotado***

Após o estudo da influência dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na imobilização celular e a otimização através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foi verificado que somente o glutaraldeído apresentou efeito significativo na estabilidade da glicosiltransferase.

Neste estudo foi comparada a conversão de sacarose em isomaltulose pelas células íntegras imobilizadas com aditivo glutaraldeído e células íntegras imobilizadas sem aditivo, em colunas de leito empacotado.

A massa celular de *Erwinia* sp. D12 foi obtida a partir da fermentação em meio de cultivo otimizado contendo peptona bacteriológica, e imobilizada como descrito no item

4.4.1. Os grânulos foram tratados com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído, concentração otimizada como descrito no item 4.4.3, e transferidos para colunas encamisadas (30 x 150 mm). Uma solução 35% (p/v) de sacarose foi circulada no sentido ascendente, com fluxo de aproximadamente 0,33 mL/min.

A temperatura das colunas foi mantida a 30°C e utilizou-se uma coluna controle contendo grânulos sem tratamento com aditivo. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 4.4.2.1.

***4.4.5. Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 cultivadas em diferentes meios, imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas com glutaraldeído, em colunas de leito empacotado***

A massa celular de *Erwinia* sp. D12 obtida através da fermentação a partir de dois meios de cultivo otimizados, meio contendo água de maceração de milho e meio contendo peptona bacteriológica, descritos no item 4.4.1, foram imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído, otimizado como descrito no item 4.4.3, e empacotadas em colunas encamisadas como descrito no item 4.4.2 (Figura 8).

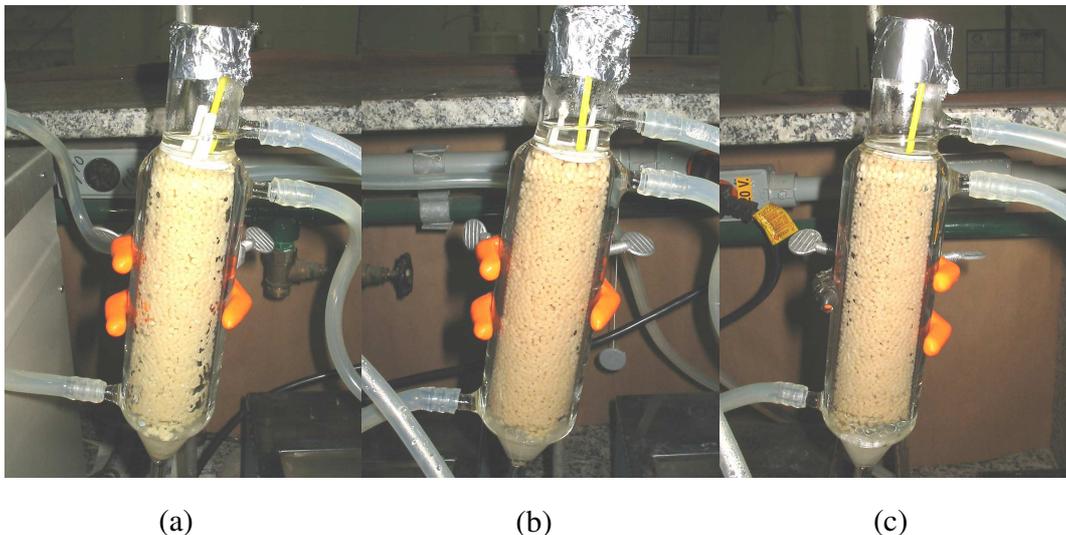


Figura 8: Grânulos de células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio dispostas em colunas de leito empacotado.

- (a) células íntegras imobilizadas sem aditivo glutaraldeído, provenientes do meio contendo peptona.
- (b) células íntegras imobilizadas com aditivo glutaraldeído, provenientes do meio contendo peptona.
- (c) células íntegras imobilizadas com aditivo glutaraldeído, provenientes do meio contendo água de maceração de milho.

Amostras de solução 35% (p/v) de sacarose foram circuladas no sentido ascendente, com fluxos de aproximadamente 0,33, 0,56 e 0,69 mL/min (Figura 9). A produção de isomaltulose foi acompanhada por 17 dias comparando-se a conversão entre as colunas contendo células íntegras imobilizadas provenientes da fermentação dos dois meios de cultivo.

A temperatura das colunas foi mantida a 30°C e a conversão de sacarose em isomaltulose acompanhada e analisada como descrito no item 4.4.2.1.





Figura 9: Produção de isomaltulose, a partir de sacarose, por células íntegras imobilizadas em colunas de leito empacotado.

- (a) banho ultratermostático para a manutenção da temperatura das colunas.
- (b) bomba peristáltica para a manutenção da alimentação das colunas.
- (c) coluna encamisada empacotada com os grânulos de células íntegras imobilizadas.
- (d) banho-maria para manutenção da temperatura do substrato sacarose.
- (e) frasco Erlenmeyer contendo substrato sacarose 35%.
- (f) frasco para recolhimento do produto convertido.



#### ***4.4.6. Estudo do tempo de vida útil das células íntegras de Erwinia sp. D12 immobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com aditivo glutaraldeído utilizando-se colunas de leite empacotado***

##### ***4.4.6.1. Comparação da vida útil das células íntegras immobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com glutaraldeído***

A massa celular de *Erwinia* sp. D12, proveniente do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho como descrito no item 4.3, foi immobilizada com alginato de cálcio como descrito no item 4.4.1. As amostras de grânulos foram tratadas com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído otimizada como descrito no item 4.4.3.

Posteriormente, os grânulos foram lavados com água destilada e empacotados em coluna encamisada como descrito no item 4.4.2. Solução 35% (p/v) de sacarose foi circulada continuamente no sentido ascendente, com fluxo de 0,56 mL/min, determinado segundo o item anterior. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C e a conversão de sacarose em isomaltulose, analisada como descrito no item 4.4.2.1, foi acompanhada por 20 dias para se verificar a vida útil e estabilidade da coluna de leite empacotado. A contagem de células viáveis no produto final foi realizada como descrito no item abaixo.

##### **4.4.6.1.1. Contagem de células viáveis**

Foi utilizada a técnica de diluições sucessivas e plaqueamento pelo método da gota (Miles & Misra, 1938), com modificações. Uma alíquota de 1 mL da solução de açúcares, após passagem pela coluna de leite empacotado, foi diluída em 9 mL de água destilada estéril e misturada vigorosamente por inversão. Esta primeira diluição foi sucessivamente diluída e gotas de 10 µL de cada diluição foram colocadas na superfície de placa de Petri

contendo meio de cultivo sacarose descrito no item 4.1. Após incubação em estufa bacteriológica a 30°C, o número de colônias presentes em cada gota foi determinado e expresso em UFC/mL.

#### *4.4.6.2. Vida útil das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio tratadas com glutaraldeído*

As células de *Erwinia* sp. D12, obtidas da fermentação em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, descrito no item 4.3, foram imobilizadas em alginato de cálcio e os grânulos contendo células íntegras imobilizadas foram tratadas com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído e dispostas em coluna de leito empacotado, como descrito no item 4.4.2. A produção de isomaltulose foi realizada como descrito no item anterior e acompanhada por 28 dias. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 4.4.2.1.

#### *4.4.7. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto de Erwinia sp. D12 imobilizados em alginato de cálcio, submetidos a diferentes tratamentos, em processo em batelada*

Foram investigadas diferentes metodologias de imobilização utilizando-se alginato de cálcio e a influência na conversão de sacarose em isomaltulose. Inicialmente, os ensaios foram realizados em batelada utilizando-se frascos Erlenmeyers sob agitação e posteriormente, colunas de leito empacotado.

A massa celular de *Erwinia* sp D 12 foi obtida da fermentação em meio de cultivo otimizado contendo peptona descrito no item 4.4.1. Amostras de 25 mL de suspensão de

massa celular 40% (p/v) foram submetidas a diferentes tratamentos como descrito a seguir:

**Células Íntegras Imobilizadas (CII):** a suspensão de massa celular foi imobilizada como descrito no item 4.4.1 e os grânulos foram tratados com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído e em seguida lavados como descrito no item 4.4.4.

**Células Íntegras Imobilizadas e Secas (CIIS):** a suspensão de massa celular foi imobilizada como descrito para CII. Posteriormente, os grânulos contendo células imobilizadas foram transferidos para placas de Petri cobertas com papel toalha e mantidos por 24 horas sob refrigeração a 5°C, 8 horas em fluxo laminar a temperatura ambiente e por mais 16 horas sob refrigeração a 5°C para a secagem.

**Células Sonicadas Imobilizadas (CSI):** a suspensão de massa celular foi resfriada a 5°C e submetida a tratamento em sonicador Labline Ultra-Tip por 40 segundos, a 180-200 Watts. Após a lise da parede celular, o extrato contendo células e glicosiltransferase foi imobilizado como descrito no item 4.4.1 e os grânulos foram tratados com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído e em seguida lavados como descrito no item 4.4.4.

**Células Sonicadas Imobilizadas e Secas (CSIS):** a suspensão de massa celular foi tratada e imobilizada como descrito para CSI, e os grânulos foram secos como descrito em CIIS.

**Células Sonicadas, tratadas com Glutaraldeído e Imobilizadas (CSGI):** a suspensão de massa celular foi sonicada como descrito para CSI. Em seguida adicionou-se 0,06% (v/v) de glutaraldeído e a suspensão foi agitada por 5 minutos em agitador magnético. A suspensão contendo células lisadas, glicosiltransferase e glutaraldeído foi imobilizada como descrito no item 4.4.1.

**Células Sonicadas, tratadas com Glutaraldeído, Imobilizadas e Secas (CSGIS):** a massa celular úmida foi tratada e imobilizada como descrito para CSGI, e os grânulos foram secos como descrito em CIIS;

**Extrato Enzimático Bruto Imobilizado (EEI):** a suspensão de massa celular foi resfriada a 5°C e submetida a tratamento em sonicador Labline Ultra-Tip por 40 segundos, a 180-200 Watts. Após a lise da parede celular a suspensão foi centrifugada a 7.800 x g, a 5°C, durante 15 minutos. Posteriormente, o extrato enzimático bruto foi imobilizado e os grânulos foram tratados com solução 0,06% (v/v) de glutaraldeído, e em seguida lavados como descrito no item 4.4.4.

**Extrato Enzimático Bruto Imobilizado e Seco (EEIS):** a suspensão de massa celular foi tratada e o extrato enzimático bruto foi imobilizado como descrito para EEI, e os grânulos foram secos como descrito em CIIS;

**Extrato Enzimático Bruto, tratado com Glutaraldeído e Imobilizado (EEGI):** a suspensão de massa celular foi tratada como descrito para EEI. Adicionou-se 0,06% (v/v) de glutaraldeído ao extrato enzimático bruto e a solução foi agitada por 5 minutos em agitador magnético. O extrato enzimático bruto contendo glutaraldeído foi imobilizado como descrito no item 4.4.1;

**Extrato Enzimático Bruto, tratado com Glutaraldeído, Imobilizado e Seco (EEGIS):** o extrato enzimático bruto foi obtido, tratado com glutaraldeído, imobilizado como descrito para EEGI, e secos como descrito em CIIS.

As amostras de grânulos de células ou de extratos imobilizados foram mantidos durante 12 horas em solução 2% (p/v) de CaCl<sub>2</sub> e lavados com água destilada esterilizada. Em seguida, amostras de 12,5 g de grânulos úmidos ou grânulos secos obtidos a partir de 12,5 g de grânulos úmidos foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 mL

contendo 100 mL de solução 35% (p/v) de sacarose que foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm, a 30°C. As amostras de 100 mL de solução de açúcares foram retiradas após 24 horas e substituídas cinco vezes por novas amostras de solução de sacarose 35% completando 120 horas de utilização dos grânulos. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 4.4.2.1.

***4.4.8. Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos de extrato enzimático bruto e de células sonicadas de Erwinia sp. D12, imobilizados em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado***

Após o estudo, em processo em batelada, dos diferentes tratamentos para a preparação dos grânulos de células ou extratos enzimáticos imobilizados em alginato de cálcio, foi testada a produção de isomaltulose em colunas de leito empacotado. As células foram obtidas a partir da fermentação em meio otimizado contendo peptona como descrito no item 4.4.1 e imobilizadas de acordo com os resultados obtidos a partir do item 4.4.7.

Os grânulos foram lavados com água destilada estéril e empacotados em colunas encamisadas. Solução 35% (p/v) de sacarose P.A. Synth<sup>®</sup> (Labsynth produtos para laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) foi circulada continuamente no sentido ascendente, com fluxo de 0,56 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C e a conversão de sacarose em isomaltulose analisada como descrito no item 4.4.2.1 para se verificar a vida útil e estabilidade da coluna.

#### ***4.4.9. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células de Erwinia sp. D12 immobilizadas com acetato de quitosana utilizando-se frascos sob agitação e metodologia de superfície de resposta***

Foi estudada a imobilização de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 com acetato de quitosana e o efeito no rendimento da conversão de sacarose em isomaltulose. Os experimentos foram realizados através da metodologia do planejamento experimental e análise de superfície de resposta. As células foram obtidas a partir da fermentação em meio otimizado contendo peptona, descrito no item 4.4.1.

A solução de acetato de quitosana foi preparada dissolvendo-se 5 g de quitosana em 100 mL de solução 1% de ácido acético (v/v). Após 3 horas, a solução foi filtrada em peneira plástica e o pH ajustado para 6 utilizando-se NaOH 5M, como descrito por Boadi e Neufeld (2001). Uma amostra de suspensão de 40% (p/v) de células úmidas de *Erwinia* sp. D12 (p/v) obtida de acordo com o item 4.4.1, a partir de meio de cultivo contendo peptona, foi adicionada na solução de quitosana na proporção 1:1 (v:v). Esta mistura foi gotejada em solução 3% de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (p/v) como descrito por Cetinus e Oztöp (2003). Após 30 minutos sob refrigeração, os grânulos foram lavados 3 vezes com tampão fosfato 0,05M pH 7,0. Os grânulos foram mantidos em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 e 0,05% de solução de glutaraldeído (p/v) por 1 hora sem agitação. Após este período os grânulos foram lavados novamente com este tampão.

Foi verificada a influência do pH, da temperatura, e da concentração de solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células íntegras immobilizadas em acetato de quitosana. Para o estudo foi realizado planejamento fatorial composto central com três variáveis (PFCC-2<sup>3</sup>). O experimento foi composto por doze ensaios, incluindo os oito ensaios referentes ao fatorial completo 2<sup>3</sup> e quatro ensaios referentes ao ponto central (0). A Tabela 15 representa o PFCC-2<sup>3</sup> utilizado para avaliar o

efeito das variáveis independentes. Cada variável foi investigada nos níveis máximo (+1) e mínimo (-1), como mostra a Tabela 16.

Amostras de 5 g de grânulos de células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 com acetato de quitosana, obtidas como descrito anteriormente, foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução de sacarose, de diferentes concentrações, em incubador a 30°C com agitação a 200 rpm. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos de reação (12, 24 e 36 horas) e analisadas como descrito no item 4.4.2.1.

#### **4.5. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres**

Visando um método alternativo de produção de isomaltulose a partir de sacarose, foram utilizadas células livres de *Erwinia* sp. D12 em processo em batelada. Foi verificado a influência dos parâmetros de conversão temperatura, pH, concentração de substrato sacarose e concentração de massa celular úmida na estabilidade e conversão de sacarose em isomaltulose. Posteriormente realizaram-se estudos para verificar a vida útil das células livres em processo em batelada.

##### ***4.5.1. Produção de massa celular***

A obtenção de células de *Erwinia* sp. D12 contendo glicosiltransferase intracelular foi realizada através do cultivo do microrganismo em fermentador New Brunswick Bioflo IIc de 6,6 litros, utilizando-se meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho e condições de processo de fermentação como descrito no item 4.3. A obtenção das células foi realizada a 27°C e 8 horas de fermentação para maior produção da enzima. A massa celular foi recuperada por centrifugação a 9.600 x g a 5°C por 15 minutos e lavada

duas vezes com água destilada estéril e, posteriormente, foram utilizadas para os ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres.

#### ***4.5.2. Influência da variação do pH, da temperatura, da concentração de solução de sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de Erwinia sp. D12***

Em estudo preliminar foi verificada a influência do pH, da temperatura, da concentração de solução de sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12.

Posteriormente utilizou-se a metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta para comparação e validação dos dados obtidos. Os resultados do planejamento experimental foram analisados através do programa computacional STATISTICA<sup>®</sup> (StatSoft Inc., versão 5.5). Os ensaios referentes ao planejamento composto central rotacional 2<sup>4</sup> (PCCR-2<sup>4</sup>) foram realizados de acordo com a Tabela 19.

O experimento preliminar e o PCCR-2<sup>4</sup> foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL sob agitação a 200 rpm contendo 25 mL de substrato sacarose em tampão fosfato em diferentes valores de pH, temperatura, concentrações de massa celular e de sacarose. Retiraram-se alíquotas em diferentes tempos de reação (15, 25 e 35 minutos). As alíquotas foram centrifugadas para separação da massa celular e analisadas em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1.

#### ***4.5.3. Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: otimização da conversão de sacarose em isomaltulose***

Continuando o estudo de otimização da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada, foram testados os ensaios dos pontos centrais (25, 26 e 27), descritos no item 4.5.1 e na Tabela 19, e dos ensaios 4 e 6, nos quais foram obtidos maior conversão em isomaltulose após 15 minutos de reação.

A massa celular da linhagem *Erwinia* sp. D12 foi obtida pela fermentação do microrganismo em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, como descrito no item 4.2, em fermentador de 6,6 litros por 8 horas a 27°C, como descrito no item 4.3 e recuperadas como descrito em 4.5.1.

Os ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres foram realizados, em duplicata, utilizando-se frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de substrato, sob agitação a 200 rpm, como descrito no item 4.5.2. Foram testadas três condições: ensaio A em que os parâmetros utilizados foram temperatura 35°C, pH 6,5, massa celular 10% e concentração de substrato sacarose 35% (p/v); ensaio B, temperatura 40°C, pH 6,1, massa celular 12,5% e concentração de substrato sacarose 27,5% (p/v); e ensaio C, temperatura 40°C, pH 6,9, massa celular 7,5% e concentração de substrato sacarose 27,5% (p/v), correspondentes aos ensaios dos pontos centrais, 6 e 4, respectivamente (Tabela 19).

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose, alíquotas de massa celular úmida, obtidas como descrito anteriormente, foram ressuspensas em 50mL de solução de sacarose em tampão fosfato 0,005 M. A cada 15 minutos, as misturas de solução de açúcares e de massa celular foram centrifugadas a 9.600 x g por 15 minutos a 5°C. Os sobrenadantes foram recolhidos em frascos para a análise de carboidratos e as amostras de

massa celular foram ressuspendidas em nova alíquota de 50 mL de solução de sacarose. Foram realizadas 10 bateladas durante o processo. Os carboidratos das amostras dos sobrenadantes foram analisados em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1.

#### ***4.5.4. Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: reativação da massa celular***

A reativação da glicosiltransferase da massa celular, após a utilização repetida das células livres de *Erwinia* sp. D12, para a conversão de sacarose em isomaltulose, foi testada incubando-se a massa celular com novo meio de cultivo.

A conversão de sacarose foi testada como descrito no ensaio A, do item anterior, utilizando-se 5g de massa celular, 50mL de solução de sacarose 35% (p/v), pH 6,5 e incubação a 35°C a 200 rpm, condições em que foi obtido maior produção de isomaltulose. Após 15 minutos de reação, a mistura de solução de açúcares e massa celular foi centrifugada a 9.600 x g por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi transferido para frasco para análises de carboidratos. A massa celular foi reutilizada oito vezes, adicionando-se solução de sacarose 35% (p/v), e o processo foi repetido incubando-se a mistura de reação nas condições descritas acima.

Após a oitava reutilização, as células foram ressuspendidas assepticamente, em 50 mL de meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho e incubadas por 12 horas, em agitador rotatório a 200 rpm, a 35°C para estudo da reativação das células e aumento da atividade de glicosiltransferase. Após incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 9.600 x g a 5°C por 15 minutos e a massa celular foi reutilizada na conversão de sacarose em isomaltulose por mais oito vezes com substituição da solução de sacarose 35% (p/v), como descrito acima. Os carboidratos das amostras de

sobrenadantes, retirados após 15 minutos de reação, foram analisados em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1.

#### ***4.5.5. Estudo da alteração da quantidade de massa celular e de células viáveis durante a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres de Erwinia sp. D12***

Foi estudada a alteração da quantidade da massa celular e de células viáveis durante a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp. D12. A massa celular úmida de *Erwinia* sp. D12. foi obtida pela fermentação do microrganismo em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho e em meio de cultivo otimizado contendo peptona como descrito no item 4.4.1; e recuperada como descrito em 4.5.1.

Os ensaios de conversão de sacarose foram realizados em batelada, como descrito no item 4.5.3. Os frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo solução de sacarose 35% (p/v) e massa celular 10 % foram incubados a 200 rpm a 35°C durante 15 minutos. Alíquotas de 1 mL da mistura de reação composta de solução de açúcares e massa celular foram transferidas para tubos contendo 9 mL de água destilada previamente esterilizados para a diluição em série e plaqueamento em meio Sacarose descrito no item 4.4.6.1.1.

Após 15 minutos de incubação, as misturas de solução de açúcares e massa celular foram centrifugadas a 9.600 x g a 5°C por 15 minutos. As amostras de sobrenadantes foram transferidas para frascos para a determinação do pH e análise dos carboidratos em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1. A recuperação da massa celular úmida foi estimada por pesagem após a centrifugação da mistura de solução de açúcares e massa celular de cada batelada de conversão de sacarose em isomaltulose. A massa celular úmida foi reutilizada adicionando-se solução de sacarose 35% (p/v), na

proporção 1:10 (g de massa celular úmida:mL de solução de sacarose 35%) e incubando-se a mistura durante 25 minutos a 200 rpm a 35°C. Foram feitas 24 bateladas, com pernoite na nona e na décima oitava bateladas.

#### ***4.5.6. Estudo da vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 na produção de isomaltulose em processo em batelada***

A vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 na conversão de sacarose em isomaltulose foi testada, em duplicata, utilizando-se 25 g de massa celular e 250 mL de solução de sacarose 35% (p/v) em tampão fosfato 0,005M pH 6,5, em frascos Erlenmeyers de 1.000 mL, com agitação a 200 rpm e incubação a 35°C. Após 15 minutos de incubação foi coletada uma alíquota de 1 mL da mistura de reação para a análise de carboidratos, sendo que no tempo de 25 minutos de incubação a mistura total de solução de açúcares e massa celular foi centrifugada a 9.600 x g a 5°C por 15 minutos.

Os sobrenadantes foram transferidos para frascos para a análise de carboidratos em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1. A massa celular úmida foi reutilizada adicionando-se solução de sacarose 35% (p/v), na proporção 1:10 (g de massa celular úmida:mL de solução de sacarose 35%) e incubando-se a mistura durante 25 minutos a 200 rpm a 35°C. Foram realizados 20 bateladas de 25 minutos de reação, com pernoite na nona e na décima oitava bateladas.

Posteriormente, realizou-se um novo ensaio, em duplicata, utilizando-se 20 g de massa celular e 200 mL de substrato sacarose P.A. Synth<sup>®</sup> (Labsynth produtos para laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) solução 35% (p/v) em tampão fosfato 0,005M pH 6,5, em frascos Erlenmeyers de 500 mL, com incubação a 35°C, a 200 rpm. O procedimento do ensaio foi realizado como descrito acima. As alíquotas, retiradas a cada 15 e 25 minutos de reação, foram centrifugadas para separação da massa celular, como

descrito anteriormente. Foram feitas 20 bateladas consecutivas sem pernoite. Os carboidratos das amostras de sobrenadante foram analisados em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1.

#### **4.6. Produção de isomaltulose a partir de sacarose por células livres de *Erwinia* sp. D12 em escala piloto**

Após o estudo da produção isomaltulose, por células livres de *Erwinia* sp. D12, em escala de bancada foram realizados ensaios piloto em que foi verificado o comportamento das células livres na produção de isomaltulose. Alguns ajustes foram necessários devido ao aumento da escala de produção.

A produção de massa celular foi realizada utilizando-se meio de cultivo otimizado como descrito no item 4.3, composto de melaço-de-cana de açúcar (150 g/L), Milhocina<sup>®</sup> (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g/L) e pH ajustado a 7,5.

##### **4.6.1. Pré- inóculo: frascos Erlenmeyers**

A cultura de 15 horas da linhagem *Erwinia* sp. D12, em meio de cultivo inclinado descrito no item 4.1, foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado descrito acima. Os frascos (Figura 10) foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C por 15 horas.





Figura 10: Frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho fermentado por células de *Erwinia* sp. D12.

#### ***4.6.2. Pré -inóculo: vaso fermentador de 10 litros***

Uma alíquota de 600 mL de pré-inóculo, preparado como descrito no item anterior foi adicionada assepticamente em vaso fermentador de 10 litros contendo 5.400 mL de meio de cultivo otimizado. A fermentação foi realizada a temperatura ambiente, por 8 horas, na qual a aeração foi mantida constante a 1 vvm (Figura 11).





Figura 11: Vaso fermentador contendo 6 litros de meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho fermentado com células de *Erwinia* sp. D12.

#### **4.6.3. Fermentação**

O conteúdo do vaso fermentador foi transferido assepticamente para fermentador de 100 litros, New Brunswick modelo Mobile Pilot Plant Fermentor New Brunswick Scientific (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), como mostra a Figura 12, contendo 54 litros de meio de cultivo otimizado e emulsão anti-espumante Dow Corning® FG-10 (Dow Corning do Brasil Ltda). A fermentação foi realizada a 32°C na qual a agitação e aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 0,5 vvm (volume de ar/volume de meio de cultivo/minuto), respectivamente. Após 15 horas de fermentação, a massa celular foi separada por centrifugação como descrito a seguir.





Figura 12: Fermentador de 100 litros New Brunswick modelo Mobile Pilot Plant Fermentor.

#### ***4.6.4. Recuperação da massa celular por centrifugação***

A massa celular foi recuperada e concentrada através da centrifugação do meio de fermentação, resfriado em banho de gelo a 15°C, em centrífuga contínua de laboratório CEPA modelo LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Geroldsecker Vorstadt, Lahr, Alemanha) a 9.600 x g (Figura 13).





Figura 13: Centrífuga contínua de laboratório CEPA modelo LE.

#### ***4.6.5. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres em escala piloto***

Os ensaios de conversão de sacarose (açúcar cristal) em isomaltulose utilizando-se células livres, em escala piloto, foram realizados em recipientes de 20 litros em banho-maria a 35°C. A amostra de massa celular úmida, obtida como descrito no item anterior, foi ressuspensa em solução de sacarose 35% (p/v), em tampão fosfato 0,003M pH 6,5, para que a concentração celular final fosse 5% ou 10% no meio de reação. As células foram recuperadas em centrífuga contínua como descrito no item 4.6.4 e reutilizadas enquanto houve atividade de glicosiltransferase. Amostras de solução de açúcares foram coletadas e analisadas em cromatógrafo líquido Dionex, como descrito no item 4.4.2.1.



## **4.7. Cristalização do Xarope**

As etapas de clarificação, purificação e cristalização da isomaltulose foram realizadas segundo Moraes et al. (2005), com modificações.

### ***4.7.1. Clarificação do xarope***

O xarope contendo alto teor de isomaltulose foi clarificado com auxílio de Sistema de Ultrafiltração Romicon® composto de bomba centrífuga de 20 gpm (76 L/min) e coluna de ultrafiltração contendo membrana de PM 50 (50.000 Da).

### ***4.7.2. Purificação do xarope***

O xarope clarificado por ultrafiltração foi purificado através de cromatografia de troca catiônica, em coluna Dowex 88 (4 x 30 cm); e aniônica, em coluna Dowex MSA1 (4 x 30 cm) em temperatura ambiente. Posteriormente, o xarope deionizado foi tratado com carvão (LF310) na concentração de 0,1% (p/v). O xarope permaneceu em contato com o carvão por 30 minutos a 45-50°C. Em seguida o xarope foi pré-filtrado sob vácuo utilizando-se Celite 508, e finalmente, o produto resultante foi filtrado em membrana de 0,45 µm.

### ***4.7.3. Cristalização***

O xarope purificado foi concentrado a cerca de 69% (p/v) em rotavapor RE 120 e a cristalização foi realizada por abaixamento lento da temperatura. O xarope foi incubado em banho-maria, inicialmente a 50°C, e submetido à agitação contínua. O banho-maria foi programado para abaixar 5°C/hora entre 50°C e 35°C. O xarope foi semeado com cristais

de isomaltulose para auxiliar a cristalização. Os cristais formados foram coletados por centrifugação contínua em centrífuga de bancada, adaptada com cesto de nylon. A secagem dos cristais de isomaltulose foi realizada em estufa à vácuo.

## **5. RESULTADOS e DISCUSSÕES**

### **5.1. Otimização do meio de cultivo utilizando-se subproduto e resíduo agroindustrial para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 em frascos sob agitação**

A metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foi utilizada para o estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo na otimização da produção da enzima glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12.

O planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  foi utilizado para avaliar as variáveis independentes melação de cana-de-açúcar (MCA), água de maceração de milho-Milhocina<sup>®</sup> (AMM), extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (ELP),  $K_2HPO_4$  e pH que apresentaram efeito significativo na atividade de glicosiltransferase. O planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  apresenta-se na Tabela 1, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 2. Cada variável independente foi avaliada nos níveis máximo (+1) e mínimo (-1). Foram realizados três ensaios correspondendo ao ponto central (0).

A Tabela 3 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade de glicosiltransferase e limites de 95% de nível de confiança ( $p < 0,05$ ). Pode-se observar que as variáveis independentes MCA, ELP e pH apresentaram efeitos positivos e significativos na faixa estudada a um nível de confiança de 95%. A variável AMM apresentou efeito positivo, mas não significativo na faixa e níveis estudados, sendo fixada

na concentração de 20 g/L para posterior otimização utilizando-se delineamento composto central. A variável independente  $K_2HPO_4$  apresentou efeito negativo sobre a atividade de glicosiltransferase, mas não foi significativo a 95,0% de nível de confiança, sendo fixada no nível inferior (-1) de 0,5 g/L.

Tabela 1: Planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>,  $K_2HPO_4$  e pH) na atividade de glicosiltransferase

Ensaio	Variável					Atividade (UA/mL)
	MCA <sup>a</sup>	AMM <sup>b</sup>	ELP <sup>c</sup>	$K_2HPO_4$	pH	
1	-1	-1	-1	-1	1	2,27
2	1	-1	-1	-1	-1	1,11
3	-1	1	-1	-1	-1	4,11
4	1	1	-1	-1	1	12,44
5	-1	-1	1	-1	-1	3,59
6	1	-1	1	-1	1	14,68
7	-1	1	1	-1	1	5,56
8	1	1	1	-1	-1	0,20
9	-1	-1	-1	1	-1	2,40
10	1	-1	-1	1	1	5,89
11	-1	1	-1	1	1	5,77
12	1	1	-1	1	-1	0,20
13	-1	-1	1	1	1	5,12
14	1	-1	1	1	-1	0,68
15	-1	1	1	1	-1	4,82
16	1	1	1	1	1	11,92
17	0	0	0	0	0	11,29
18	0	0	0	0	0	12,28
19	0	0	0	0	0	11,30

<sup>a</sup>MCA: melaço de cana de açúcar; <sup>b</sup>AMM: água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>; <sup>c</sup>ELP: extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

Tabela 2: Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e pH) na atividade de glicosiltransferase

Variável	Nível		
	-1	0	+1
MCA <sup>a</sup> (g/L)	20,0	100,0	180,0
AMM <sup>b</sup> (g/L)	5,0	20,0	35,0
ELP <sup>c</sup> (g/L)	5,0	10,0	15,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	0,5	1,0	1,5
pH	5,0	7,0	9,0

<sup>a</sup>MCA: melaço de cana de açúcar; <sup>b</sup>AMM: água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>; <sup>c</sup>ELP: extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

Tabela 3: Efeitos principais dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e pH) na atividade de glicosiltransferase

	Efeito	Erro padrão	t (2)	p
Média*	1,6844	0,2843	5,9246	0,0273
(1) MCA <sup>a*</sup>	1,1621	0,2843	4,0874	0,0550
(2) AMM <sup>b</sup>	1,5451	0,2843	5,4344	0,0322
(3) ELP <sup>c*</sup>	-0,8963	0,2843	-3,1526	0,0876
(4) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6844	0,2843	5,9246	0,0273
(5) pH*	5,8192	0,2843	20,4675	0,0024

<sup>a</sup>MCA: melaço de cana de açúcar; <sup>b</sup>AMM: água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup>; <sup>c</sup>ELP: extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

\*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança (p<0,05).

O planejamento composto central rotacional  $2^3$  (PCCR- $2^3$ ) foi utilizado para otimizar as variáveis independentes melaço de cana-de-açúcar (MCA), extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (ELP) e pH, previamente selecionadas a partir do planejamento fatorial fracionário. O PCCR- $2^3$  contendo 17 ensaios incluindo 8 ensaios referentes ao fatorial completo  $2^3$ , 8 ensaios referentes aos pontos axiais ( $\alpha=1,68$ ), a triplicata no ponto central

(0) e a variável dependente atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 4, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 5.

A Tabela 6 apresenta os valores de t, p e coeficientes de regressão utilizados para a construção do modelo polinomial quadrático da atividade de glicosiltransferase a partir das variáveis estudadas. Os valores de p são utilizados para checar a significância de cada coeficiente e também indicam a importância de cada variável ou interação entre variáveis na resposta do modelo. Quanto maior a magnitude do valor de t e menor o valor de p, maior será a significância do coeficiente, como pode ser observado na Tabela 6, em que somente MCA (L) e a interação entre ELP e pH não foram significativos a 95% de nível de confiança ( $p < 0,05$ ).

A análise de variância (ANOVA) está representada na Tabela 7. As medidas de correlação utilizadas para se estimar o modelo foram o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Quanto maior a proximidade de R da unidade (1) melhor a correlação entre os valores de atividade preditos pelo modelo e os valores observados. Foi obtido um valor de R de 0,98 indicando uma correlação satisfatória. O valor do coeficiente de determinação obtido foi de 0,97 indicando que apenas 3% do total da variação das respostas obtidas não é explicado pelo modelo. O valor de F obtido a partir da ANOVA foi de 38,33 (11,65 vezes maior do que o valor de  $F_{\text{tabelado}}=3,29$ ) indicou que o modelo para a atividade de glicosiltransferase pode ser considerado estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança. Estes resultados podem ser considerados excelentes a 95% de nível de confiança e suficientes, permitindo obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas. A partir da validação dos parâmetros de estudo, foi obtido o modelo polinomial quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática (Equação 1):

$$\text{Atividade} = 10,76 - 1,74.MCA^2 + 0,57.ELP - 1,10ELP^2 - 0,70.pH - 0,33.pH^2 - 0,50.MCA.ELP + 0,56.MCA.pH \quad (1)$$

Tabela 4: Planejamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> codificado para otimização dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase

Ensaio	Variável			Atividade (UA/mL)
	MCA <sup>a</sup>	ELP <sup>b</sup>	pH	
1	-1	-1	-1	7,88
2	+1	-1	-1	7,53
3	-1	+1	-1	10,21
4	+1	+1	-1	7,77
5	-1	-1	+1	5,56
6	+1	-1	+1	7,37
7	-1	+1	+1	7,83
8	+1	+1	+1	7,71
9	-1,68	0	0	4,96
10	+1,68	0	0	6,35
11	0	-1,68	0	6,71
12	0	+1,68	0	8,23
13	0	0	-1,68	0,70
14	0	0	+1,68	8,26
15	0	0	0	10,84
16	0	0	0	10,64
17	0	0	0	10,72

<sup>a</sup>MCA: melaço de cana de açúcar; <sup>b</sup>ELP: extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

Água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup> fixado em 20 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fixado em 0,5 g/L.

Tabela 5: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> para otimização dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase

Variável	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
MCA <sup>a</sup> (g/L)	30,00	78,60	150,00	221,40	270,00
ELP <sup>b</sup> (g/L)	2,00	7,30	15,00	22,70	28,00
pH (g/L)	6,0	7,6	8,5	9,4	10,0

<sup>a</sup>MCA: melaço de cana de açúcar; <sup>b</sup>ELP: extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

Tabela 6: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança na otimização dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
<b>Média*</b>	10.7563	0.0584	184.2307	3.5265E-07
<b>(1) Melaço (L)</b>	0.0895	0.0316	2.8284	6.6277E-02
<b>Melaço (Q)*</b>	-1.7367	0.0337	-51.5419	1.6084E-05
<b>(2) ELP (L)*</b>	0.5667	0.0316	17.9065	3.7982E-04
<b>ELP (Q)*</b>	-1.0954	0.0337	-32.5098	6.3966E-05
<b>(3) pH (L)*</b>	-0.6972	0.0391	-17.8304	3.8467E-04
<b>pH (Q)*</b>	-0.3292	0.0419	-7.8659	4.2808E-03
<b>1L x 2L*</b>	-0.5025	0.0413	-12.1575	1.1980E-03
<b>1L x 3L*</b>	0.5611	0.0413	13.5749	8.6465E-04
<b>2L x 3L</b>	0.0041	0.0413	0.0988	9.2750E-01

\*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

L: parâmetro linear; Q: parâmetro quadrático.

Tabela 7: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> e pH) na atividade de glicosiltransferase

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Teste F</b>
<b>Regressão</b>	53,66	07	7,67	38,33
<b>Resíduos</b>	1,80	09	0,20	
<b>Falta de Ajuste</b>	1,76	06		
<b>Erro Puro</b>	0,04	03		
<b>Total</b>	55,46	16		

Coeficiente de correlação:  $R^2 = 0,97$ .

$F_{0,95;7;9} = 3,29$ .

O modelo polinomial quadrático foi utilizado para construir as superfícies de resposta e curvas de contorno. As Figuras 14a e 14b mostram os efeitos dos componentes melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e pH, na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12.

As Figuras 14a e 14b indicam que para a variável MCA a faixa em que se obteria a maior atividade enzimática seria 80-200 g/L, sendo a concentração ótima de 150 g/L. Valores acima de 200 g/L desta concentração provocaram queda na produção de glicosiltransferase, provavelmente devido à inibição do crescimento do microrganismo em altas concentrações de açúcares. Com relação a variável ELP a faixa de concentração de 10-24 g/L estimularia a produção da enzima, em que a concentração ótima foi de 15 g/L (Figura 14b). Pode-se observar, pela Figura 14a, que a produção de glicosiltransferase atingiu altos valores na faixa de pH entre 7,5 e 9,0.

Utilizando-se meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana-de-açúcar (150 g/L), água de maceração de milho (20 g/L), extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/L) e pH 8,5 foi obtido a maior atividade enzimática de 10,84 UA/mL de glicosiltransferase na fermentação pela linhagem de *Erwinia* sp. D12.

Simultaneamente ao planejamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> foram realizados ensaios utilizando-se meio de cultivo composto pelas concentrações referentes ao ensaio do ponto central (0). No entanto, não se adicionou K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e o pH foi ajustado para 7,5, sendo obtido atividade de glicosiltransferase de 12,40 UA/mL de meio de cultivo após 8 horas de fermentação. O valor de atividade foi maior do que a atividade média obtida de 10,77 UA/mL de meio de cultivo utilizando-se meio de cultivo otimizado, correspondente aos pontos centrais do PCCR- 2<sup>3</sup>.

A atividade de glicosiltransferase foi 4,2 vezes maior do que a obtida pela linhagem *Klebsiella* sp. de 2,95 UA/mL em que as células foram fermentadas em meio de cultivo contendo 1% de peptona bacteriológica, 0,4% de extrato de carne e 4% de sacarose (Park et al., 1996). Huang et al. (1998) examinaram os efeitos de diferentes fontes de carbono, fontes de nitrogênio e sais na produção da enzima intracelular de *Klebsiella planticola* CCRC 19112. Os autores obtiveram atividade máxima de 11,08 UA/mL em meio de cultivo composto de 1% de triptona bacteriológica, caldo de triptona de soja e 0,5% de

NaCl. Utilizando-se meio de cultivo composto de 1,5 g/L de peptona, 0,5 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 g/L de  $K_2HPO_4$ , 1 g/L NaCl, e diferentes fontes de carbono, Li et al. (2003), obtiveram melhores resultados utilizando-se sacarose, rafinose e frutose, obtendo-se respectivamente, 15,12 UA/mL, 13,62 UA/mL e 11,08 UA/mL a partir da fermentação da linhagem *Klebsiella* sp. LX3.

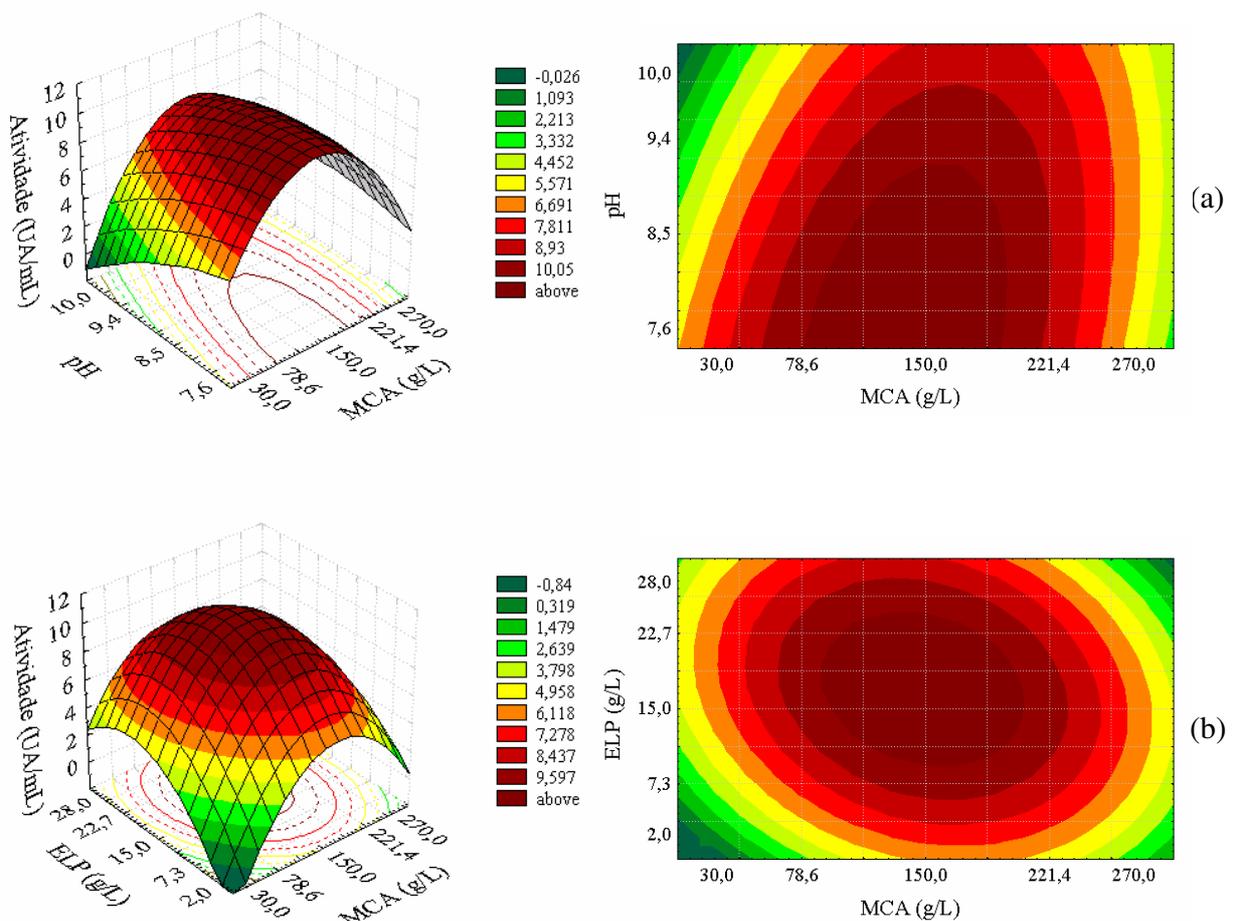


Figura 14: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase.

(a) em função da concentração de melão de cana (MCA) e pH.

(b) em função da concentração de melão de cana (MCA) e extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (ELP) (Água de maceração de milho- Milhocina<sup>®</sup> fixado em 20 g/L;  $K_2HPO_4$  fixado em 0,5 g/L).



Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o melaço de cana-de-açúcar, o extrato de levedura comercial Prodex Lac SD<sup>®</sup> e a água de maceração de milho são excelentes fontes de carbono e nitrogênio contribuindo para o crescimento microbiano e produção da enzima glicosiltransferase, além de diminuir os custos de fermentação do microrganismo e, posteriormente, do processo de produção de isomaltulose.

## **5.2. Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 em fermentador de 6,6 litros utilizando-se meio de cultivo otimizado**

A produção de glicosiltransferase foi realizada em fermentador de 6,6 L a partir de meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana-de-açúcar (150 g/L), água de maceração de milho (20 g/L), extrato de levedura Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g/L) e pH ajustado a 7,5. No estudo da relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12, nas temperaturas de 25°C, 27°C e 30°C com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm, foi obtido maior atividade de glicosiltransferase de 22,49 UA/mL de meio de cultivo após 8 h de fermentação, a 27°C.

As Tabelas 8, 9, e 10 e as Figuras 15, 16 e 17 mostram as cinéticas de crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12 a partir de meio de cultivo otimizado. Pode-se observar que a produção de glicosiltransferase, nas três temperaturas, coincide com a fase de crescimento exponencial e que, após 8 a 9 horas de fermentação, a atividade começa a declinar. Verifica-se ainda, que a fase lag do crescimento microbiano é muito curta e que o pH permanece praticamente constante, em torno de 6, durante a fermentação, indicando que há pouca produção de compostos ácidos no meio.



Tabela 8: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp. D12 em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, em fermentador de 6,6 L, a 25°C

Tempo (horas)	Massa Celular (DO/660nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	93,70	0,61	6,4
4	117,64	4,21	6,3
6	151,94	11,88	6,3
7	173,24	16,03	6,3
8	165,92	17,12	6,4
9	161,44	21,59	6,4
10	175,02	16,28	6,4
11	179,78	15,19	6,3
12	197,96	15,61	6,2
26	232,28	17,79	6,0

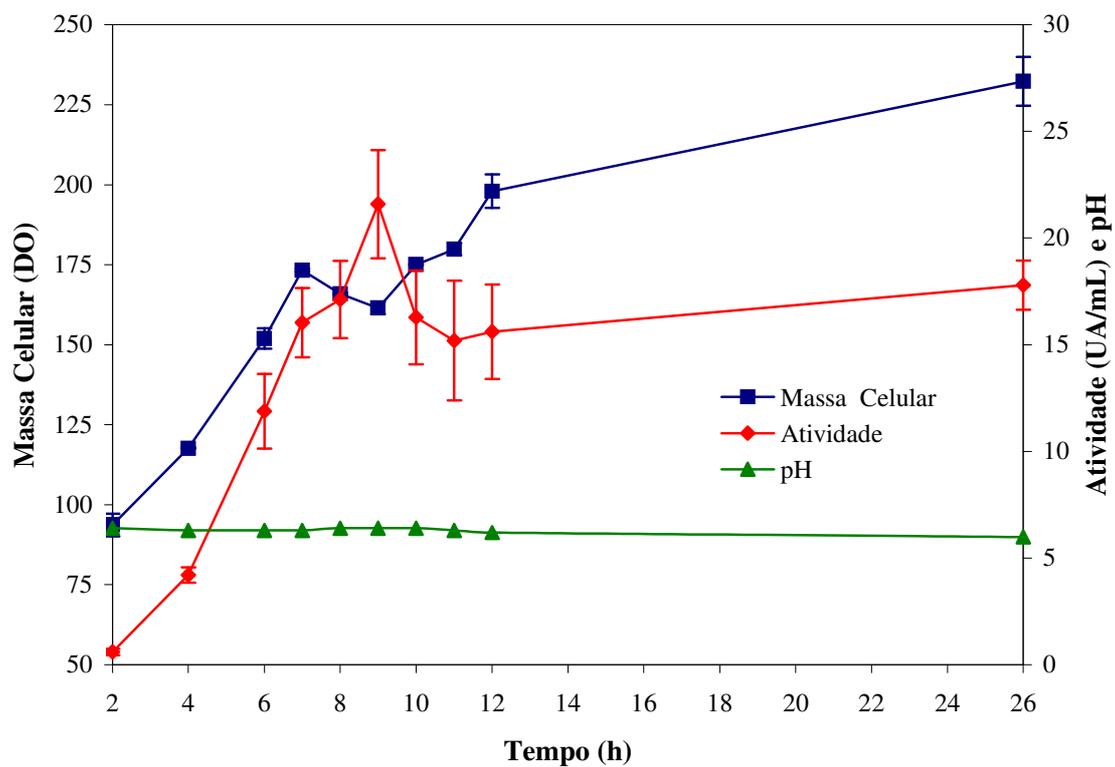


Figura 15: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho a 25°C.



Tabela 9: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp. D12 em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, em fermentador de 6,6 L, a 27°C

Tempo (horas)	Massa Celular (DO/660nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	105,34	0,83	6,1
4	144,26	7,89	6,2
6	178,56	15,41	6,2
7	182,40	21,22	6,2
8	188,68	22,49	6,2
9	188,10	16,75	6,3
10	196,38	16,63	6,2
11	208,94	14,88	6,1
12	196,90	15,73	6,1
26	211,14	16,77	5,9

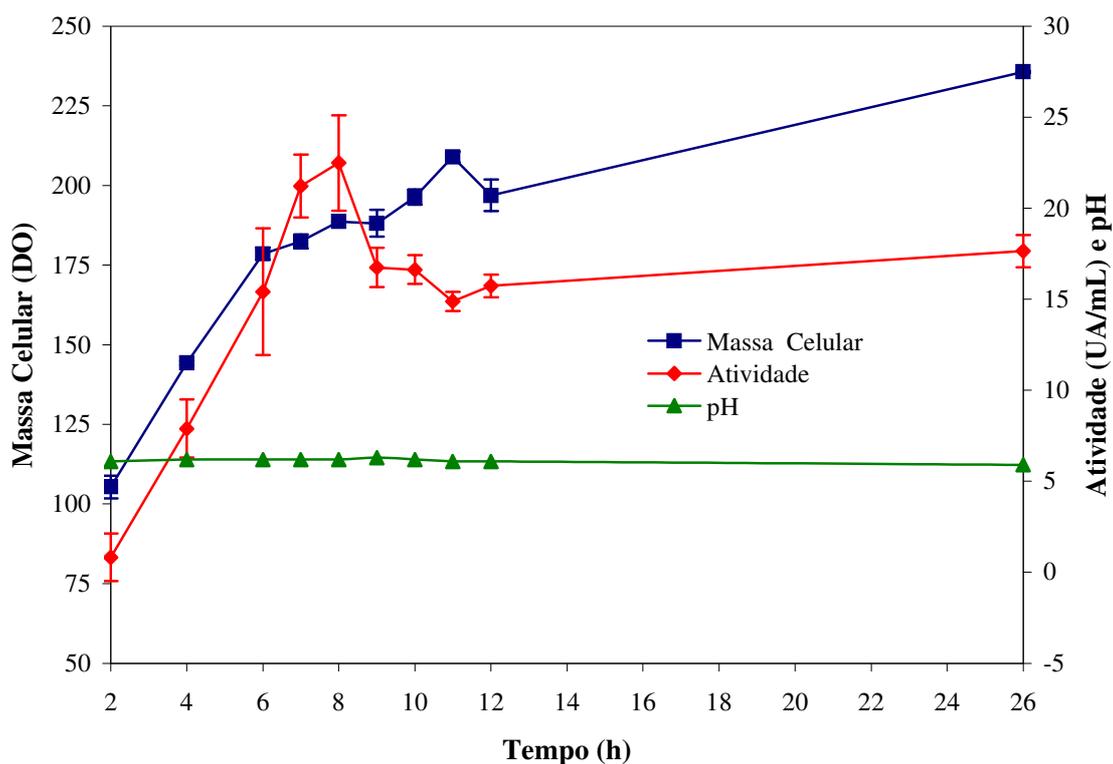


Figura 16: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho a 27°C.



Tabela 10: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp. D12 em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, em fermentador de 6,6 L, a 30°C

Tempo (horas)	Massa Celular (DO/660nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	102,40	1,92	6,1
4	139,72	10,10	6,1
6	186,02	13,60	6,1
7	145,18	10,21	6,2
8	181,68	17,05	6,1
9	208,98	8,50	6,0
10	209,96	6,04	5,9
11	213,28	4,74	5,9
12	211,88	4,84	5,9
26	236,58	5,61	5,9

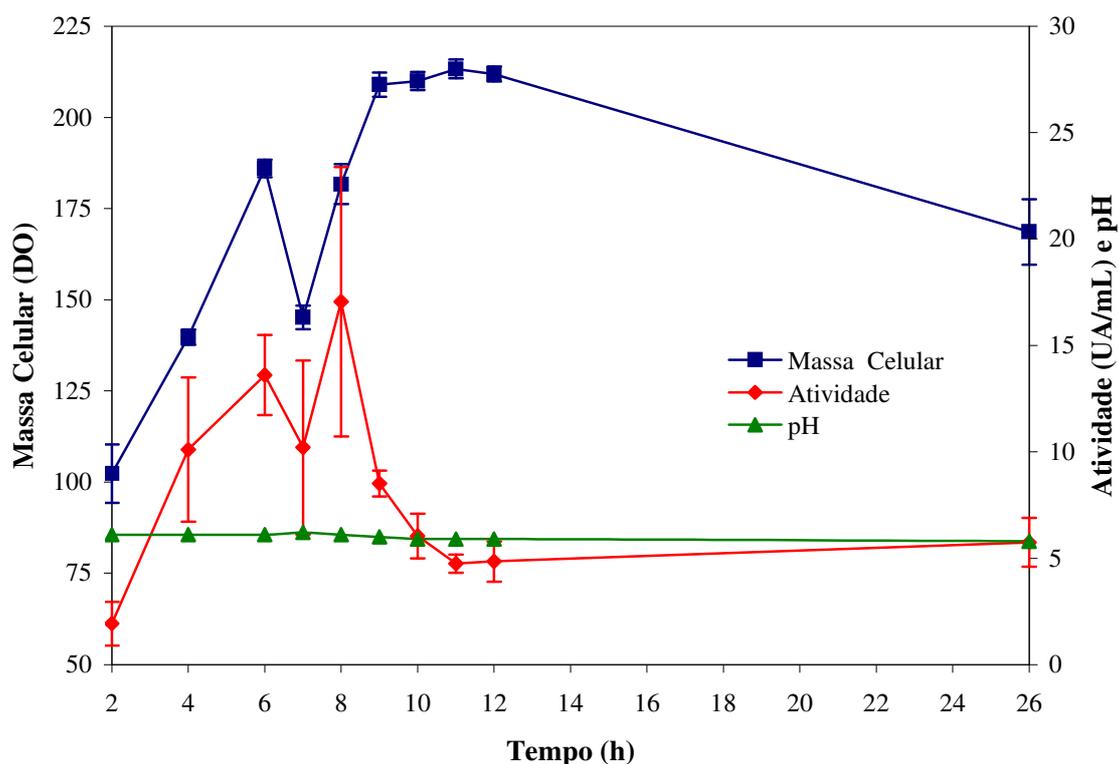


Figura 17: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho a 30°C.



A Tabela 8 e Figura 15 mostram que a maior atividade de 21,59 UA/mL de meio de cultivo, a 25°C, foi obtida após 9 horas de fermentação. Na fermentação a 27°C, como mostram a Tabela 9 e Figura 16 foi obtida a maior atividade de 22,49 UA/mL de meio de cultivo após 8 horas de fermentação. Tanto a 25°C como a 27°C houve uma queda gradual na atividade ao longo da fermentação, obtendo-se após 26 horas 17,79 UA/mL de meio de cultivo e 16,77 UA/mL de meio de cultivo, respectivamente. A Tabela 10 e a Figura 17 mostram que, na fermentação do microrganismo a 30°C, houve uma menor produção de glicosiltransferase sendo obtido 17,05 UA/mL de meio de cultivo após 8 horas. O declínio na atividade enzimática foi acentuada após 8 horas, atingindo uma baixa atividade de 5,61 UA/mL de meio de cultivo após 26 horas.

A produção da enzima glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 é influenciada pela temperatura e pelo tempo de fermentação, como se verifica nas Tabelas 8, 9, e 10 e nas Figuras 15, 16 e 17. A maior atividade enzimática de 22,49 UA/mL de meio de cultivo foi obtida após 8 h de fermentação a 27°C, durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo, indicando que a enzima produzida seria um metabólito primário, ou seja, associado ao crescimento celular. O pH do meio de cultivo permaneceu próximo de 6,0, sem alterações significativas, ao longo da fermentação nas três temperaturas, sugerindo pouca produção de compostos ácidos como subproduto.

A produção de enzima em fermentador foi semelhante ao resultado obtido por Moraes et al (2005), utilizando a bactéria *Erwinia* sp. D12 em meio de cultivo composto de 4% de peptona bacteriológica, 0,4% de extrato de carne e 12% de melaço de cana-de-açúcar, em que foi obtida máxima atividade de 15,61 UA/mL de meio de cultivo, após 8 h de fermentação a 30°C. Os autores ainda verificaram que, em temperaturas mais altas, como a 30°C, houve uma queda rápida da atividade enzimática durante a fermentação, devido ao fato da enzima glicosiltransferase ser termossensível, relatada anteriormente por Celestino (1998).

### **5.3. Otimização do processo de imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 para a conversão de sacarose em isomaltulose**

#### ***5.3.1. Estudo preliminar da influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio com os aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose***

Em ensaio preliminar foram estudados a influência do tratamento das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio com aditivos polietilenoimina e glutaraldeído e o efeito na estabilidade das células na produção de isomaltulose como descrito no item 4.4.2.

A Figura 18 mostra a produção de isomaltulose utilizando-se grânulos contendo células íntegras imobilizadas com e sem tratamento de aditivos polietilenoimina e glutaraldeído em colunas de leito empacotado. Pode-se observar que, utilizando-se grânulos sem tratamento com aditivos, a maior conversão de 60,54% ocorreu após 12 horas. Foi verificado que a conversão manteve-se alta até 60 horas, com 47,96% de conversão. Após 72 horas foi obtido 33,94 % de conversão sendo que, após este período, ocorreu uma queda acentuada e gradativa da transformação de sacarose em isomaltulose atingindo-se uma conversão de 3,15 % após 192 horas.

A coluna empacotada com grânulos contendo células imobilizadas tratadas com aditivos mostrou maior estabilidade. A conversão inicial foi menor em relação à coluna contendo grânulos sem tratamento com aditivos, no entanto a conversão de 27,15% de isomaltulose obtida após 12 horas aumentou gradativamente atingindo-se máxima conversão de 47,86%, após 84 horas. A conversão permaneceu estável, entre 40-45% até 168 horas, declinando para 25,18% após 192 horas. Foi verificado que o tratamento dos grânulos com os aditivos, polietilenoimina e glutaraldeído, diminuiu a atividade e

conseqüentemente a conversão de sacarose em isomaltulose, no entanto houve um aumento significativo na estabilidade das células imobilizadas.

De acordo com a literatura, a utilização de aditivos na imobilização de células, apesar de provocar uma queda na atividade enzimática e conseqüentemente na conversão, mostrou-se benéfica no aumento da estabilidade enzimática, obtendo-se a conversão de substrato a produto por um período maior do que aquelas células sem tratamento com aditivos (Shimizu et al., 1982 e Tsuyuki et al., 1992).

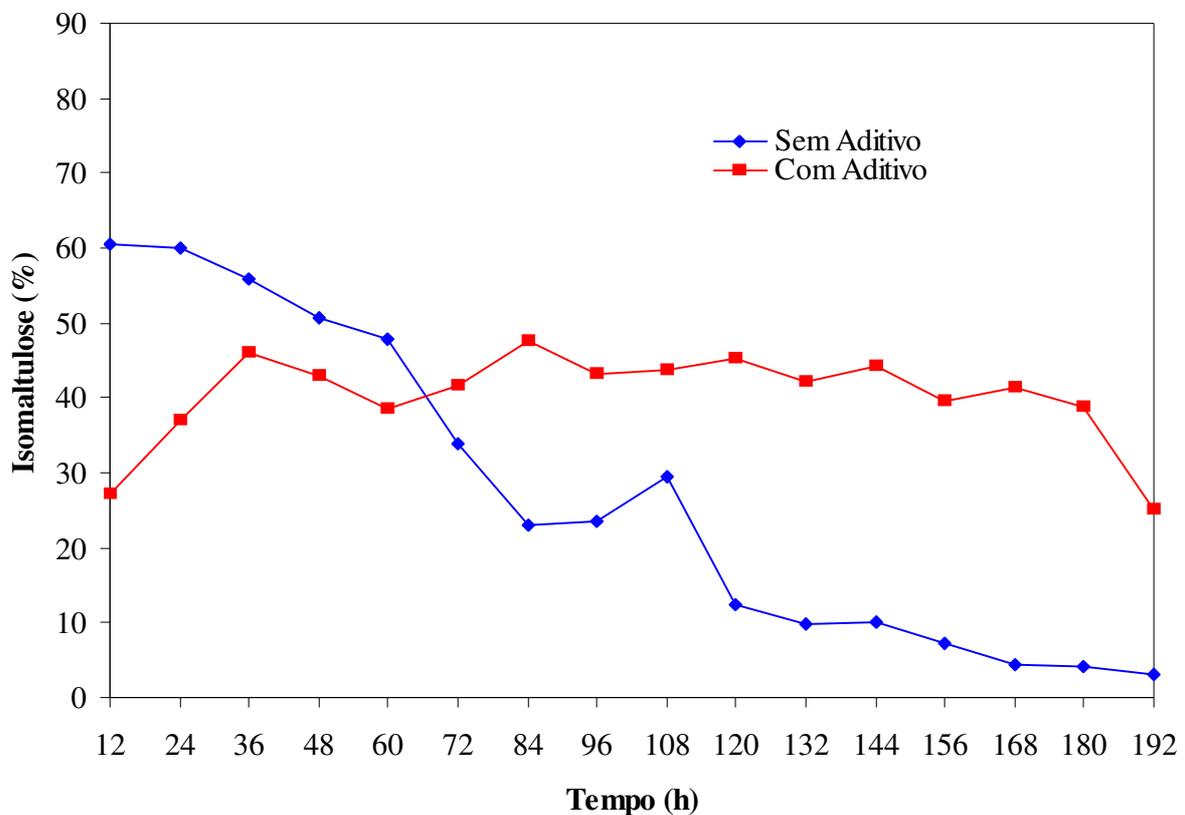


Figura 18: Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos contendo células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12, em alginato de cálcio, com e sem tratamento de aditivos polietilenoimina e glutaraldeído, em colunas de leito empacotado.



### ***5.3.2. Otimização dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na imobilização das células íntegras de Erwinia sp. D12 em alginato de cálcio, utilizando-se planejamento experimental***

Após o estudo preliminar, foi realizada a otimização dos aditivos no tratamento dos grânulos contendo células íntegras imobilizadas e a influência dos aditivos na conversão de sacarose em isomaltulose como descrito no item 4.4.3. Utilizou-se a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta com o objetivo de determinar as concentrações ótimas de polietilenoimina e glutaraldeído e racionalizar o uso destes aditivos e obter maior estabilidade das células imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose.

O planejamento composto central rotacional  $2^2$  ( $2^2$ -PCCR) utilizado para avaliar as variáveis independentes polietilenoimina e glutaraldeído e a variável dependente ou resposta, dada pela conversão de sacarose em isomaltulose (%), está ilustrado na Tabela 11. Os ensaios foram realizados em frascos sob agitação totalizando 11 experimentos incluindo quatro ensaios referentes ao fatorial  $2^2$  (-1 e +1), três repetições no ponto central (0) para se estimar o erro e conseqüente análise de variância e 4 ensaios nos pontos axiais ( $\alpha = 1,41$ ) para se obter o modelo polinomial quadrático, gerando após validação estatística, a superfície de resposta e a curva de contorno.

A conversão de sacarose em isomaltulose foi avaliada após 12 horas, 24 horas e 36 horas, no entanto como as maiores taxas de conversão foram observadas após 12 horas, as análises estatísticas foram realizadas neste período. Pode-se observar que a conversão de sacarose em isomaltulose variou de um mínimo de 38,99% no ensaio 2 (0,75% de polietilenoimina e 0,02% de glutaraldeído) e atingiu máxima conversão de 72,27 % no ensaio 5 (0% de polietilenoimina e 0,06% de glutaraldeído), após 12 horas de conversão. Os três níveis estudados das concentrações dos componentes de meio de cultivo

polietilenoimina e glutaraldeído e os seus valores decodificados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 11: Planejamento composto central rotacional-2<sup>2</sup> codificado no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose

Ensaio	Variável		Isomaltulose (%)		
	Polietilenoimina	Glutaraldeído	12 horas	24 horas	36 horas
1	-1	-1	65,92	56,65	52,30
2	+1	-1	38,99	47,27	49,41
3	-1	+1	68,35	61,75	63,18
4	+1	+1	45,89	50,77	51,58
5	-1,41	0	72,27	56,96	55,73
6	1,41	0	33,25	47,83	52,76
7	0	-1,41	32,54	45,01	44,65
8	0	1,41	42,08	58,40	47,69
9	0	0	58,52	48,76	47,69
10	0	0	61,33	47,02	47,89
11	0	0	57,17	50,48	48,49

Tabela 12: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central rotacional-2<sup>2</sup> codificado no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Polietilenoimina (p/v %)	0,0	0,10	0,38	0,65	0,75
Glutaraldeído (v/v %)	0,0	0,02	0,06	0,11	0,13

A Tabela 13 apresenta os valores de t, p e coeficientes de regressão para a conversão de sacarose em isomaltulose por grânulos contendo células íntegras imobilizadas e tratadas com aditivos e utilizados para a construção do modelo polinomial quadrático. A

Tabela 14 representa a análise de variância (ANOVA) utilizada para a validação estatística do modelo a partir das variáveis, polietilenoimina e glutaraldeído, estudadas.

Observa-se, na Tabela 13, que de todos os parâmetros somente a polietilenoimina quadrático e a interação entre polietilenoimina e glutaraldeído não foram significativos a 90% de nível de confiança ( $p < 0,10$ ).

Tabela 13: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	58,97	1,23	48,1143	0,0004
(1) Polietilenoimina (L)*	-13,09	0,75	-17,4155	0,0033
Polietilenoimina (Q)	-0,65	0,90	-0,7224	0,5451
(2) Glutaraldeído (L)*	2,85	0,75	3,7978	0,0629
Glutaraldeído (Q)*	-8,42	0,90	-9,3872	0,0112
1L x 2L	1,12	1,06	1,0537	0,4025

\*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança.

(L) parâmetro linear; (Q) parâmetro quadrático.

A partir da ANOVA foi obtido o modelo que possui um valor de  $R^2$  satisfatório, um valor significativo F, e o valor da falta de ajuste é pequeno em relação ao valor da regressão, o que caracteriza um modelo que pode ser eficientemente utilizado para prever as respostas de conversão de sacarose em isomaltulose em função das variáveis independentes polietilenoimina e glutaraldeído.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,90 indica que o modelo estatístico para prever a conversão de sacarose em isomaltulose pode explicar aproximadamente 90%

da variabilidade nas respostas e que somente 10% do total da variação não é explicada pelo modelo.

Para confirmar a validade e adequação do modelo para representar o sistema, realizou-se a análise de variância e o teste F, em que o valor de  $F_{\text{experimental}}$  obtido (20,01) foi cerca de 6,51 vezes maior do que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{0,90;3;7}=3,07$ ), sendo considerado excelente a 90% de nível de confiança, e permitem obter um modelo polinomial de segunda ordem ou quadrático codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 14: Análise de variância no estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Teste F</b>
Regressão	1.846,40	03	615,47	20,01
Resíduos	215,31	07	30,76	
Falta de Ajuste	206,30	05		
Erro Puro	9,01	02		
Total	2.061,71	10		

Coefficiente de determinação:  $R^2 = 0,90$   
 $F_{0,90;3;7} = 3,07$

Após análise da ANOVA e da validação dos parâmetros de estudo, foi obtido o modelo polinomial quadrático que representa o comportamento da conversão de sacarose em isomaltulose, por grânulos contendo células íntegras imobilizadas com aditivos polietilenoimina e glutaraldeído, e que gera a superfície de resposta e curva de contorno. A Equação 2 foi obtida segundo os parâmetros e coeficientes de regressão indicados na Tabela 13:

$$\text{Isomaltulose}(\%) = 58,97 - 13,09 \cdot \text{Polietilenoimina} - 8,49 \cdot \text{Polietilenoimina}^2 + 2,85 \cdot \text{Glutaraldeído} \quad (2)$$

O modelo foi utilizado para construir a superfície de resposta e curva de contorno. A Figura 19 mostra os efeitos dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose. Pode-se observar que, dentro da faixa estudada de concentração de aditivos, há uma tendência em se obter uma maior taxa de conversão quando se utiliza uma menor quantidade do aditivo polietilenoimina (abaixo de 0,1%), tendendo a concentração nula do mesmo.

Verifica-se na Tabela 11 que os maiores valores de conversão após 12 horas, apontam para uma menor concentração de polietilenoimina, sendo que a máxima conversão de 72,27% de conversão foi obtida no ensaio 5, que possui concentração nula de polietilenoimina e 0,06% de glutaraldeído. Com relação ao aditivo glutaraldeído, observa-se pela Figura 19, que a concentração ideal é de 0,06% (p/v), dentro da faixa estudada.

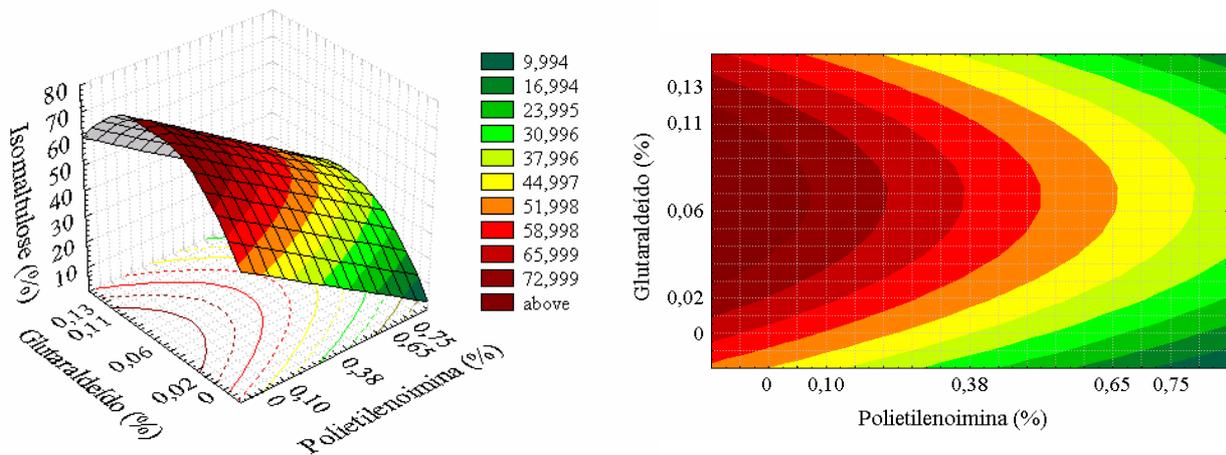


Figura 19: Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído no tratamento de células íntegras imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose em função da concentração de polietilenoimina e glutaraldeído.



### ***5.3.3. Influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 com aditivo glutaraldeído na estabilidade da produção de isomaltulose utilizando-se colunas de leito empacotado***

A influência do tratamento das células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio, com o aditivo glutaraldeído 0,06%, na estabilidade e na produção de isomaltulose foi testada em processo contínuo, em colunas de leito empacotado, como descrito no item 4.4.4.

A Figura 20 mostra os valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se grânulos de células íntegras imobilizadas tratadas e não tratadas com o aditivo glutaraldeído 0,06%. Utilizando-se grânulos de células imobilizadas sem tratamento com aditivo foi obtido uma conversão máxima de 66,08%, a partir de uma solução de sacarose 35%, após 42 horas. No entanto, a estabilidade da coluna foi baixa, sendo que a conversão declinou rapidamente ao longo do tempo, passando de 37,33% após 66 horas para 0% de conversão em 282 horas.

Na coluna contendo grânulos de células imobilizadas tratados com o aditivo glutaraldeído, a conversão inicial foi de 54,78% após 6 horas, e a produção de isomaltulose manteve-se estável entre 55-60% até 114 horas. A partir deste período houve um lento e gradual aumento da conversão de sacarose em isomaltulose, quando atingiu 71,42%, após 256 horas equivalente ao décimo primeiro dia de conversão. Após este período a conversão diminuiu para 53,61% de isomaltulose.

Foi verificado que o tratamento dos grânulos das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio, com concentração otimizada de glutaraldeído, aumentou a estabilidade e a conversão de sacarose em isomaltulose, em comparação com os grânulos sem tratamento com aditivo.



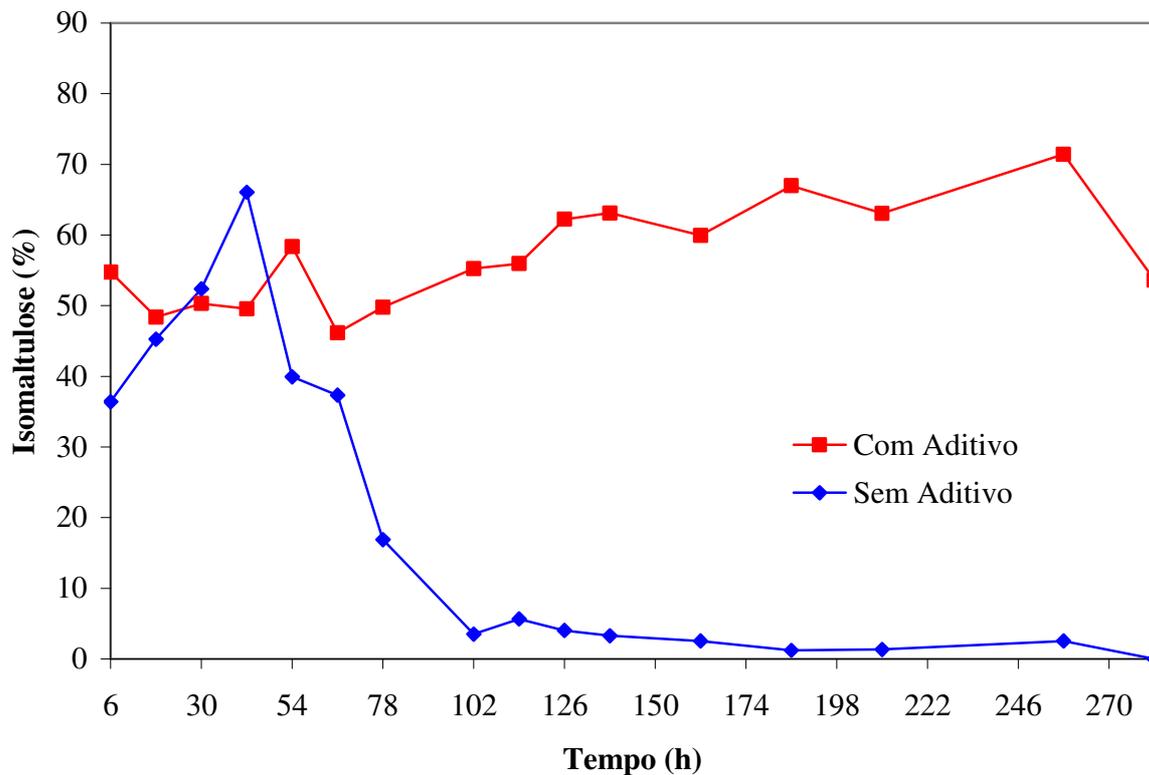


Figura 20: Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos contendo células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12, em alginato de cálcio, com e sem tratamento do aditivo 0,06% de glutaraldeído, em colunas de leito empacotado.

#### ***5.3.4. Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 cultivadas em diferentes meios, imobilizadas em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado***

A influência do fluxo de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12, cultivadas em diferentes meios de cultivo, imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas ou não com glutaraldeído foi testada como descrito no item 4.4.5.



Foram realizados seis ensaios, como pode ser visualizado na Figura 21, em que o tratamento dos grânulos de células íntegras imobilizadas com alginato de cálcio, com o aditivo glutaraldeído (CIPG-0,33; CIPG-0,56; CIMG-0,56 e CIMG-0,69) aumentou a estabilidade, mantendo a conversão de sacarose em isomaltulose por um período maior quando comparada àquelas colunas contendo grânulos sem tratamento com aditivo (CIP-0,33 e CIP-0,56).

Foi verificado que as colunas CIPG-0,33, CIPG-0,56 e CIMG-0,56, contendo grânulos de células imobilizadas tratados com aditivo, mostraram um perfil de conversão e estabilidade semelhantes. A taxa de conversão em isomaltulose manteve-se em torno de 50-60% por dezesseis dias. Utilizando-se fluxo de 0,69 mL/min na coluna CIMG-0,69 pode-se observar que a conversão foi mantida semelhante as colunas CIPG-0,33, CIPG-0,56 e CIMG-0,56; no entanto a partir do décimo primeiro dia em que foi obtido 52% de isomaltulose, a conversão de sacarose em isomaltulose começou a declinar gradualmente, atingindo cerca de 36% de isomaltulose no décimo sexto dia, ocorrendo uma diminuição da conversão num curto período de tempo em relação aos fluxos menores.

Os experimentos realizados indicaram que não houve diferença no perfil de conversão de sacarose em isomaltulose quando se utilizaram diferentes meios para a obtenção de células de *Erwinia* sp. D12, sendo vantajosa a utilização do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho por ser de menor custo. Foi verificado também que o fluxo mais apropriado foi o de 0,56 mL/min, pois apesar de fluxos menores (0,33 mL/min) apresentarem perfis semelhantes, a produtividade é maior num fluxo maior (0,56 mL/min).



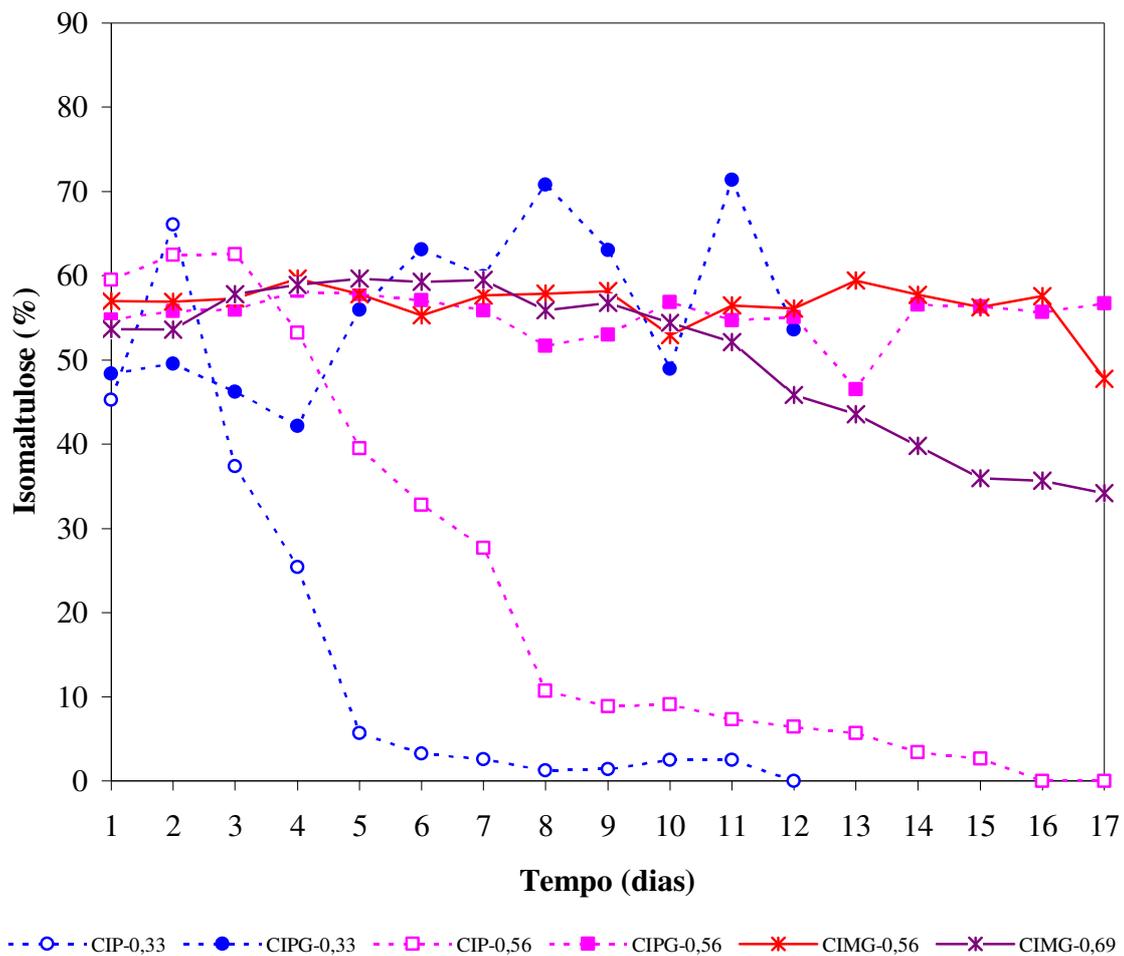


Figura 21: Influência do fluxo de substrato na produção de isomaltulose utilizando-se células íntegras de *Erwinia* sp imobilizadas em alginato de cálcio tratadas ou não com 0,06% de glutaraldeído, em colunas de leito empacotado.

- CIP-0,33: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo peptona, imobilizadas em alginato de cálcio sem tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,33 mL/min.
- CIPG-0,33: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo peptona, imobilizadas em alginato de cálcio com tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,33 mL/min.
- CIP-0,56: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo peptona, imobilizadas em alginato de cálcio sem tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,56 mL/min.
- CIPG-0,56: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo peptona, imobilizadas em alginato de cálcio com tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,56 mL/min.
- \* CIMG-0,56: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, imobilizadas em alginato de cálcio com tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,56 mL/min.
- \* CIMG-0,69: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, imobilizadas em alginato de cálcio com tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,69 mL/min.



**5.3.5. Estudo do tempo de vida útil das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 immobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com aditivo glutaraldeído utilizando-se colunas de leito empacotado**

**5.3.5.1. Comparação da vida útil das células íntegras immobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com glutaraldeído**

O estudo da vida útil das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 immobilizadas em alginato de cálcio, tratadas e não tratadas com glutaraldeído, em colunas de leito empacotado foi testado como descrito no item 4.4.6.1.

A Figura 22 ilustra a produção de isomaltulose e a quantidade de células viáveis de *Erwinia* sp D12 nas soluções de açúcares eluídas das colunas de células íntegras immobilizadas em alginato de cálcio, tratadas e não tratadas com 0,06% de glutaraldeído. Foi verificado que na coluna contendo grânulos sem tratamento com o aditivo glutaraldeído a conversão máxima de 60,81% foi obtida no segundo dia de conversão contínua. Após esse período houve uma queda contínua e acentuada da conversão de sacarose em isomaltulose sendo praticamente nula após o décimo sétimo dia.

Foi observado ainda que a quantidade de células viáveis obtidas a partir do produto formado aumentou gradualmente atingindo contagem máxima de  $20 \times 10^4$  UFC/mL no sétimo dia. Posteriormente a quantidade de células viáveis encontrada diminuiu gradualmente atingindo  $4,6 \times 10^4$  UFC/mL no décimo nono dia.



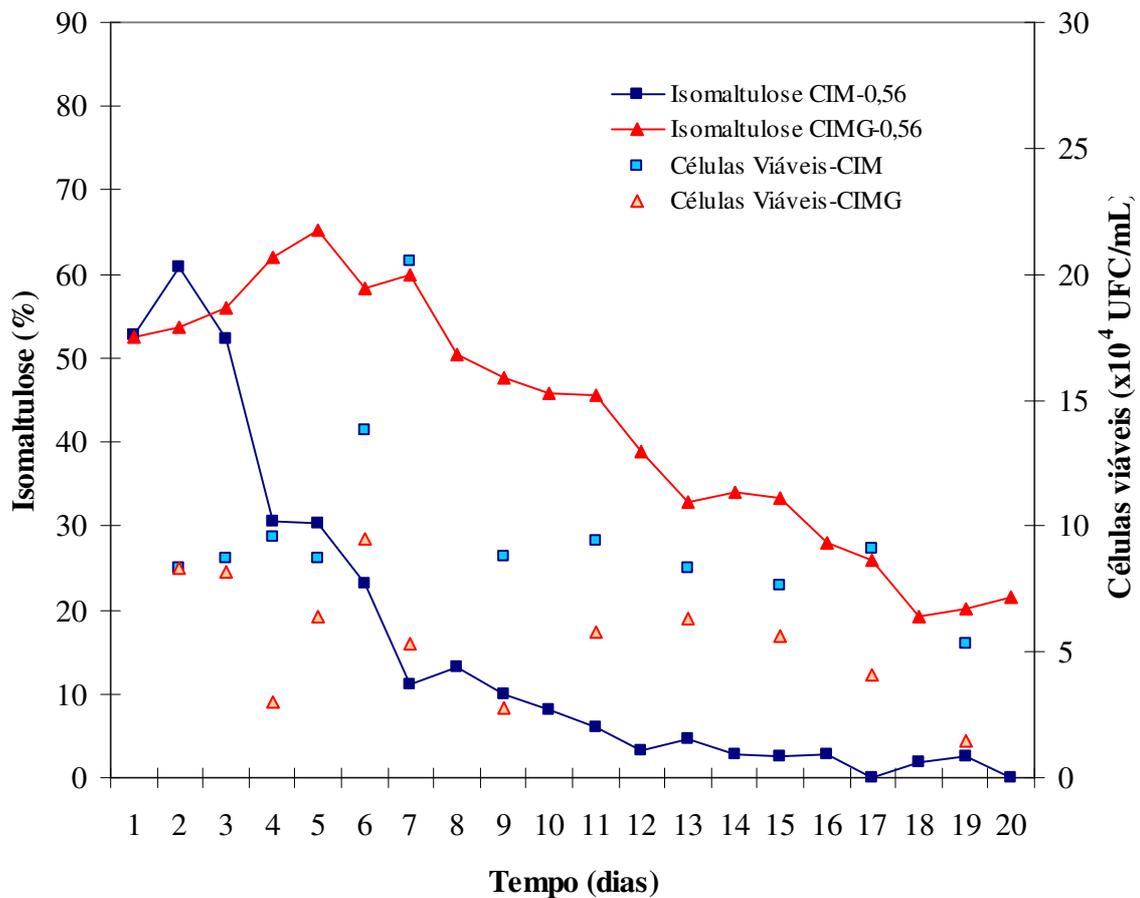


Figura 22: Comparação da produção de isomaltulose por células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com 0,06% de glutaraldeído em colunas de leito empacotado utilizando-se células provenientes da fermentação em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho.

- Isomaltulose CIM-0,56: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, imobilizadas em alginato de cálcio sem tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,56 mL/min.
- ▲ Isomaltulose CIMG-0,56: células obtidas do meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho, imobilizadas em alginato de cálcio com tratamento com 0,06% de glutaraldeído, com fluxo de 0,56 mL/min.
- Células viáveis- CIM: células viáveis na solução de açúcar eluída da coluna de grânulos contendo células íntegras imobilizadas sem tratamento com 0,06% de glutaraldeído.
- ▲ Células viáveis- CIMG: células viáveis na solução de açúcar eluída da coluna de grânulos contendo células íntegras imobilizadas com tratamento com 0,06% de glutaraldeído.



Na coluna contendo grânulos de células íntegras imobilizadas tratados com aditivo glutaraldeído, a maior conversão de sacarose em isomaltulose de 65,34% foi obtida no quinto dia após conversão contínua. A queda na conversão foi gradual e menos acentuada do que em relação aos grânulos sem aditivo. A contagem de células viáveis foi menor em relação à coluna contendo grânulos sem tratamento com aditivo, sendo um indicativo de que o aditivo glutaraldeído contribuiu na retenção das células no gel.

#### 5.3.5.2. *Vida útil das células íntegras imobilizadas em alginato de cálcio tratadas com glutaraldeído*

A vida útil das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio e tratadas com 0,06% de glutaraldeído, em coluna de leite empacotado, foi testada como descrito no item 4.4.6.2.

A produção de isomaltulose foi acompanhada por quatro semanas para se verificar a vida útil e estabilidade da coluna. A Figura 23 apresenta os valores de conversão de sacarose em isomaltulose e em outros açúcares. No primeiro dia foi obtido 53,61% de conversão de sacarose em isomaltulose, sendo que houve um aumento gradual da conversão atingindo-se um máximo de 59,66% de isomaltulose no quarto dia.

A coluna manteve-se estável, com valores de conversão entre 52-60% em isomaltulose até o décimo dia, em que se obteve 52,11% de isomaltulose. A partir deste período houve uma queda gradual na conversão sendo que foi obtido no vigésimo oitavo dia cerca de 8,88% de isomaltulose. Pode-se observar também que, a quantidade de sacarose não convertida nos quatro primeiros dias foi baixa, entre 7-9%. No entanto, após este período, houve aumento gradual da quantidade de sacarose não convertida apresentando cerca de 84,24% do total no vigésimo oitavo dia. Foi verificado ainda que, a quantidade de glicose e frutose produzidas durante o processo foi baixa, entre 2-4% de glicose e 1-3% de frutose, sendo que após dezessete dias de conversão já não havia mais a presença destes dois açúcares.



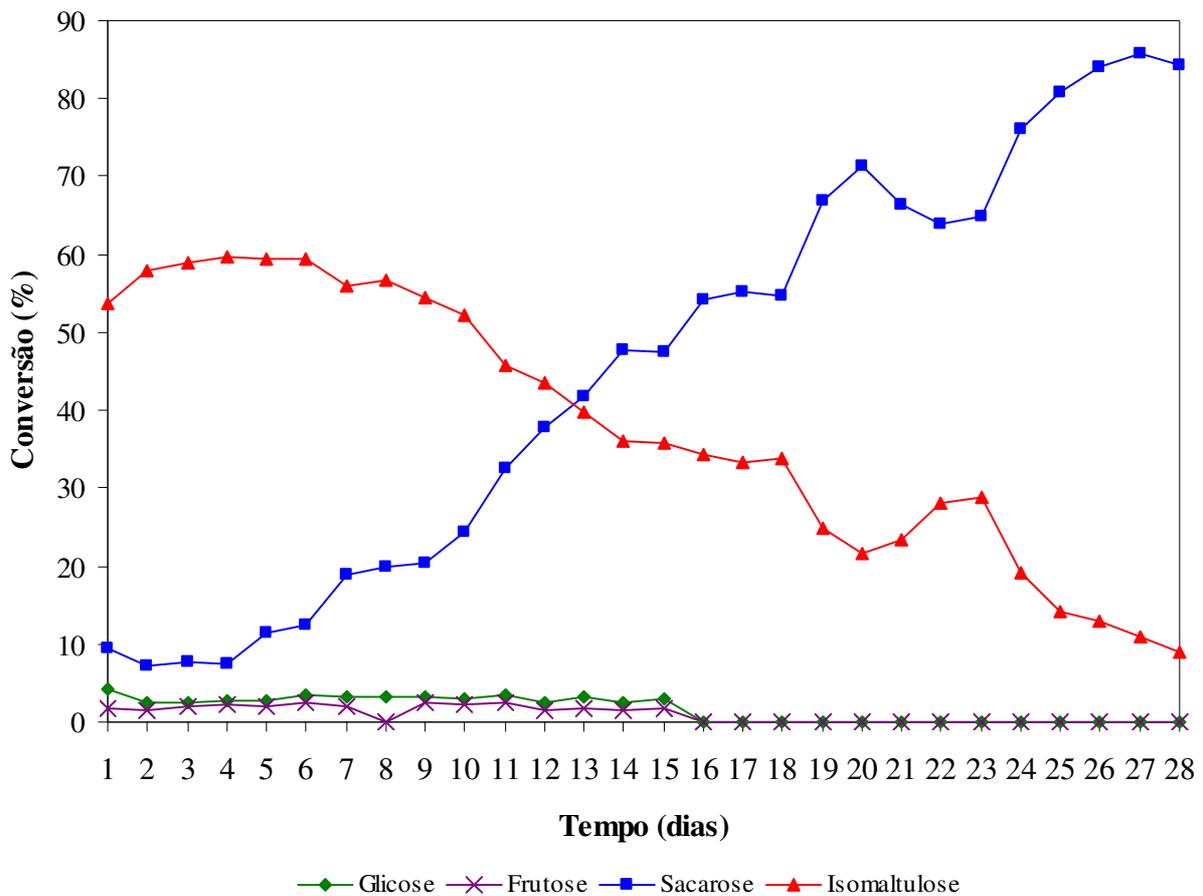


Figura 23: Tempo de vida útil das células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio tratadas com 0,06% de glutaraldeído em colunas de leito empacotado utilizando-se células cultivadas em meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho.

O efeito do uso de polietilenoimina e glutaraldeído na imobilização de células de *Serratia plymuthica* NCIB- 8285 foi estudado por Shimizu et al. (1982), em processo em batelada, na conversão de sacarose em isomaltulose. Os autores citaram a polietilenoimina como um agente responsável pela formação de ligações cruzadas nas células imobilizadas em alginato de cálcio e que, o glutaraldeído conferiria maior resistência e força física aos grânulos de alginato. Utilizando-se células imobilizadas não tratadas com aditivos, na primeira batelada, foi obtido 62,9% de isomaltulose a partir de solução de sacarose 30%. Após a segunda batelada a conversão decresceu para 8,4% e após a terceira batelada não houve mais transformação da sacarose em isomaltulose.



Os autores ainda verificaram que, ao se utilizar células imobilizadas tratadas com 0,1% de glutaraldeído, foi obtido após a primeira batelada 31% de isomaltulose; no entanto, foi conferida às células maior estabilidade da conversão, sendo obtidas conversões próximas de 20% por mais oito bateladas. Observaram também que, ao se utilizar 1,5% de polietilenoimina uma grande quantidade de glutaraldeído, cerca de 1%, foi requerida. Foram realizadas trinta e seis bateladas com taxas de conversão de 50% em isomaltulose e outras setenta bateladas com conversões de 25%, aproximadamente.

Tsuyuki et al. (1992) utilizaram uma suspensão de 40% de células de *Klebsiella planticola* MX 10 imobilizada em solução 5% de alginato para converter sacarose em isomaltulose. Os grânulos foram tratados com solução de polietilenoimina 2% por 5 minutos; e posteriormente, com solução de glutaraldeído 0,5 % por 20 minutos. As células imobilizadas, dispostas em colunas (50 x 180 mm), converteram totalmente a solução 25% de sacarose sendo obtido 65,4% de isomaltulose e 29,7% de trealulose.

Ahn et al. (2003) utilizaram células imobilizadas da linhagem *Erwinia rhapontici* ATCC 29283 para converter sacarose em isomaltulose. A suspensão celular 40% foi misturada com igual volume de solução de alginato de sódio 5% e gotejadas em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,15 M para formar os grânulos contendo células imobilizadas; e posteriormente foram dispostas em colunas encamisadas (50 x 180 mm) a 30°C, com circulação de solução de sacarose 55%. Foram testadas temperaturas à 27°C, 30°C e 33°C e os rendimentos iniciais de isomaltulose foram respectivamente, 79%, 89% e 85% e diminuíram para 67%, 79% e 57% após 60 dias, respectivamente.

Moraes et al. (2005) obtiveram máxima conversão de sacarose em isomaltulose de 56,4% quando uma solução 19,4% de sacarose foi circulada através de colunas encamisadas (25 x 200 mm) contendo células imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 (suspensão celular 20% em solução de alginato 1%) a um fluxo de substrato de 21,88 mL/h e temperatura de 35°C.

Os resultados obtidos no estudo do tratamento das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio, com aditivos, teve como consequência o incremento da conversão de sacarose em isomaltulose e um aumento na estabilidade da coluna contendo os grânulos de células imobilizadas. A redução acentuada da conversão de sacarose em isomaltulose pelas colunas contendo grânulos não tratados com aditivo glutaraldeído poderia ser devido a não retenção das células pelo suporte. Os grânulos tratados com glutaraldeído mantiveram a estabilidade da conversão por um período maior, devido provavelmente a maior retenção de células no interior e na superfície dos grânulos de alginato.

***5.3.6. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto de Erwinia sp. D12 imobilizados em alginato de cálcio, submetidos a diferentes tratamentos, em processo em batelada***

O estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células íntegras, células lisadas e extrato enzimático bruto de *Erwinia* sp. D12 imobilizados em alginato de cálcio, submetidos a diferentes tratamentos, em processo em batelada, foi realizado de acordo com o item 4.4.7.

A Figura 24 mostra os grânulos úmidos e secos de células e de extrato bruto de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 imobilizados em alginato de cálcio, que foram testados para a conversão de sacarose em isomaltulose.



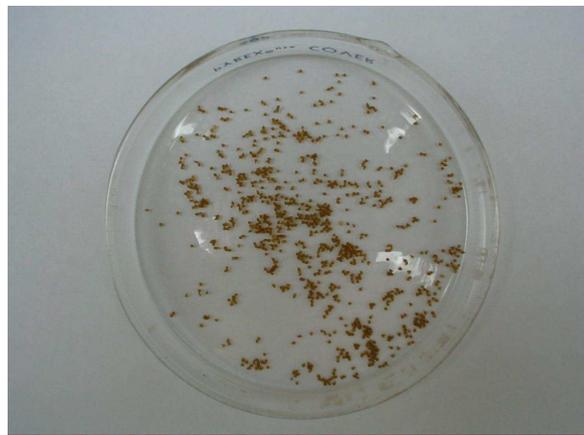
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 24: Grânulos contendo células imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio.

- (a) Grânulos úmidos de Células Íntegras Imobilizadas (CII).
- (b) Extrato Enzimático Bruto Imobilizado (EI).
- (c) Células Íntegras Imobilizadas e Secas (CIIS).
- (d) Extrato Enzimático Bruto Imobilizado e Seco (EEIS).



A Figura 25 mostra a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se grânulos úmidos ou secos de células íntegras, extrato de células sonicadas e extrato bruto de glicosiltransferase, imobilizados em alginato de cálcio com tratamento de glutaraldeído, em processo em batelada.

As amostras que se mostraram mais eficientes tanto em relação ao rendimento em isomaltulose como na estabilidade da conversão foram os grânulos contendo extrato enzimático bruto imobilizado em alginato de cálcio (EEI), que apresentaram estabilidade durante cinco bateladas, nas quais foram obtidas taxas de conversão entre 59,7%-63,7%; os grânulos de células sonicadas e imobilizadas em alginato de cálcio (CSI) que apresentaram taxa de conversão entre 47,6%-62,6%.

Os grânulos de extrato enzimático tratado com glutaraldeído e imobilizado em alginato de cálcio (EEGI) apresentaram alta taxa de conversão nas duas primeiras bateladas, nas quais foram obtidas 63,3% e 64,3% de isomaltulose, no entanto houve uma queda na conversão e na quinta batelada foi obtido 40,7% de isomaltulose.

Os grânulos secos de células íntegras imobilizadas (CIIS) e de células sonicadas imobilizadas (CSIS) que apresentaram conversão na faixa de 49,3-57,2% e 40,3-58,0% respectivamente, também mostraram boa estabilidade.

Os grânulos úmidos de extrato enzimático bruto (EEI) e de células sonicadas (CSI), imobilizadas em alginato de cálcio, que apresentaram maior conversão de sacarose em isomaltulose foram testados, em seguida, em colunas em leito empacotado.



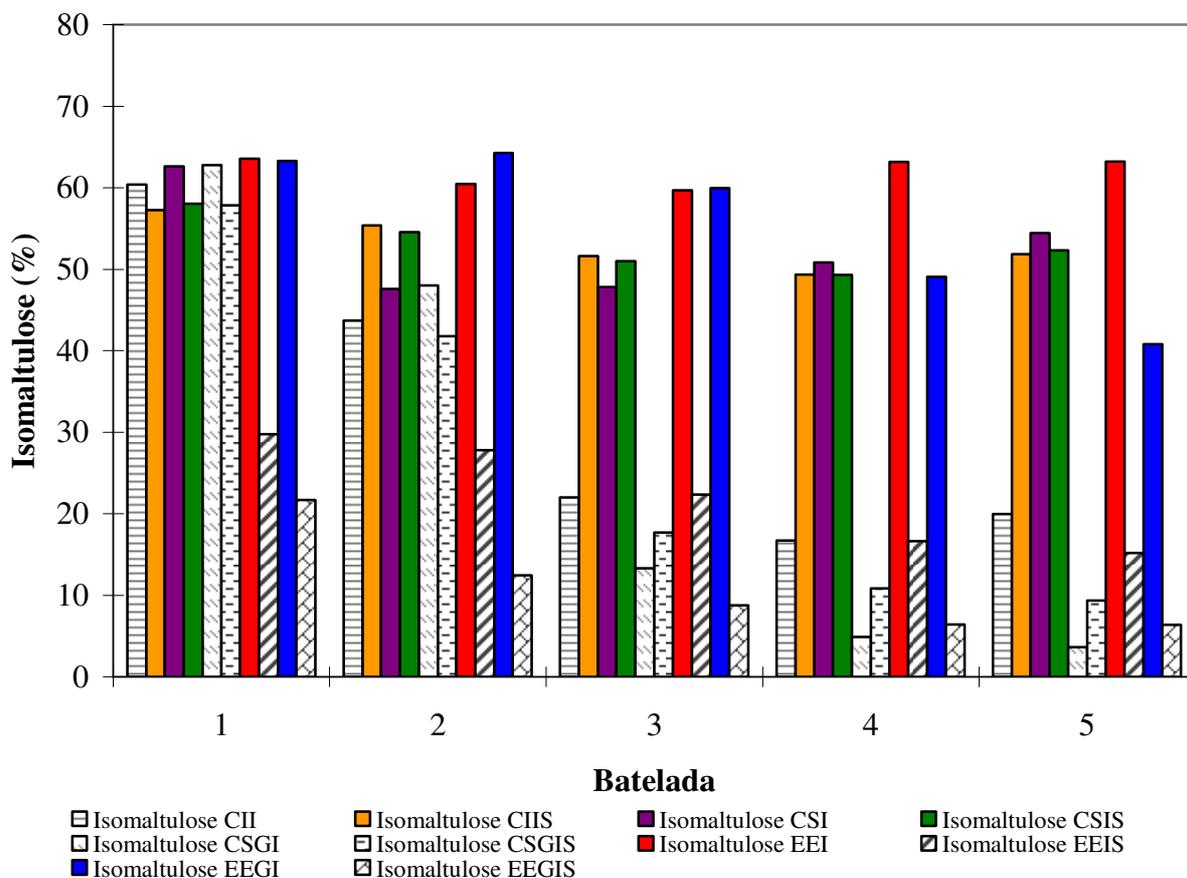


Figura 25: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando grânulos úmidos ou secos de células íntegras, extrato de células sonicadas e extrato bruto de glicosiltransferase, imobilizados em alginato de cálcio com tratamento de glutaraldeído, em processo em batelada.

- ▤ Isomaltulose-CII: % de isomaltulose obtida a partir de Células Íntegras Imobilizadas.
- ▣ Isomaltulose-CIIS: % de isomaltulose obtida a partir de Células Íntegras Imobilizadas e Secas.
- ▥ Isomaltulose-CSI: % de isomaltulose obtida a partir de Células Sonicadas Imobilizadas.
- ▦ Isomaltulose-CSIS: % de isomaltulose obtida a partir de Células Sonicadas Imobilizadas e Secas.
- ▧ Isomaltulose-CSGI: % de isomaltulose obtida a partir de Células Sonicadas tratadas com Glutaraldeído e Imobilizadas.
- ▨ Isomaltulose-CSGIS: % de isomaltulose obtida a partir de Células Sonicadas tratadas com Glutaraldeído, Imobilizadas e Secas.
- ▩ Isomaltulose-EEI: % de isomaltulose obtida a partir de Extrato Enzimático Bruto Imobilizado.
- Isomaltulose-EEIS: % de isomaltulose obtida a partir de Extrato Enzimático Bruto Imobilizado e Seco.
- ▬ Isomaltulose-EEGI: % de isomaltulose obtida a partir de Extrato Enzimático Bruto tratado com Glutaraldeído e Imobilizado.
- ▮ Isomaltulose-EEGIS: % de isomaltulose obtida a partir de Extrato Enzimático Bruto tratado com Glutaraldeído, Imobilizado e Seco.



### **5.3.7. Produção de isomaltulose utilizando-se grânulos de extrato enzimático bruto e de células sonicadas de *Erwinia* sp. D12, imobilizados em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado**

A Figura 26 mostra que nos três primeiros dias houve maior conversão utilizando-se EEI, nos quais foram obtidos 59,6%, 62,9% e 62,1% de isomaltulose. No entanto após o terceiro dia ocorreu queda gradual da conversão de sacarose em isomaltulose, sendo que após dezenove dias de uso contínuo, os grânulos de extrato enzimático bruto imobilizado (EEI) não apresentaram mais atividade.

Nos três primeiros dias a coluna de CSI apresentou conversão de 58,4%, 57,8% e 56,9% de sacarose em isomaltulose. Foi observado que a coluna de CSI apresentou estabilidade um pouco superior em relação à EEI, mas a queda na conversão iniciou-se a partir do nono dia e foi obtido um perfil de queda na conversão de sacarose em isomaltulose semelhante a coluna de EEI, e após vinte e um dias de uso contínuo, os grânulos de células sonicadas imobilizadas não apresentaram atividade de glicosiltransferase.

A estabilidade operacional do extrato enzimático bruto e das células sonicadas, imobilizadas em alginato de cálcio em coluna leito empacotado, na conversão de sacarose em isomaltulose, não foi satisfatória, pois a conversão manteve-se estável em torno de 50-60% por apenas nove dias. Outros trabalhos também relataram a conversão de sacarose em isomaltulose, em processo contínuo, utilizando-se células microbianas imobilizadas em alginato de cálcio como, por exemplo, células de *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al., 1985) e de *Erwinia rhapontici* BN68689 (Ahn et al., 2003). No entanto, uma comparação direta poderia não ser o mais apropriado, devido às diferenças entre as condições operacionais e de imobilização.



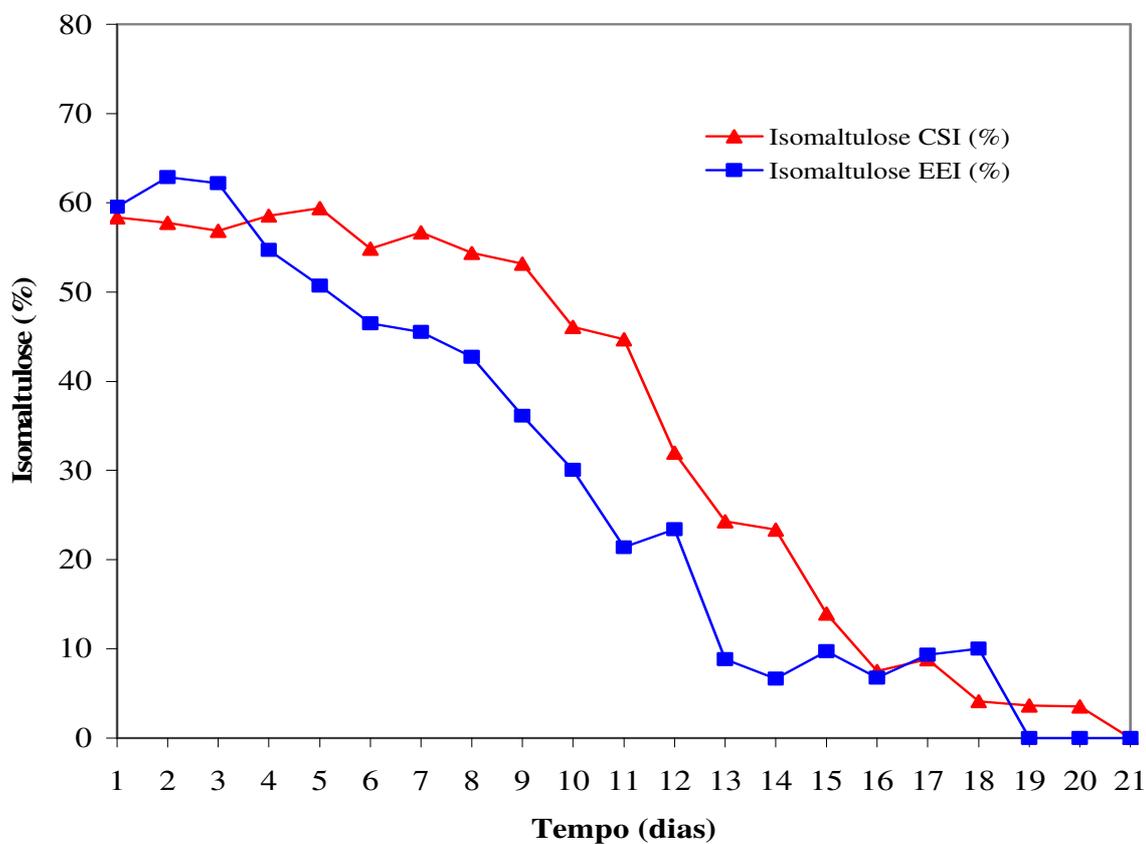


Figura 26: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se grânulos de extrato enzimático bruto (EEI) e de células sonicadas (CSI) de *Erwinia* sp. D12, imobilizadas em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado.

- ▲ Isomaltulose-CSI: % de isomaltulose obtida a partir de Células Sonicadas Imobilizadas em alginato de cálcio.
- Isomaltulose-EEI: % de isomaltulose obtida a partir de Extrato Enzimático Bruto Imobilizado em alginato de cálcio.



Cheetham et al. (1985) descreveram que as células de *Erwinia rhapontici* NC PPB 1578, imobilizadas em grânulos de alginato de cálcio, apresentaram conversão de sacarose em isomaltulose de aproximadamente 90%. Os carboidratos foram analisados em cromatógrafo líquido Waters Prep LC/system 500A com detector por índice de refração e coluna PrepPak 500/C18. O alto rendimento em isomaltulose poderia ser devido a não separação cromatográfica da isomaltulose e do isômero trealulose, pois equipamentos antigos não tinham capacidade de separação como os novos cromatógrafos líquidos de troca iônica, mais modernos. Nesse caso os dois isômeros podem ter sido considerados como isomaltulose. Nesse estudo a imobilização celular foi realizada misturando-se suspensão celular 20% e solução de alginato de sódio 5%. A meia vida das células imobilizadas em coluna de 200x15 cm foi de aproximadamente 8.600 horas em processo contínuo a 30°C, utilizando-se solução de sacarose 1,6M ajustada a pH 7,0.

Ahn et al. (2003) utilizaram a linhagem *Erwinia rhapontici* BN68689 para converter sacarose em isomaltulose. A imobilização foi realizada a partir de suspensão celular 40% (p/v), misturada com igual volume de solução de alginato de sódio 5%. Os grânulos foram empacotados em colunas (180 x 50 cm e capacidade de 300 mL) a 30 °C e alimentados com solução de sacarose 55% (p/v) pH 7,0. Foram testadas temperaturas à 27°C, 30°C e 33°C e os rendimentos iniciais de isomaltulose foram respectivamente, 79%, 89% e 85% e diminuíram para 67%, 79% e 57% após 60 dias, respectivamente. Para análise dos açúcares foi utilizado cromatógrafo líquido Waters 410, com detector por índice de refração.

### ***5.3.8. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras de Erwinia sp. D12 imobilizadas com acetato de quitosana utilizando-se frascos sob agitação e metodologia de superfície de resposta***

Com o intuito de verificar um suporte alternativo foi testada a imobilização de células de *Erwinia* sp D12 em acetato de quitosana, como descrito no item 4.4.9.

Os maiores valores de produção de isomaltulose foram obtidos após 24 h de conversão (Tabela 15). A máxima conversão de sacarose em isomaltulose de 65,70% foi observada no ensaio 2 em que as condições de conversão foram temperatura de 35°C, pH 5,5 e solução de sacarose 35%. A média obtida pelos quatro ensaios, correspondentes ao ponto central, foi de 60,02% de isomaltulose em que a temperatura foi mantida a 30°C, pH 6,0 e solução de sacarose 40%.

As respostas obtidas, referentes à conversão de sacarose em isomaltulose foram avaliadas estatisticamente a um nível de 95% de confiança e tiveram efeitos significativos na produção de isomaltulose. Os efeitos principais e interações das variáveis estudadas encontram-se na Tabela 17. Foi verificado que as variáveis temperatura, pH e solução de sacarose afetaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de isomaltulose; sendo que, o efeito principal da temperatura foi positivo, sugerindo que o aumento da temperatura, dentro da faixa estudada, resultaria em um incremento na produção de isomaltulose. O efeito do pH foi negativo, sugerindo que o aumento do seu valor, poderia diminuir a produção de isomaltulose. A variável solução de sacarose não apresentou efeito principal significativo ( $p$  foi maior do que 0,05), no entanto apresentou efeitos significativos quando houve sua interação com pH e temperatura.

Tabela 15: Planejamento fatorial composto central-2<sup>3</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana

Ensaio	Variável			Isomaltulose (%)		
	T <sup>a</sup> (°C)	pH	CS <sup>b</sup> (%)	12 horas	24 horas	36 horas
1	-1	-1	-1	51,91	55,20	53,96
2	+1	-1	-1	57,17	65,70	56,45
3	-1	+1	-1	52,06	39,63	54,04
4	+1	+1	-1	56,38	64,46	52,04
5	-1	-1	+1	52,29	51,53	47,31
6	+1	-1	+1	46,05	62,03	48,68
7	-1	+1	+1	52,02	50,99	45,09
8	+1	+1	+1	58,09	58,70	46,64
9	0	0	0	56,93	61,09	58,41
10	0	0	0	58,29	59,92	56,49
11	0	0	0	58,41	60,75	55,67
12	0	0	0	58,48	58,31	56,48

<sup>a</sup>Temperatura; <sup>b</sup>Concentração de sacarose.

Tabela 16: Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial composto central-2<sup>3</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana

Variável	Nível		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	25	30	35
pH	5.5	6.0	6.5
Concentração de Sacarose (%)	35	40	45

Tabela 17: Análise dos efeitos principais e interações das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana

Variável	Efeito	Desvio Padrão	t (3)	p
(1) Temperatura (L) *	13,3850	0,8767	15,2671	0,0006
(2) pH (L)*	-5,1700	0,8767	-5,8969	0,0097
(3) Concentração de Sacarose	-0,4350	0,8767	-0,4962	0,6539
1 x 2*	2,8850	0,8767	3,2907	0,0461
1 x 3*	-4,2800	0,8767	-4,8818	0,0164
2 x 3*	3,2350	0,8767	3,6899	0,0345

\*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança ( $p < 0.05$ ).

Tabela 18: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH e concentração da solução de sacarose na conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F <sup>a</sup>
Regressão	485,99	5	97,20	6,94
Resíduo	84,03	6	14,01	
Falta de Ajuste	79,42	3		
Erro Puro	4,61	3		
Total	570,02	11		

Coefficiente de determinação:  $R^2 = 0.85$ ; <sup>a</sup> $F_{\text{modelo}}$  (regressão/resíduo);  $F_{0,95;5;6} = 4.39$  (tabelado).

A Tabela 18 mostra a análise de variância (ANOVA) para a produção de isomaltulose. O modelo obtido pode ser considerado preditivo e significativo a um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste F, em que o  $F_{\text{experimental}}$  ( $F_{\text{modelo}}=6,94$ ) foi maior do que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com valor correspondente de 4,39. A adequação do modelo foi verificada pelo coeficiente de determinação ( $R^2=0,85$ ). O erro puro apresentou um baixo valor de 4,62, indicando boa reprodutibilidade dos valores obtidos. Estes resultados foram

suficientes e satisfatórios para a obtenção de um modelo que representa a relação real entre as variáveis independentes e a produção de isomaltulose.

Após a ANOVA e validação das variáveis estudadas, o modelo de primeira ordem que representa a produção de isomaltulose a partir de células imobilizadas em quitosana foi utilizado para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno. A equação 3 prediz a produção de isomaltulose dentro da faixa estudada das variáveis temperatura, pH e concentração de sacarose:

$$\text{Isomaltulose}(\%) = 57,36 + 6,69.Temperatura - 2,59.pH + 1,44.Temperatura.pH - 2,14.Temperatura.Sacarose + 1,62.pH.Sacarose \quad (3)$$

As superfícies de resposta e curvas de contorno estão representadas nas Figuras 27a e 27b. Pode-se observar que haveria um incremento da produção de isomaltulose em temperaturas mais altas, sendo a temperatura ótima de 35°C. Também se pode verificar que haveria um aumento na conversão de sacarose em isomaltulose em valores de pH mais baixos, ao redor de 6,0 e em concentrações de sacarose próxima de 35%.

Estes resultados foram similares aos obtidos por Krastanov e Yoshida (2003), que utilizaram células imobilizadas de *Serratia plymuthica* ATCC15928, imobilizadas com quitosana, e secas a temperatura ambiente por 24 h. As células imobilizadas apresentaram pH ótimo de 6,2-6,3 na conversão de sacarose em isomaltulose e temperatura ótima de 44-45°C a partir de uma solução de sacarose 40%. Utilizando-se as células imobilizadas em reator tipo batelada e 200mL de solução de sacarose 40% foram obtidos 79,84% de isomaltulose, 2,89% de glicose, 5,67% de frutose, 6,95% de trealulose, 1,2% de isomaltose, 2,57% de outros açúcares e 0,88% de sacarose não convertida, após 4 horas de reação.



No presente estudo de conversão de sacarose utilizando células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em quitosana em frascos agitados em processo de batelada, foi obtido cerca de 64,5 % de isomaltulose, no entanto não foi possível realizar os estudos em coluna de leito empacotado devido à baixa resistência física dos grânulos de quitosana, que se rompiam na coluna.

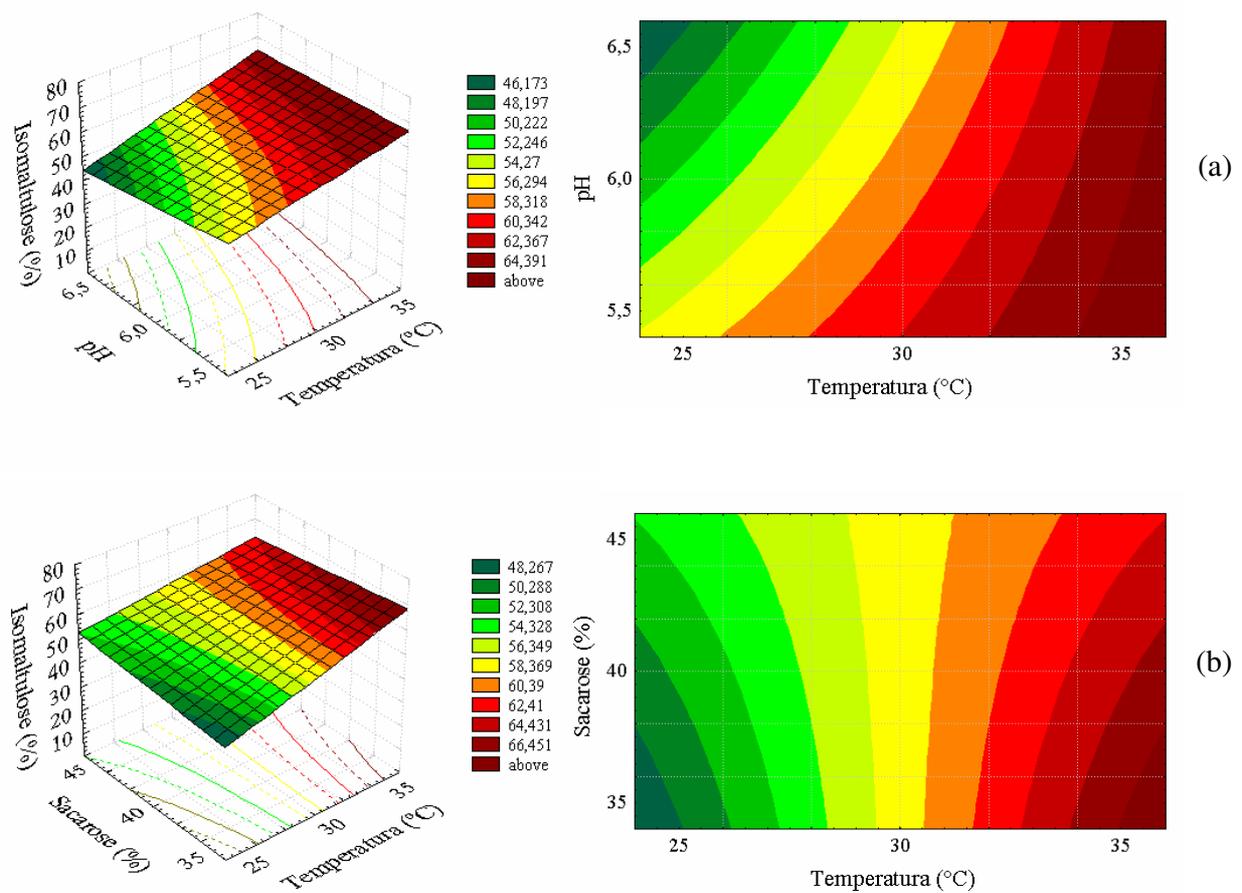


Figura 27: Superfície de resposta e curva de contorno para a conversão de sacarose em isomaltulose a partir de células íntegras imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 em acetato de quitosana.

(a) como função da temperatura e pH.

(b) como função da temperatura e concentração da solução de sacarose.



## **5.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres**

### ***5.4.1. Influência da variação do pH, da temperatura, da concentração de solução de sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de Erwinia sp. D12***

A influência do pH, da temperatura, da concentração de solução de sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose foi avaliada utilizando-se processo em batelada como descrito no item 4.5.2. As cinéticas de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres estão apresentadas nas Figuras 28a-f. As Figuras 28a, 28b e 28c mostram a conversão de sacarose em isomaltulose a 30°C, 35°C e 38°C, respectivamente, em diferentes valores de pH do meio de reação. A conversão máxima de 63,33% de isomaltulose a 38°C foi obtido em pH 5,0, após 35 min de reação. Na temperatura de 30°C, a maior conversão de 63,83% foi obtida em pH 6,5 após 60 min de reação. No entanto, o maior rendimento de isomaltulose foi obtido a 35°C, quando foram obtidos 64,16% e 64,94% após 35 min e 45 min, respectivamente, em pH 6,5.

As Figuras 28d, 28e e 28f mostram o efeito da concentração de massa celular e concentração do substrato na conversão de sacarose em isomaltulose. O maior rendimento foi verificado quando se utilizou massa celular 10% e solução de sacarose 35% (Figura 28d) e massa celular 15% e solução de sacarose 37% (Figura 28e), quando foram obtidos respectivamente, 69,45% de isomaltulose após 15 min, e 69,53% após 25 min. A produtividade utilizando-se massa celular 10% e solução de sacarose 35% (0,0463 g isomaltulose/g sacarose/min) foi maior do que quando se utilizou massa celular 15% e solução de sacarose 37% (0,0278 g isomaltulose/g sacarose/min). Posteriormente, realizou-se ensaio utilizando-se a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para confirmação dos resultados obtidos.



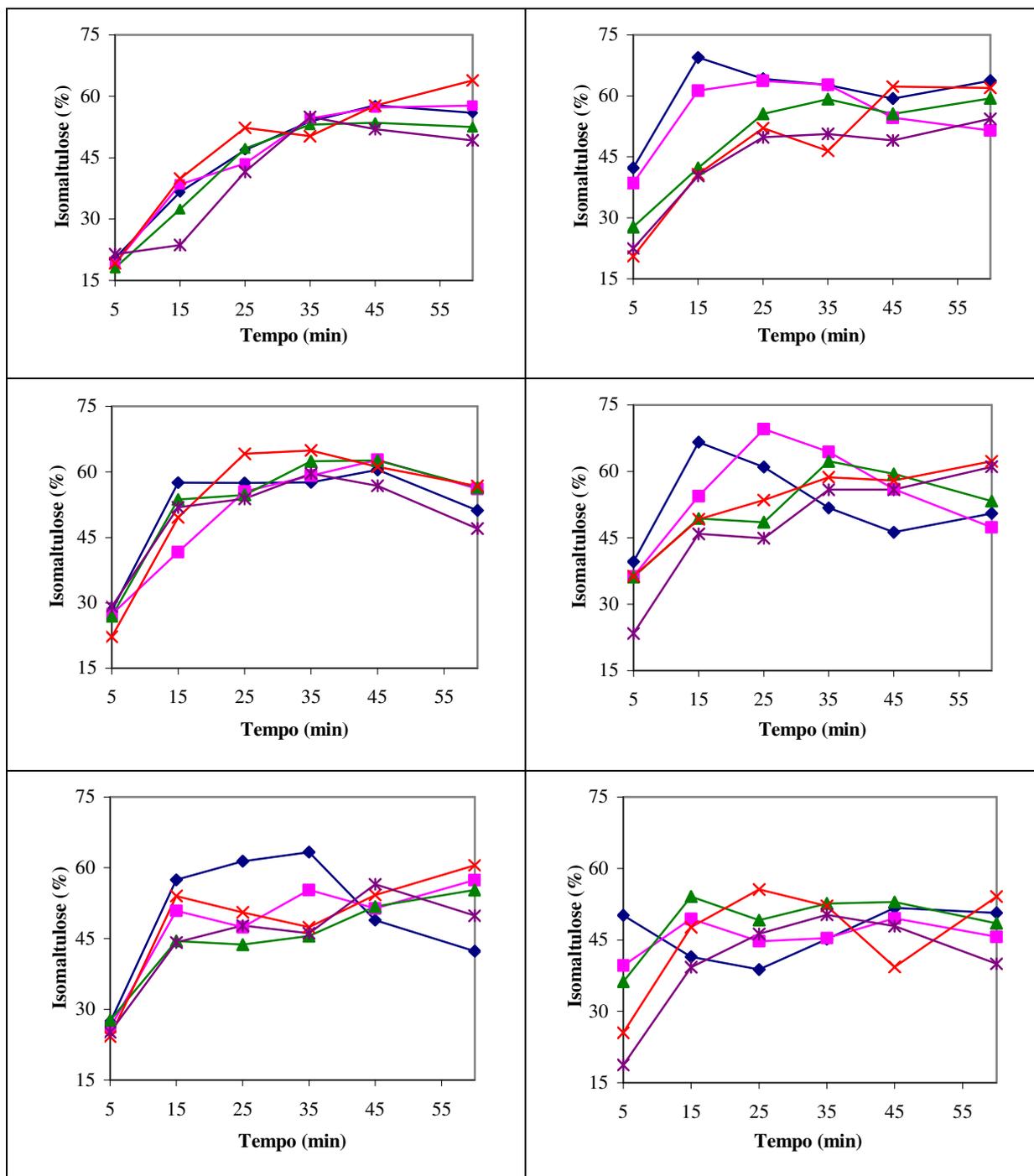


Figura 28: Cinéticas de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12 variando-se o pH e a temperatura (a, b, c), e a concentração de massa celular e concentração de sacarose (d, e, f).

(a) 30°C x pH; (b) 35°C x pH; (c) 38°C x pH; onde (◆)pH 5,0; (■)pH 5,5; (\* )pH 6,0; (×)pH 6,5; (▲)pH 7,0.  
 (d) massa celular 10% x sacarose; (e) massa celular 15% x sacarose; (f) massa celular 20% x sacarose; onde (◆)sacarose 35%; (■)sacarose 37%; (\* )sacarose 40%; (×)sacarose 42%; (▲)sacarose 45%.



O planejamento composto central rotacional  $2^4$  (PCCR- $2^4$ ) foi utilizado para avaliar o efeito das variáveis temperatura, pH, concentração do substrato sacarose e concentração de massa celular úmida na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12 no processo em batelada.

O planejamento apresenta-se na Tabela 19, e os níveis estudados, com os valores decodificados das variáveis, encontram-se na Tabela 20. As análises estatísticas foram realizadas através dos resultados dos testes de conversão de sacarose em isomaltulose usando-se células livres de *Erwinia* sp. D12 nos tempos de 15, 25 e 35 minutos de reação. Os resultados referentes a 35 minutos de reação de conversão não foram possíveis de serem avaliados, pois não houve validação estatística para os ensaios. Para cada um dos tempos de reação foram realizados 27 ensaios, 16 referentes ao fatorial (+1 e -1), 8 referentes aos pontos axiais ( $\alpha = 2$ ) e 3 ensaios referentes aos pontos centrais (0).

A Tabela 19 mostra que após 15 minutos de conversão o maior rendimento de 66,77% de isomaltulose ocorreu no ensaio 6 em que os parâmetros de reação foram temperatura a 40°C, pH 5,7, concentração de massa celular 12,5% e concentração de substrato sacarose 27,5%. O menor rendimento ocorreu no ensaio 11, ocorrendo uma conversão de 25,26%, em que os parâmetros do ensaio correspondiam à temperatura de 25°C, pH 6,9, concentração de massa celular de 5% e concentração de substrato sacarose de 42,5%.

No ensaio 24, foi obtido 29,03% de conversão em isomaltulose após 15 minutos de reação, podendo ter ocorrido a inibição da reação de conversão pelo substrato sacarose (50%) devido a alta concentração do mesmo, pois no ensaio 23, em que o único parâmetro que diferiu do ensaio 24 foi a concentração de substrato sacarose (20%) o rendimento foi de 47,62%.

Tabela 19: Planejamento composto central rotacional-2<sup>4</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada

Ensaio	Variável				Isomaltulose (%)		
	Temperatura	pH	Massa Celular	Substrato	15 min	25 min	35 min
1	-1	-1	-1	-1	57,22	55,14	48,77
2	1	-1	-1	-1	62,90	70,26	58,84
3	-1	1	-1	-1	40,91	57,14	49,89
4	1	1	-1	-1	63,08	57,22	50,54
5	-1	-1	1	-1	40,67	64,04	50,33
6	1	-1	1	-1	66,77	52,33	51,59
7	-1	1	1	-1	45,42	56,97	46,76
8	1	1	1	-1	60,45	57,88	58,76
9	-1	-1	-1	1	31,83	33,95	37,31
10	1	-1	-1	1	40,82	43,29	44,73
11	-1	1	-1	1	25,56	32,40	43,11
12	1	1	-1	1	27,67	39,68	46,69
13	-1	-1	1	1	37,24	41,10	37,77
14	1	-1	1	1	37,55	50,87	37,76
15	-1	1	1	1	30,92	48,61	37,50
16	1	1	1	1	31,87	41,63	36,04
17	-2	0	0	0	42,65	44,96	42,19
18	2	0	0	0	53,42	63,44	49,85
19	0	-2	0	0	39,42	43,13	45,71
20	0	2	0	0	35,92	45,46	45,29
21	0	0	-2	0	30,74	41,67	46,49
22	0	0	2	0	49,00	45,80	50,51
23	0	0	0	-2	47,62	55,59	56,81
24	0	0	0	2	29,03	31,45	41,28
25	0	0	0	0	54,93	44,58	42,12
26	0	0	0	0	50,29	44,65	47,54
27	0	0	0	0	47,51	45,24	41,94

Tabela 20: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central rotacional-2<sup>4</sup> no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada

Nível	-2	-1	0	+1	2
Temperatura (°C)	25,0	30,0	35,0	40,0	45,0
pH	5,7	6,1	6,5	6,9	7,3
Massa Celular (%)	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
Substrato (%)	20,0	27,5	35,0	42,5	50,0

Os resultados da conversão após 25 minutos de reação mostram que a menor conversão ocorreu no ensaio 24, com rendimento de 31,45% de isomaltulose, em que os parâmetros de reação do ensaio foram temperatura a 35°C, pH 6,5, concentração de massa celular 10% e concentração de substrato sacarose 50%. O maior rendimento de 70,26% de isomaltulose ocorreu no ensaio 2, a 40°C, pH 6,5, concentração de massa celular de 7,5% e concentração de substrato sacarose de 27,5%.

A Tabela 21 apresenta os efeitos das variáveis independentes na conversão de sacarose em isomaltulose, os valores de t e p, a 90% de nível de confiança, após 15 minutos de conversão. Pode-se observar que a variável temperatura linear apresentou efeito positivo e significativo na faixa estudada ( $p < 0,10$ ). As variáveis pH (L e Q), concentração de massa celular (Q), concentração de substrato sacarose (L e Q) apresentaram efeitos negativos, e significativos nas faixas estudadas a 90% de nível de confiança. Estes resultados indicam que um aumento dos níveis destas variáveis poderia ocasionar um decréscimo no rendimento de isomaltulose.

Tabela 21: Resultados do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação

	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	50,9100	2,1643	23,5228	0,0018
(1) Temperatura (L)*	8,5733	1,5304	5,6021	0,0304
Temperatura (Q)	-0,4942	1,6232	-0,3044	0,7896
(2) pH(L)*	-4,6767	1,5304	-3,0559	0,0925
pH (Q)*	-5,6767	1,6232	-3,4972	0,0729
(3) Massa Celular (L)	3,1183	1,5304	2,0376	0,1785
Massa Celular (Q)*	-4,5767	1,6232	-2,8195	0,1061
(4) Substrato (L)*	-17,5950	1,5304	-11,4971	0,0075
Substrato (Q)*	-5,3492	1,6232	-3,2954	0,0810
1L x 2L	-0,1025	1,8743	-0,0547	0,9614
1L x 3L	0,4300	1,8743	0,2294	0,8399
1L x 4L*	-7,0775	1,8743	-3,7760	0,0635
2L x 3L	2,7475	1,8743	1,4659	0,2803
2L x 4L	-1,7150	1,8743	-0,9150	0,4568
2L x 4 L	2,8125	1,8743	1,5005	0,2723

\*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança.

A interação dos parâmetros temperatura e concentração de massa celular também apresentou um efeito negativo, na faixa estudada ( $p < 0,10$ ). Por outro lado, o parâmetro temperatura apresentou um efeito significativo e positivo dentro da faixa estudada, indicando que maiores temperaturas promoveriam aumento no rendimento de isomaltulose.

A Tabela 22 apresenta a análise de variância (ANOVA) utilizada para a validação estatística e verificação da adequação de um modelo capaz de prever a variável resposta ou variável dependente (rendimento de isomaltulose %) em função dos parâmetros ou variáveis independentes. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo foi de 0,80 e o teste F ( $F_{\text{modelo}}$  igual

a 14,66 e 7,12 vezes maior do que o  $F_{\text{tabelado}} = F_{0,90;7;19} = 2,06$ ) mostram que o modelo foi satisfatório a 90,0% de nível de confiança.

Tabela 22: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3090,4593	07	441,4942	14,66
Resíduos	572,3368	19	30,1230	
Falta de Ajuste	544,2320	17		
Erro Puro	28,1048	2		
Total	3662,7961	26		

Coefficiente de determinação:  $R^2 = 0,90$

$F_{0,90;7;19} = 2,06$

O valor de  $R^2$  de 0,80 indica que cerca de 80% da variação total para a resposta de rendimento de isomaltulose é atribuída as variáveis independentes e 20% do total da variação não pode ser explicado pelo modelo. O baixo valor do erro puro de 28,10, obtido pela triplicata utilizada nos pontos centrais (ensaios 25, 26 e 27) indica uma boa reprodutibilidade do experimento.

O modelo obtido após a validação estatística, em que os coeficientes dos parâmetros de estudos se apresentam na Tabela 23 está representada pela Equação 3 e foi utilizado para se obter as superfícies de respostas e curvas de contorno (Figuras 29a-c):

$$\begin{aligned}
 \text{Isomaltulose}(\%) = & 50,91 + 4,29.Temperatura - 2,34.pH - 2,84.pH^2 - 2,29.MassaCelular^2 - \\
 & - 8,80.Substrato - 2,67.Substrato^2 - 3,54.Temperatura.MassaCelular
 \end{aligned}
 \quad (3)$$

Tabela 23: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, t e p no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t(2)</b>	<b>p</b>
Média*	50,9100	2,1643	23,5228	0,0018
(1) Temperatura (L)*	4,2867	0,7652	5,6021	0,0304
Temperatura (Q)	-0,2471	0,8116	-0,3044	0,7896
(2) pH*	-2,3383	0,7652	-3,0559	0,0925
pH (Q)*	-2,8383	0,8116	-3,4972	0,0729
(3) Massa Celular (L)	1,5592	0,7652	2,0376	0,1785
Massa Celular (Q)*	-2,2883	0,8116	-2,8195	0,1061
(4) Substrato (L)*	-8,7975	0,7652	-11,4971	0,0075
Substrato (Q)*	-2,6746	0,8116	-3,2954	0,0810
1L x 2L	-0,0512	0,9372	-0,0547	0,9614
1L x 3L	0,2150	0,9372	0,2294	0,8399
1L x 4L*	-3,5388	0,9372	-3,7760	0,0635
2L x 3L	1,3738	0,9372	1,4659	0,2803
2L x 4L	-0,8575	0,9372	-0,9150	0,4568
2L x 4 L	1,4063	0,9372	1,5005	0,2723

\*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança  
(L) parâmetro linear; (Q) parâmetro quadrático.

As Figuras 29a-b mostram as superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis, temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp. D12 em processo em batelada após 15 minutos de reação.

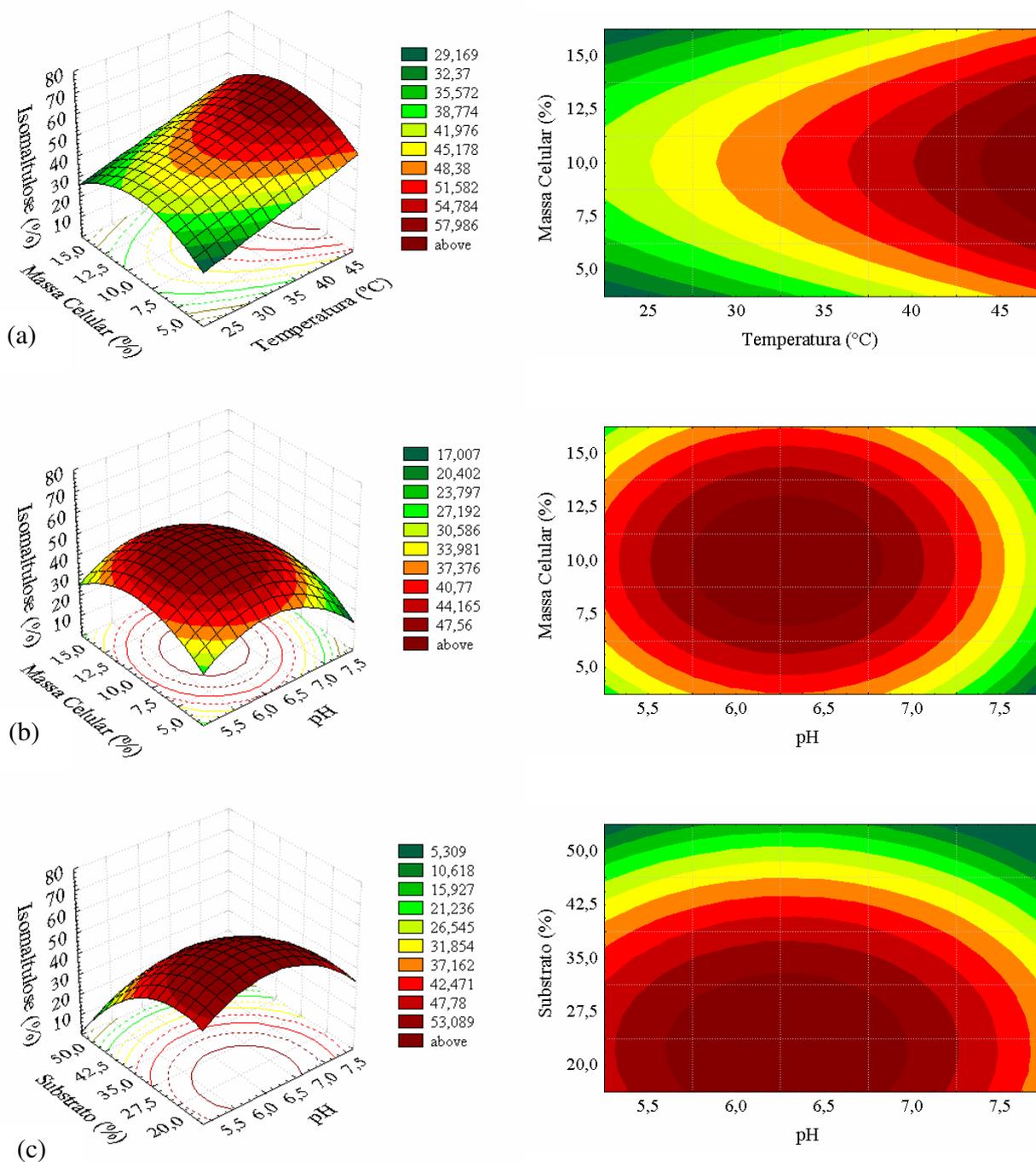


Figura 29: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.

(a) em função da temperatura e massa celular e do substrato.

(b) em função do pH e massa celular.

(c) em função do pH e da concentração de substrato.



A Figura 29a e 29b mostram que a faixa de concentração de massa celular para um maior rendimento está entre 7,5% a 12,5%, e que a concentração de conversão máxima é de 10%. A Figura 29c indica que pode ser utilizada uma concentração de solução de sacarose numa faixa entre 20% e 35% para se obter bons resultados com rendimentos acima de 50%. Com relação a variável pH, as Figuras 29b e 29c mostram que a melhor faixa de pH para a conversão de sacarose em isomaltulose está entre 5,5 e 7,0. A Figura 29a revela uma tendência de maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose em temperaturas superiores a 30°C com rendimentos acima de 50% após 15 minutos de reação.

A Tabela 24 apresenta os efeitos das variáveis independentes na conversão de sacarose em isomaltulose e valores de t e p, a 95% de nível de confiança, após 25 minutos de reação. A variável independente temperatura (L e Q) e as interações dos parâmetros temperatura e pH, temperatura e concentração de células livres, pH e concentração de substrato sacarose, pH e concentração de células livres apresentaram efeitos positivos e significativos na faixa estudada.

As variáveis independentes pH (L e Q) e concentração de massa celular (L) apresentaram efeitos negativos e significativos nas faixas estudadas a 95,0% de nível de confiança. A Tabela 26 apresenta a ANOVA. O coeficiente de determinação do modelo foi de 0,86 e o teste F ( $F_{\text{modelo}}$  igual a 7,34 e 2,90 vezes maior do que o  $F_{\text{tabelado}} = F_{0,95;12;14} = 2,53$ ) mostram que o modelo foi satisfatório a 95,0% de nível de confiança. Foi obtido também baixo valor do erro puro de 0,2629, obtido pela triplicata utilizada nos pontos centrais (ensaios 25, 26 e 27) indicando uma boa reprodutibilidade do experimento.

Tabela 24: Resultados do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação

	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	44,8233	0,2093	214,1470	0,0000
(1) Temperatura (L)*	5,0642	0,1480	34,2161	0,0009
Temperatura (Q)*	5,9281	0,1570	37,7628	0,0007
(2) pH (L)*	-1,2325	0,1480	-8,3274	0,0141
pH (Q)*	0,9756	0,1570	6,2148	0,0249
(3) Substrato (L)*	2,7175	0,1480	18,3608	0,0030
Substrato (Q)*	0,6956	0,1570	4,4312	0,0473
(4) Massa Celular (L)*	-15,6442	0,1480	-105,7001	0,0001
Massa Celular (Q)	0,5881	0,1570	3,7464	0,0644
1L x 2L*	-2,6538	0,1813	-14,6399	0,0046
1L x 3L*	-4,9788	0,1813	-27,4661	0,0013
1L x 4L*	1,8763	0,1813	10,3507	0,0092
2L x 3L*	1,6188	0,1813	8,9301	0,0123
2L x 4L	0,7088	0,1813	3,9099	0,0596
3L x 4L*	5,1788	0,1813	28,5695	0,0012

\*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

O modelo obtido após a validação estatística, em que os coeficientes dos parâmetros de estudos se apresentam na Tabela 25, está representada pela Equação 4 e foi utilizado para gerar as superfícies de respostas e curvas de contorno (Figuras 30a-c):

$$\begin{aligned}
 \text{Isomaltulose(\%)} = & 44,82 + 2,53.Temperatura + 2,96.Temperatura^2 - 0,62.pH - 0,49.pH^2 + 1,36.MassaCelular + \\
 & + 0,35.MassaCelular^2 - 7,36.Subtrato - 1,32.Temperatura.pH - 2,48.Temperatura.MassaCelular + \\
 & + 0,94.Temperatura.Subtrato + 0,81.pH.MassaCelular + 2,58.MassaCelular.Subtrato
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

Tabela 25: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	44,8233	0,2093	214,1470	0,0000
(1) Temperatura (L)*	2,5321	0,0740	34,2161	0,0009
Temperatura (Q)*	2,9641	0,0785	37,7628	0,0007
(2) pH*	-0,6163	0,0740	-8,3274	0,0141
pH (Q)*	0,4878	0,0785	6,2148	0,0249
(3) Substrato (L)*	1,3588	0,0740	18,3608	0,0030
Substrato (Q)*	0,3478	0,0785	4,4312	0,0473
(4) Massa Celular (L)*	-7,8221	0,0740	-105,7001	0,0001
Massa Celular (Q)	0,2941	0,0785	3,7464	0,0644
1L x 2L*	-1,3269	0,0906	-14,6399	0,0046
1L x*	-2,4894	0,0906	-27,4661	0,0013
1L x 4L*	0,9381	0,0906	10,3507	0,0092
2L x*	0,8094	0,0906	8,9301	0,0123
2L x 4L	0,3544	0,0906	3,9099	0,0596
3L x 4 L*	2,5894	0,0906	28,5695	0,0012

\*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.  
(L) parâmetro linear; (Q) parâmetro quadrático.

Tabela 26: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2137,1841	12	178,0987	7,34
Resíduos	339,9130	14	24,2795	
Falta de Ajuste	339,6501	12		
Erro Puro	0,2629	2		
Total	2477,0971	26		

Coefficiente de determinação:  $R^2 = 0,86$

$F_{0,95;12;14} = 2,53$

As Figuras 30a-c mostram as superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis, temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp. D12 em processo em batelada após 25 minutos de reação.

A Figura 30c mostra que há uma tendência para um maior rendimento (acima de 65%) utilizando-se uma concentração de massa celular abaixo de 12,5%, dentro dos limites estudados, de 5% a 15%. As Figuras 30a e 30b indicam que pode ser utilizada uma concentração de solução de sacarose numa concentração de 35% ou menor, para se obter bons resultados no rendimento (acima de 50%). A Figura 30b mostra que dentro da faixa estudada de pH, entre 5,5 e 7,5, os rendimentos seriam acima de 60% de isomaltulose.

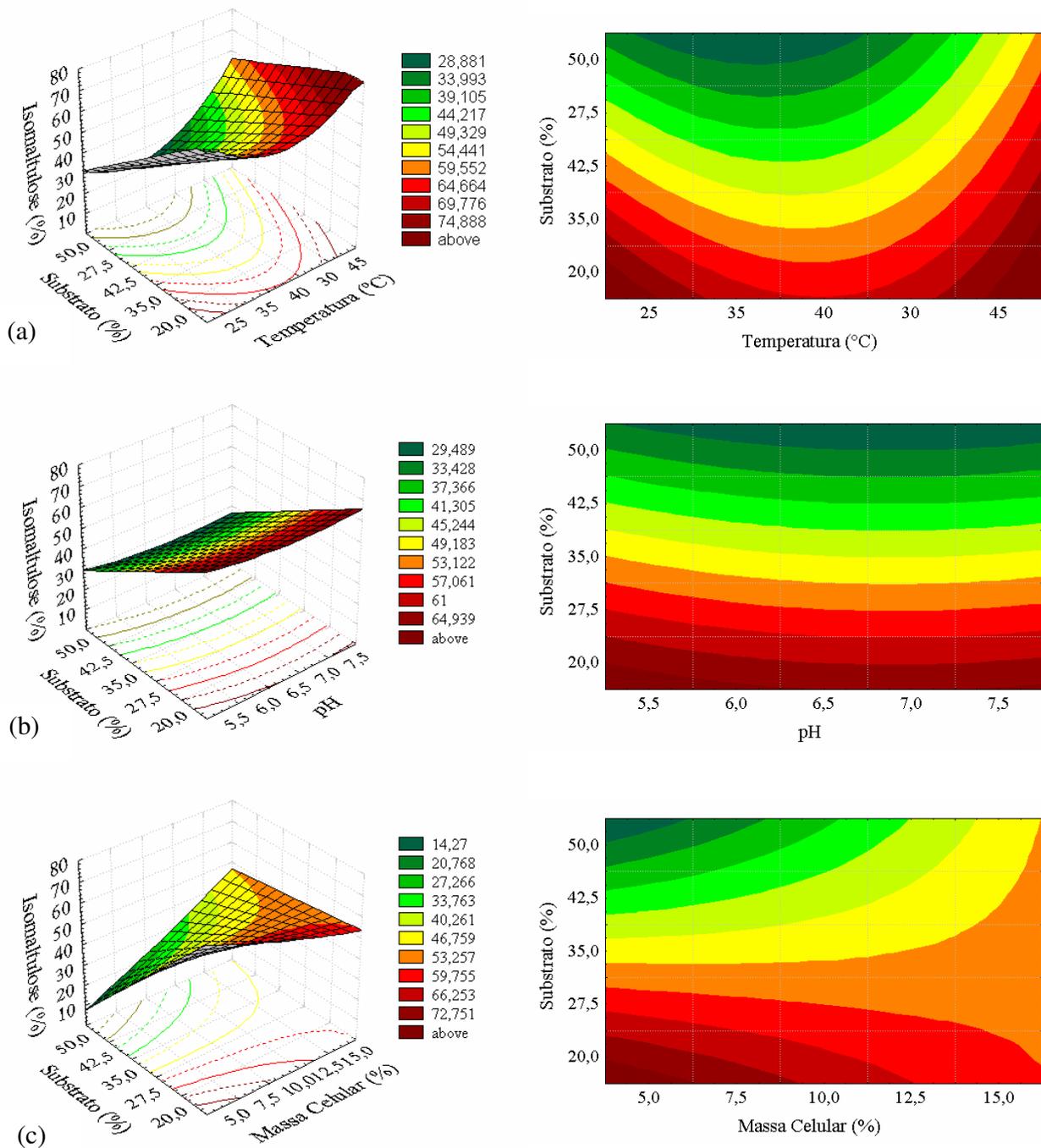


Figura 30: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 25 minutos de reação.

- (a) em função da temperatura e da concentração do substrato.
- (b) em função do pH e da a concentração do substrato.
- (c) em função da concentração da massa celular e do substrato.



O PCCR-2<sup>4</sup> foi utilizado para avaliar o efeito das variáveis temperatura, pH, concentração do substrato e concentração de células na produção de isomaltulose por células livres no processo em batelada. No entanto, a análise descrita abaixo se refere à quantidade de sacarose remanescente, ou residual, após cada período. O planejamento apresenta-se na Tabela 27, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 28. As análises foram realizadas através dos resultados dos testes de conversão de sacarose em isomaltulose usando células livres de *Erwinia* sp. D12 e tempos de 15, 25 e 35 minutos de reação. Os resultados referentes a 25 e 35 minutos de reação de conversão não foram possíveis de serem avaliados, pois não houve validação estatística para os ensaios.

A Tabela 27 mostra que após 15 minutos de reação a maior quantidade de sacarose não convertida de 47,22% ocorreu no ensaio 23 em que os parâmetros de reação foram temperatura a 35°C, pH 6,5, concentração de massa celular 5% e concentração de substrato sacarose 27,5%. A conversão total da sacarose, após 15 minutos, ocorreu nos ensaios 5 (temperatura a 30°C, pH 6,0, concentração de massa celular 12,5% e concentração de substrato sacarose 27,5%), 7 (temperatura a 30°C, pH 7,0, concentração de massa celular 12,5% e concentração de substrato sacarose 27,5%) e 18 (temperatura a 45,0 °C, pH 6,5, concentração de massa celular 10% e concentração de substrato sacarose 35%). Foi verificado ainda que, 25 minutos após o início da reação de conversão, em muitos dos ensaios houve transformação total da sacarose (ensaios de 2 a 8 e ensaio 18).

Praticamente em todos ensaios houve significativa diminuição da quantidade de sacarose, exceto nos ensaios 21 e 24, nos quais restavam mais de 30% de sacarose na solução de reação (Tabela 27). No ensaio 21 havia uma menor concentração de massa celular e no ensaio 24, havia uma maior concentração do substrato sacarose, o que poderia explicar uma taxa de conversão menor nos dois ensaios. Após 35 minutos de reação, em praticamente todos os ensaios ou a sacarose foi esgotada ou havia quantidades residuais insignificantes, excetuando-se os ensaios 11, 21 e 24 com sacarose remanescente de 13,06, 18,22 e 24,96%, respectivamente.

Tabela 27: Planejamento composto central 2<sup>4</sup> codificado para estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada

Ensaio	Variável				Sacarose Residual (%)		
	Temperatura	pH	Células Livres	Substrato	15 min	25 min	35 min
1	-1	-1	-1	-1	8,68	2,02	0,00
2	1	-1	-1	-1	6,78	0,00	0,00
3	-1	1	-1	-1	7,88	0,00	0,00
4	1	1	-1	-1	8,45	0,00	0,00
5	-1	-1	1	-1	0,00	0,00	0,00
6	1	-1	1	-1	4,16	0,00	0,00
7	-1	1	1	-1	0,00	0,00	0,00
8	1	1	1	-1	2,35	0,00	0,00
9	-1	-1	-1	1	26,17	12,64	4,86
10	1	-1	-1	1	18,75	5,28	1,86
11	-1	1	-1	1	32,17	19,69	13,06
12	1	1	-1	1	18,95	8,07	3,41
13	-1	-1	1	1	13,35	3,63	0,00
14	1	-1	1	1	10,31	2,67	0,00
15	-1	1	1	1	9,64	2,74	0,00
16	1	1	1	1	6,07	1,46	0,00
17	-2	0	0	0	5,55	1,56	0,00
18	2	0	0	0	0,00	0,00	0,00
19	0	-2	0	0	38,73	18,56	6,44
20	0	2	0	0	22,76	6,53	1,99
21	0	0	-2	0	46,34	31,10	18,22
22	0	0	2	0	18,16	3,34	0,00
23	0	0	0	-2	47,22	22,31	7,30
24	0	0	0	2	45,27	30,92	24,96
25	0	0	0	0	20,48	4,89	0,00
26	0	0	0	0	22,38	4,05	0,00
27	0	0	0	0	20,79	4,57	0,00

Tabela 28: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada

Nível	-2	-1	0	+1	2
Temperatura (°C)	25,0	30,0	35,0	40,0	45,0
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
Células Livres (%)	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
Substrato (%)	20,0	27,5	35,0	42,5	50,0

A Figura 31 apresenta os efeitos das variáveis independentes na conversão de sacarose em isomaltulose e limites de 90% de nível de confiança. Pode-se observar que a variável substrato (L e Q) apresentou efeito positivo e significativo na faixa estudada ( $p < 0,10$ ). As variáveis temperatura (L e Q), pH (L), concentração de massa celular (L) apresentaram efeitos negativos, e significativos nas faixas estudadas a 90% de nível de confiança.

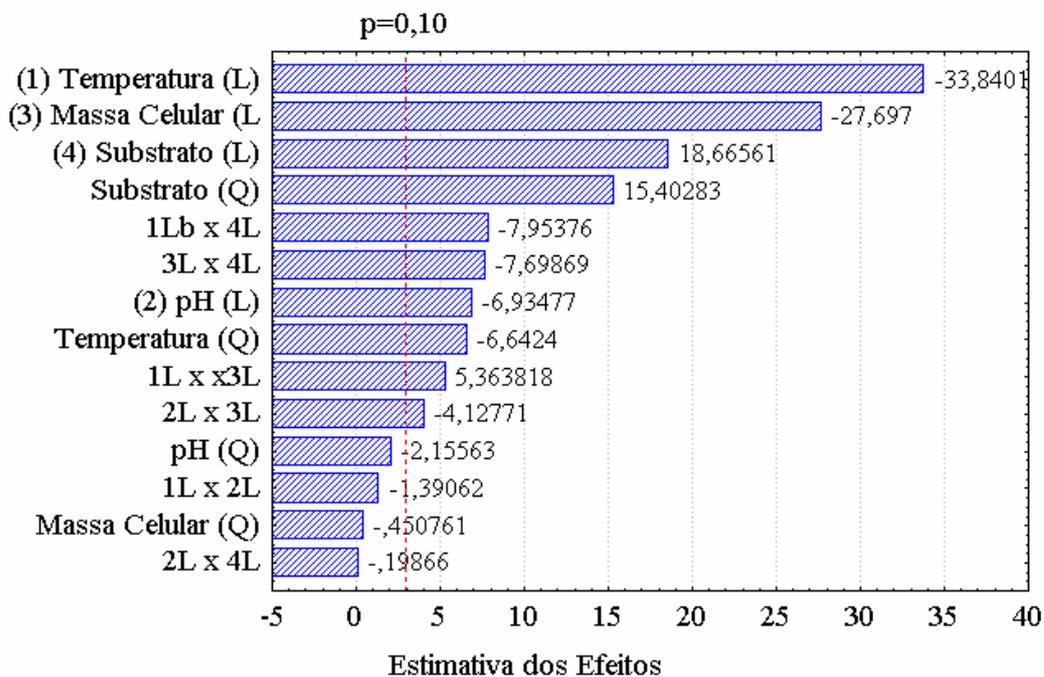


Figura 31: Resultados do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.



A Tabela 29 apresenta a análise de variância (ANOVA) utilizada para a validação estatística e verificação da adequação de um modelo que forneça a variável resposta ou variável dependente (sacarose residual) em função dos parâmetros ou variáveis independentes.

Tabela 29: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3124,5321	10	312,4532	2,20
Resíduos	2271,0025	16	141,9377	
Falta de Ajuste	2268,9244	14		
Erro Puro	2,0781	2		
Total	5395,5345	26		

Coefficiente de correlação:  $R = 0,80$ ;  $F_{0,90;10;16} = 2,03$

O teste F ( $F_{\text{modelo}}$  igual a 2,20, maior do que o  $F_{\text{tabelado}}=F_{0,90;10;16}=2,03$ ) mostra que o modelo foi satisfatório a 90% de nível de confiança. O baixo valor do erro puro de 1,04 obtido pela triplicata utilizada nos pontos centrais (ensaios 25, 26 e 27) indica uma boa reprodutibilidade do experimento. O modelo obtido após a validação estatística, em que os coeficientes dos parâmetros de estudos se apresentam na Tabela 30, foi utilizado para se obter as superfícies de respostas e curvas de contorno (Figura 30).

$$\text{Sacarose}(\%) = 21,22 - 1,38.Temperatura - 7,47.Temperatura^2 - 1,44.pH - 5,76.MassaCelular + 1,37.Temperatura.MassaCelular - (5) - 2,03.Temperatura.Substrato - 1,05.pH.MassaCelular - 1,9619.pH.substrato$$

Tabela 30: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
Média*	21,2167	0,5885	36,0515	0,0008
(1) Temperatura (L)*	-1,3821	0,2081	-6,6424	0,0219
Temperatura (Q)*	-7,4682	0,2207	-33,8401	0,0009
(2) pH*	-1,4429	0,2081	-6,9348	0,0202
pH (Q)	-0,4757	0,2207	-2,1556	0,1639
(3) Massa Celular (L) *	-5,7629	0,2081	-27,6970	0,0013
Massa Celular (Q)	-0,0995	0,2207	-0,4508	0,6963
(4) Substrato (L)*	3,8838	0,2081	18,6656	0,0029
Substrato (Q)*	3,3993	0,2207	15,4028	0,0042
1L x 2L	-0,3544	0,2548	-1,3906	0,2989
1L x 3L*	1,3669	0,2548	5,3638	0,0330
1L x 4L*	-2,0269	0,2548	-7,9538	0,0154
2L x 3L*	-1,0519	0,2548	-4,1277	0,0540
2L x 4L	-0,0506	0,2548	-0,1987	0,8609
2L x 4 L*	-1,9619	0,2548	-7,6987	0,0165

\*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de nível de confiança.  
(L) parâmetro linear; (Q) parâmetro quadrático.

As Figuras 32a-c mostram as superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis, temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada após 15 minutos de reação. A Figura 32c mostra que dentro da faixa estudada a concentração de células livres para um maior rendimento seria igual ou maior do que 10%.

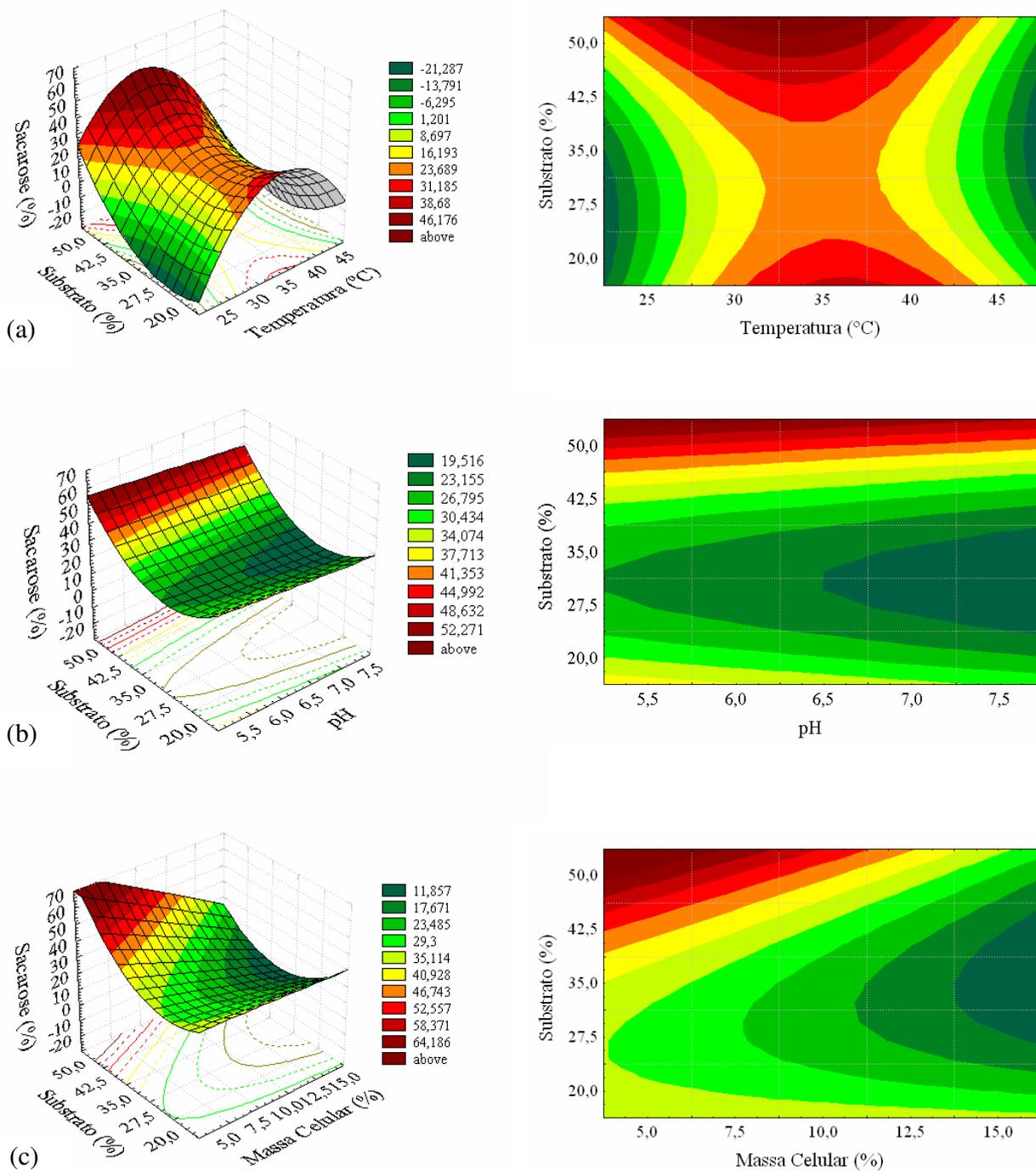


Figura 32: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de massa celular na quantidade de sacarose residual durante a obtenção de isomaltulose utilizando-se células livres em processo em batelada de 15 minutos de reação.

- (a) em função da temperatura e do substrato.
- (b) em função do pH e do substrato.
- (c) em função da massa celular e do substrato.



As Figuras 32a, 32b e 32c indicam que pode ser utilizada uma concentração de solução de sacarose numa faixa entre 20% e 40% para se obter bons resultados de conversão, sendo que a concentração ótima seria de 35%. Com relação a variável pH, a Figura 32b mostra que, dentro da faixa estudada, os melhores valores de pH para a conversão de sacarose em isomaltulose estariam acima de 6,5. A Figura 32a mostra uma ceta com duas faixas de ótimo, a primeira revela uma tendência de maior taxa de conversão de sacarose por volta de 30°C e uma segunda, acima de 40°C.

#### ***5.4.2. Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: otimização da conversão de sacarose em isomaltulose***

A conversão de sacarose em isomaltulose por células livres, em processo em batelada, foi testada utilizando-se três ensaios em que foram obtidas maiores taxas de conversão de isomaltulose como descrito no item 4.5.3.

A Figura 33 mostra a produção de isomaltulose e de outros açúcares, utilizando-se massa celular 10%, concentração de substrato sacarose 35% e incubação a 35°C, pH 6,5 e 200rpm (Ensaio A) em que as células de *Erwinia* sp. D12 foram utilizadas durante 10 bateladas. A maior conversão de sacarose em isomaltulose ocorreu na primeira batelada em que foi obtido 73,23% de isomaltulose, não restando sacarose residual. Nos demais ensaios a conversão em isomaltulose variou entre 50-65%, exceto na sexta batelada, em que foi obtido 45,15% de isomaltulose. A formação de outros açúcares como glicose e frutose foi mínima, em torno 1% em todos os ensaios realizados. A presença de sacarose residual foi nula até a nona batelada, restando cerca de 1,29% na décima batelada. Foi verificado que a conversão de sacarose em isomaltulose foi alta, acima de 50%, e que as células foram viáveis por 10 bateladas.



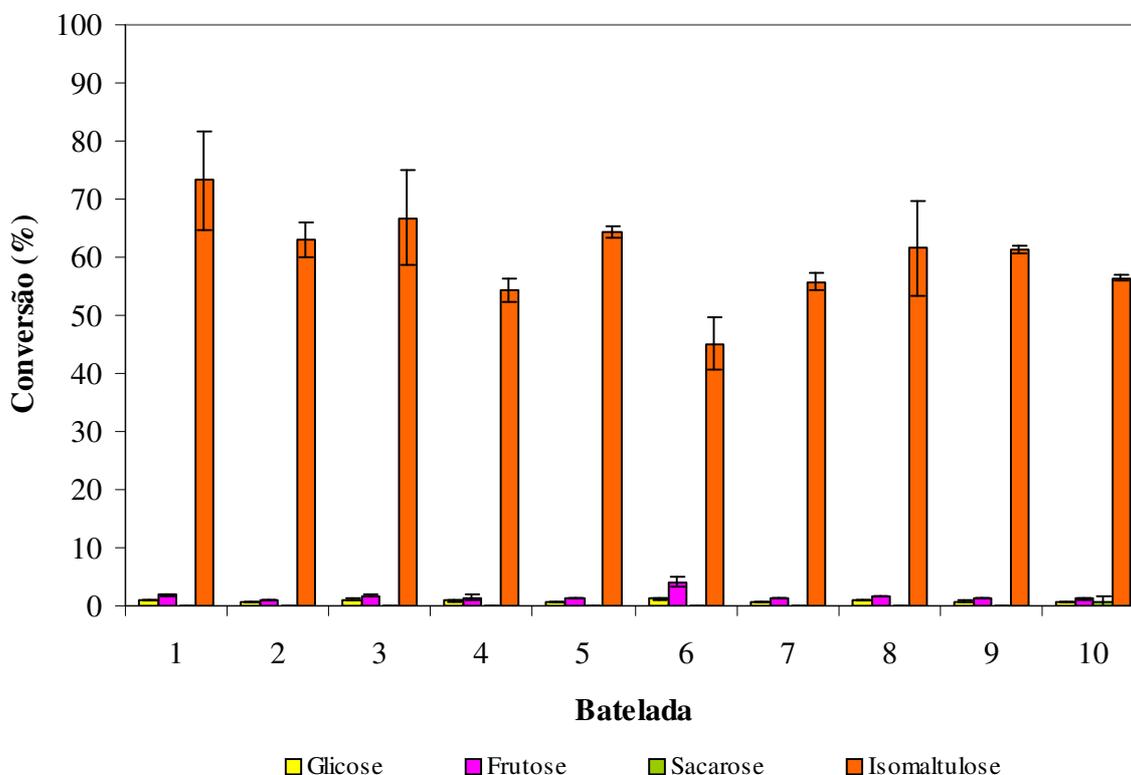


Figura 33: Produção de isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada: otimização da conversão (Ensaio A- massa celular 10,0%, concentração de substrato sacarose 35% ,temperatura 35°C, pH 6,5 e 200rpm).

A Figura 34 mostra a produção de isomaltulose e outros açúcares utilizando-se massa celular 12,5%, concentração de substrato sacarose 27,5%, 40°C, pH 6,0 e 200rpm (Ensaio B) durante 10 bateladas. Foi observado que nas seis primeiras bateladas a conversão de sacarose em isomaltulose atingiu valores entre 59-77%. A maior conversão de 77,0% em isomaltulose ocorreu na segunda batelada. Apesar da alta produção de isomaltulose foi verificado que a formação desse açúcar ocorreu somente até a sexta batelada. Na sétima batelada a formação de isomaltulose foi 5,45%, sendo que não houve formação de isomaltulose na oitava e nona batelada. Na décima batelada a formação de isomaltulose foi cerca de 1,92% sendo que a partir da sétima batelada mais de 85% de sacarose não havia sido transformada.



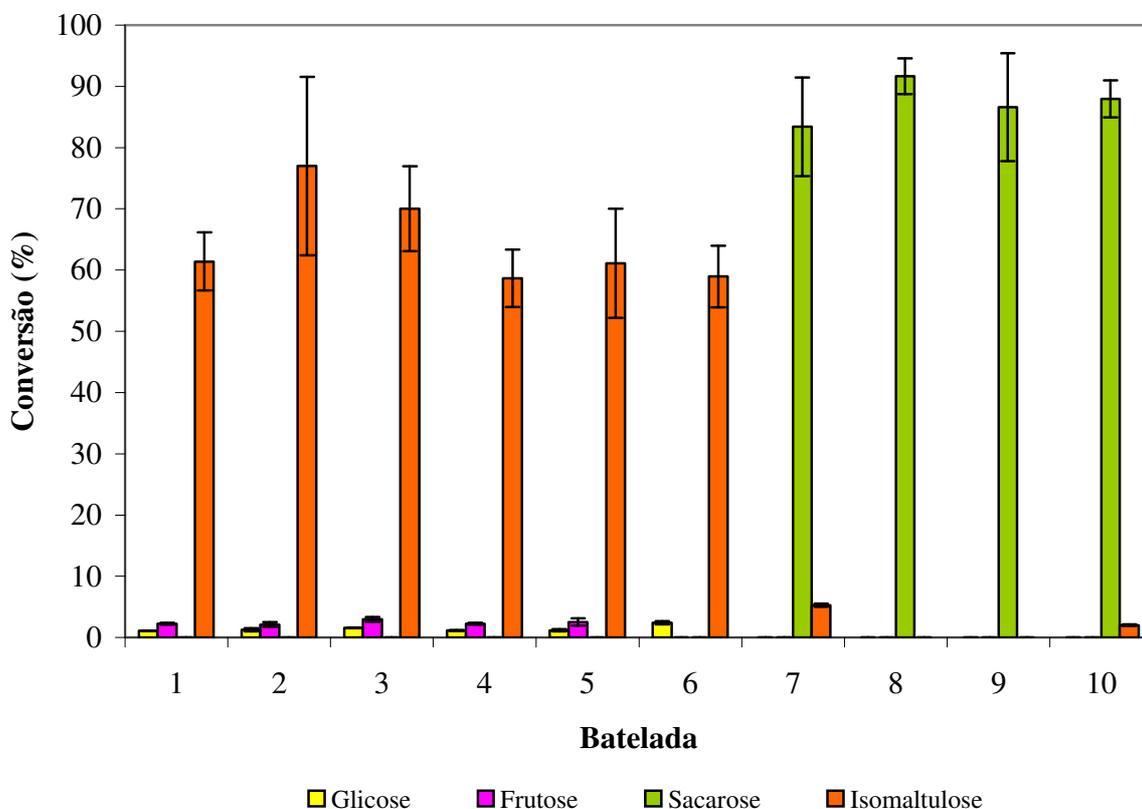


Figura 34: Produção de isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada: otimização da conversão (Ensaio B- massa celular 12,5%, concentração de substrato sacarose 27,5%, 40°C, pH 6,0 e 200rpm).

A Figura 35 mostra a produção de isomaltulose utilizando-se massa celular 7,5%, concentração de substrato sacarose 27,5%, 40°C, pH 7,0 e 200rpm (Ensaio C). Foi verificado que a conversão em isomaltulose foi máxima na segunda batelada, quando foi obtido 74,99% de isomaltulose. A partir da terceira batelada, em que foi obtido 72,84% de isomaltulose, a conversão foi diminuindo gradativamente até a sexta batelada quando foi obtido 57,53% de isomaltulose; sendo que a partir desta batelada, houve uma queda acentuada. Nas três últimas bateladas a quantidade de isomaltulose foi pequena, sendo obtidas, 5,78%, 13,79% e 12,56%, respectivamente.



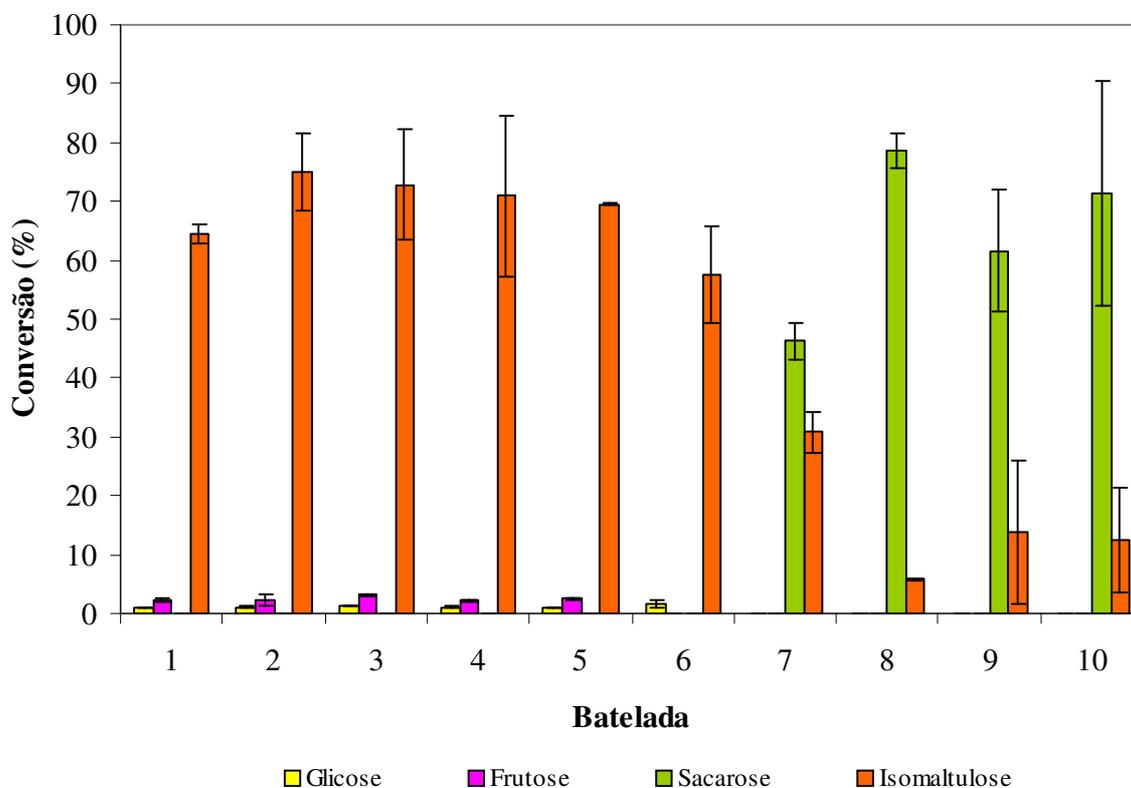


Figura 35: Produção de isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada: otimização da conversão (Ensaio C- massa celular 7,5%, concentração de substrato sacarose 27,5%, 40°C, pH 7,0 e 200rpm).

Na Figura 36 está representada a produção de isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada, nas condições dos ensaios A, B e C. Foi observado que, com exceção da primeira batelada, os ensaios B e C, apresentam uma conversão em isomaltulose um pouco superior a do ensaio A até a sexta batelada. No entanto, a partir da sétima batelada, foi observado que houve uma queda na produção de isomaltulose nos ensaios B e C e uma maior estabilidade das células livres no ensaio A.



Pode-se concluir que os parâmetros utilizados no ensaio A (massa celular 10%, concentração de substrato sacarose 35% (p/v), temperatura a 35°C, pH 6,5, e 200rpm) foram os mais adequados no que se refere a estabilidade das células e conversão de sacarose em isomaltulose. Uma explicação para a queda na produção de isomaltulose ocorrida nos ensaios B e C seria a temperatura de 40°C, mais alta que a do ensaio A, de 35°C. Apesar do aumento de temperatura favorecer a velocidade de transformação e a temperatura de 40°C se aproximar da temperatura ótima, como demonstrado no item 4.4.1, a alta temperatura poderia ter inativado a enzima, que não é termoestável, provocando a queda na produção.

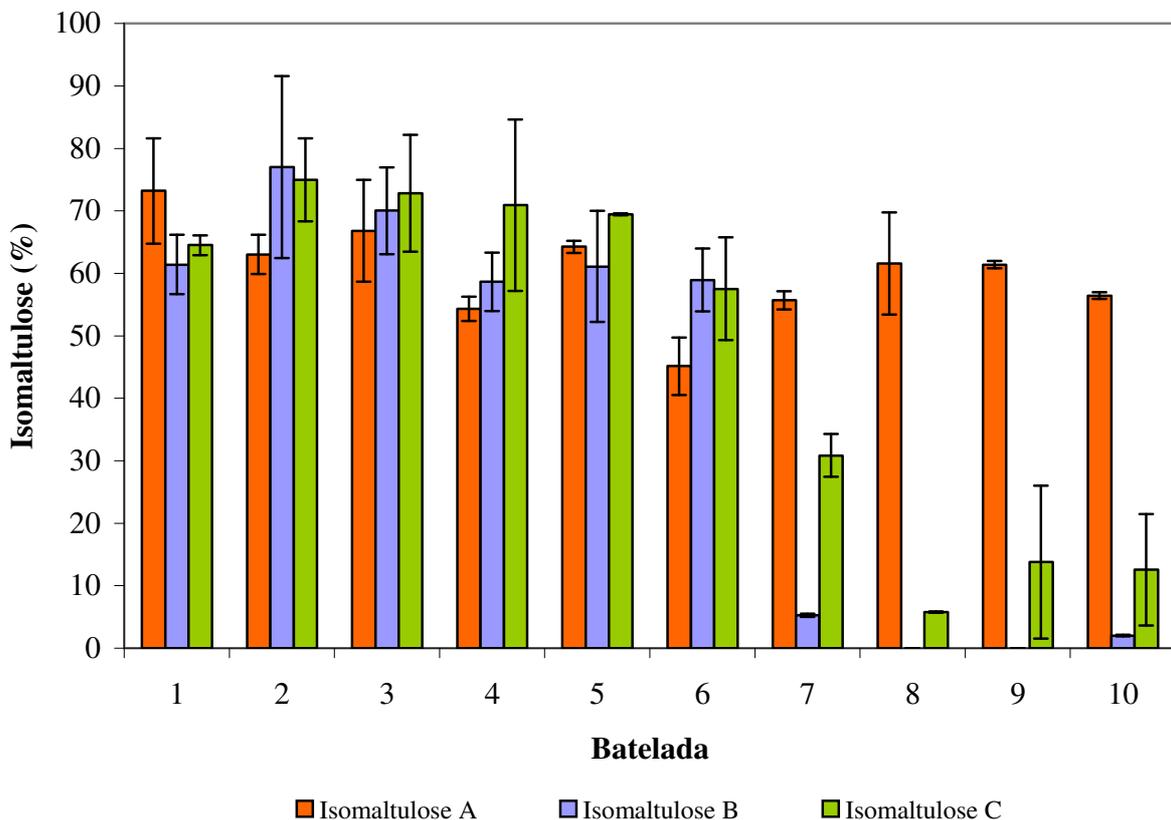


Figura 36: Produção de isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12, em processo em batelada utilizando-se os parâmetros dos ensaios A, B e C.



#### ***5.4.3. Estudo da produção de isomaltulose por células livres em processo em batelada: reativação celular***

A reativação das células de *Erwinia* sp. D12, após reutilização repetida para conversão de sacarose em isomaltulose, foi verificada pela incubação das células em novo meio de cultivo como descrito no item 4.5.4.

A Figura 37 mostra que nas quatro primeiras bateladas houve uma variação na conversão de sacarose em isomaltulose, oscilando entre 60-70% de conversão; sendo estabilizadas na quinta e sexta bateladas. Na quinta batelada a conversão foi de 70,8% de isomaltulose, sendo que a partir da sexta batelada houve uma queda contínua na conversão, atingindo 61,8% na oitava batelada. Foi verificado que a tentativa de reativar as células de *Erwinia* sp. D12 através da incubação das células em novo meio de cultivo, após a oitava batelada, não resultou em recuperação da atividade de glicosiltransferase.

Nas oito bateladas posteriores, foi observada queda na conversão em isomaltulose, sendo que na primeira batelada após a tentativa de reativação das células foi obtida cerca de 55,46% de isomaltulose e na última batelada foi obtido somente 34,78% de isomaltulose, restando cerca de 41,77% de sacarose não transformada.



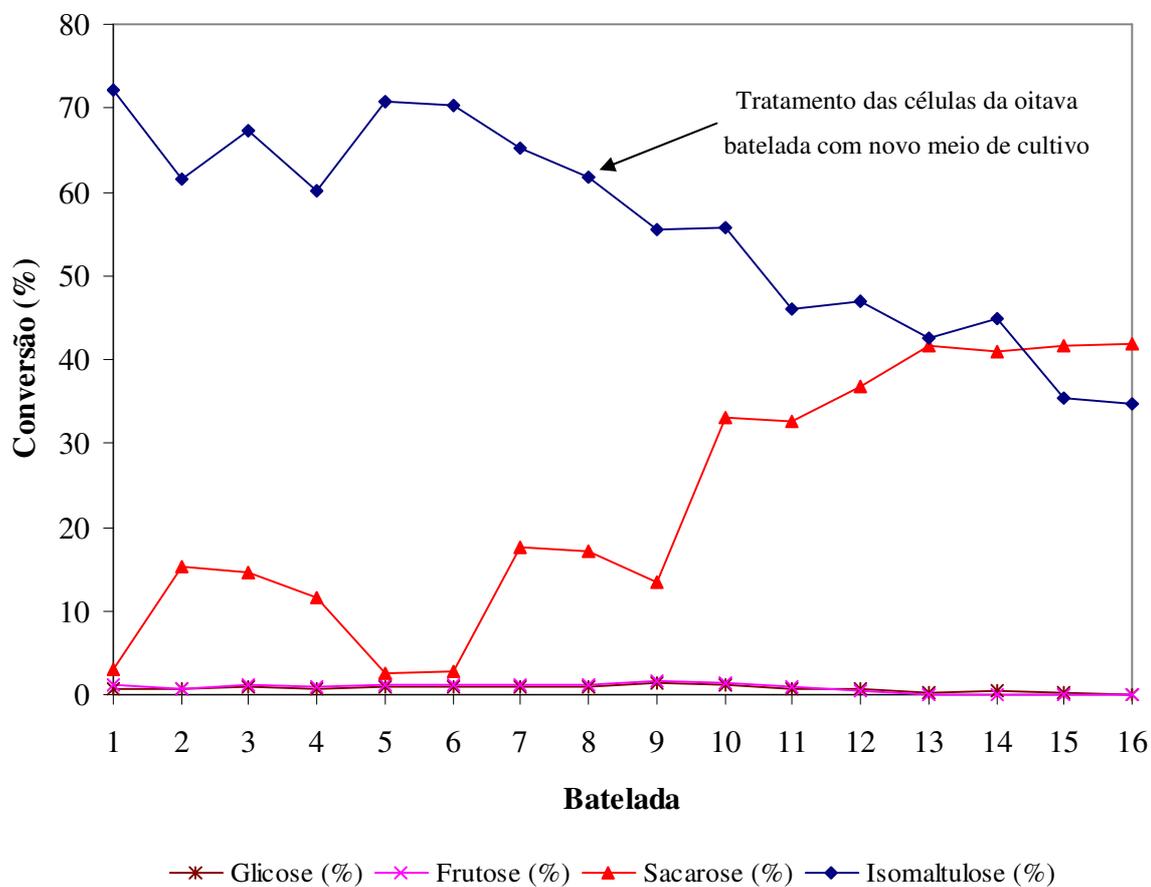


Figura 37: Estudo da reativação das células livres de *Erwinia* sp. D12 utilizadas no processo em batelada na produção de isomaltulose.

**5.4.4. Estudo da alteração da quantidade de massa celular e contagem de células viáveis durante a produção de sacarose em isomaltulose utilizando células livres de *Erwinia* sp. D12**

A alteração da quantidade de massa celular e contagem de células viáveis durante a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12, em processo de batelada, foi testada de acordo com o item 4.5.5.



A Figura 38 mostra a produção de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres obtidas pela fermentação da linhagem *Erwinia* sp. D12 nos meios de cultivos otimizados contendo peptona (símbolos com preenchimento) e contendo água de maceração de milho (símbolos sem preenchimento).

Pode-se observar que as células cultivadas em meio contendo peptona apresentaram taxas de conversão de sacarose em isomaltulose pouco superiores daquelas obtidas pelas células cultivadas em meio contendo água de maceração de milho. Foi obtido rendimento de aproximadamente 79% de isomaltulose nas primeiras oito bateladas. Após a oitava batelada, as células pernoitaram com solução de sacarose, sendo obtido 58,53% de isomaltulose e o pH da solução caiu para 4,5. Entre a décima e a décima sétima bateladas a conversão variou entre 73-79%. Após a décima oitava batelada, as células pernoitaram com solução de sacarose, sendo obtido 23,16% de isomaltulose.

A partir da vigésima batelada houve grande inativação da glicosiltransferase e a conversão permaneceu ao redor de 15% até a vigésima quarta batelada. Foi observada pequena alteração do pH durante a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12 nas oito primeiras bateladas, sendo que o pH permaneceu por volta de 6,0. Na nona batelada em que a mistura de massa celular e solução 35% de sacarose pernoitou a 35°C, o pH diminuiu para 4,5. Entre a décima e décima sexta bateladas, houve pequena queda de pH entre 5,2-5,8. Na décima sétima batelada em que a mistura de massa celular e solução 35% de sacarose pernoitou a 35°C, o pH diminuiu para 4,0. A partir da décima oitava batelada o pH permaneceu em torno de 5,0.



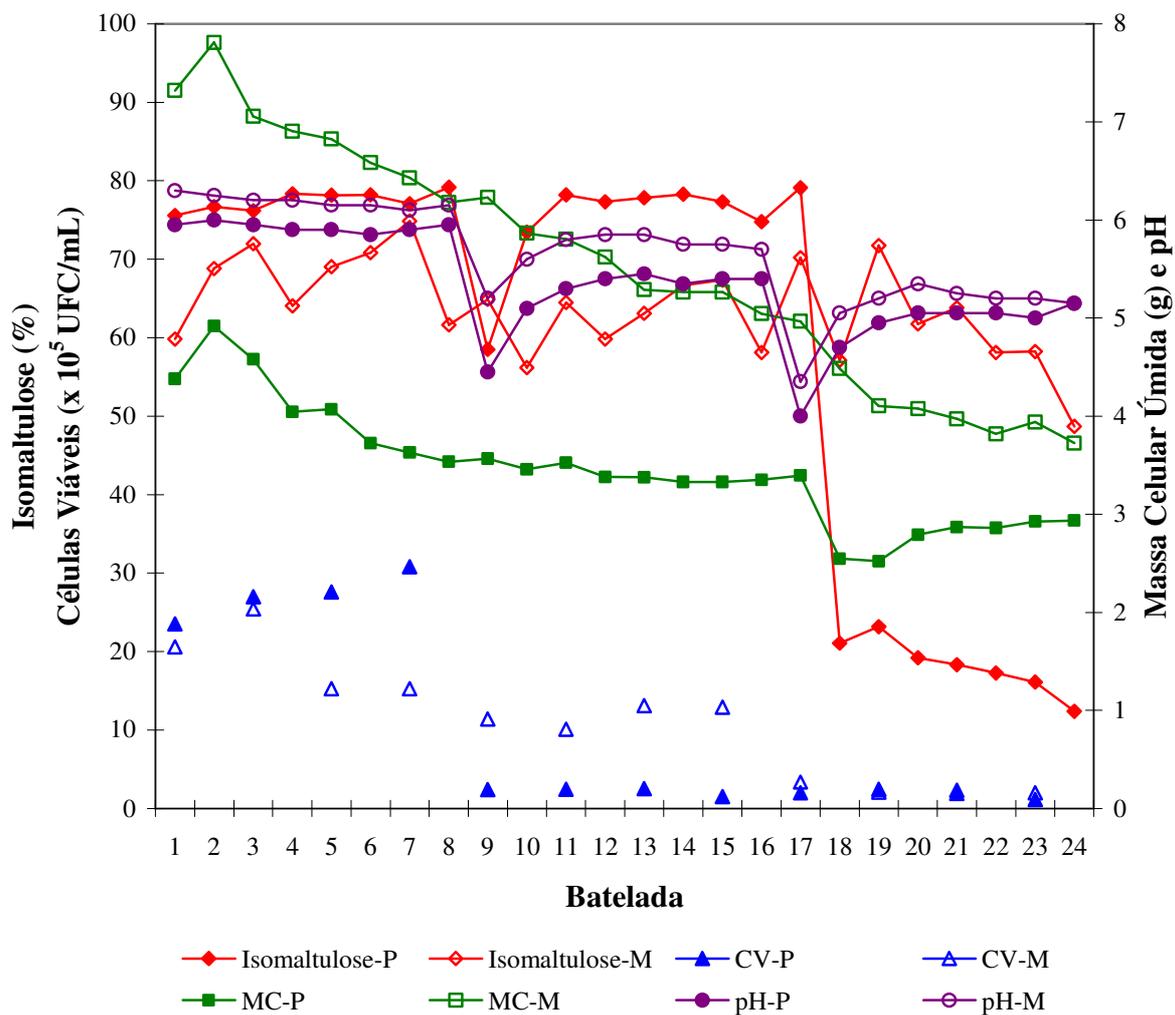


Figura 38: Alteração da quantidade de massa celular e células viáveis durante a produção de isomaltulose utilizando células livres de *Erwinia* sp. D12 em processo em batelada.

- ◆ Isomaltulose-P: conversão de sacarose em isomaltulose por células livres cultivadas em meio contendo peptona.
- ◇ Isomaltulose-M: conversão de sacarose em isomaltulose por células livres cultivadas em meio contendo água de maceração de milho.
- ▲ CV-P: células viáveis na mistura de reação contendo células livres cultivadas em meio contendo peptona e xarope de sacarose.
- △ CV-M: células viáveis na mistura de reação contendo células livres cultivadas em meio contendo água de maceração de milho e xarope de sacarose.
- MC-P: quantidade g de massa celular úmida cultivada em meio contendo peptona.
- MC-M: quantidade g de massa celular úmida cultivada em meio contendo água de maceração de milho.
- pH-P: pH da mistura de reação contendo células livres cultivadas em meio contendo peptona e xarope de sacarose.
- pH-M: pH da mistura de reação contendo células livres cultivadas em meio contendo água de maceração de milho e xarope de sacarose.



A massa celular úmida inicial (4,38 g) obtida pela fermentação da linhagem *Erwinia* sp. D12 em meio contendo peptona foi menor que a obtida em meio contendo água de maceração de milho (7,32 g). Durante a conversão de sacarose em isomaltulose usando células livres houve uma perda gradual e lenta da massa celular úmida ao longo das bateladas, sendo obtido 2,94 g de massa celular úmida após a vigésima quarta batelada. Pode-se observar também que, houve um aumento das células viáveis de  $23,5 \times 10^5$  UFC/mL em relação a primeira batelada para  $30,8 \times 10^5$  UFC/mL na sétima batelada. Posteriormente, houve queda acentuada das células viáveis obtendo-se  $1,15 \times 10^5$  UFC/mL após a vigésima terceira batelada.

As células cultivadas em meio contendo água de maceração de milho apresentaram taxas de conversão de sacarose em isomaltulose pouco menores daquelas obtidas pelas células cultivadas em meio contendo peptona. No entanto, as células cultivadas em meio contendo água de maceração de milho mostraram-se mais estáveis, sendo obtidas altas taxas de conversão até a vigésima quarta batelada. Foi obtido rendimento de aproximadamente 60-74% nas primeiras 8 bateladas. Após a oitava batelada, as células pernoitaram com solução de sacarose, sendo obtido 64,88% de isomaltulose e o pH da solução caiu para 5,2. Entre a décima e a décima sétima bateladas a conversão variou entre 56-70%. Após a décima oitava batelada, as células pernoitaram com solução de sacarose, sendo obtido 57,14% de isomaltulose. A conversão variou entre 48-63% da vigésima primeira a vigésima quarta batelada.

Durante a conversão da sacarose em isomaltulose usando células livres houve pouca alteração do pH nas oito primeiras bateladas, permanecendo por volta de 6,2. Na nona batelada em que a mistura de solução de sacarose e massa celular pernoitou a 35°C, o pH diminuiu para 5,2. Entre a décima e décima sexta bateladas, o pH variou entre 5,8-5,9. Na décima sétima batelada em que a mistura de solução de sacarose e massa celular pernoitou a 35°C o pH diminuiu para 4,4. A partir da décima oitava batelada o pH permaneceu em torno de 5,2.

A massa celular úmida inicial do meio contendo água de maceração de milho foi de 7,32 g. Houve uma perda gradual e lenta da massa celular úmida ao longo das bateladas, sendo obtido 3,73 g de massa celular úmida após a vigésima batelada. Pode-se observar também que, houve um aumento das células viáveis de  $20,6 \times 10^5$  UFC/mL na primeira batelada para  $25,4 \times 10^5$  UFC/mL na terceira batelada. Posteriormente, houve queda acentuada das células viáveis obtendo-se  $2,03 \times 10^5$  UFC/mL após a vigésima batelada.

#### ***5.4.5. Estudo da vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 na produção de isomaltulose em processo em batelada***

A vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 durante a produção isomaltulose foi testada em condições otimizadas como descrito no item 4.5.6.

A Figura 39 mostra os valores de conversão de sacarose em isomaltulose após 15 e 25 minutos de reação e a sacarose residual em cada batelada. Foi observado que os maiores valores de conversão ocorreram após 15 minutos de reação, na primeira e na segunda batelada, obtendo-se 76,97% e 76,29% de isomaltulose, respectivamente. A partir da terceira batelada a incubação por 25 minutos permitiu a conversão de cerca de 70% de sacarose em isomaltulose.

A formação de isomaltulose permaneceu em torno de 70% até a décima sexta batelada, sofrendo uma queda brusca a partir da décima sétima batelada, quando se obteve conversões baixas de cerca de 2-3%. Foi verificado que toda a sacarose foi transformada nas oito primeiras bateladas, sendo que após a nona batelada a presença de sacarose aumentou gradativamente, até que na décima sétima batelada havia grande quantidade de sacarose residual devido à inativação da glicosiltransferase das células livres.

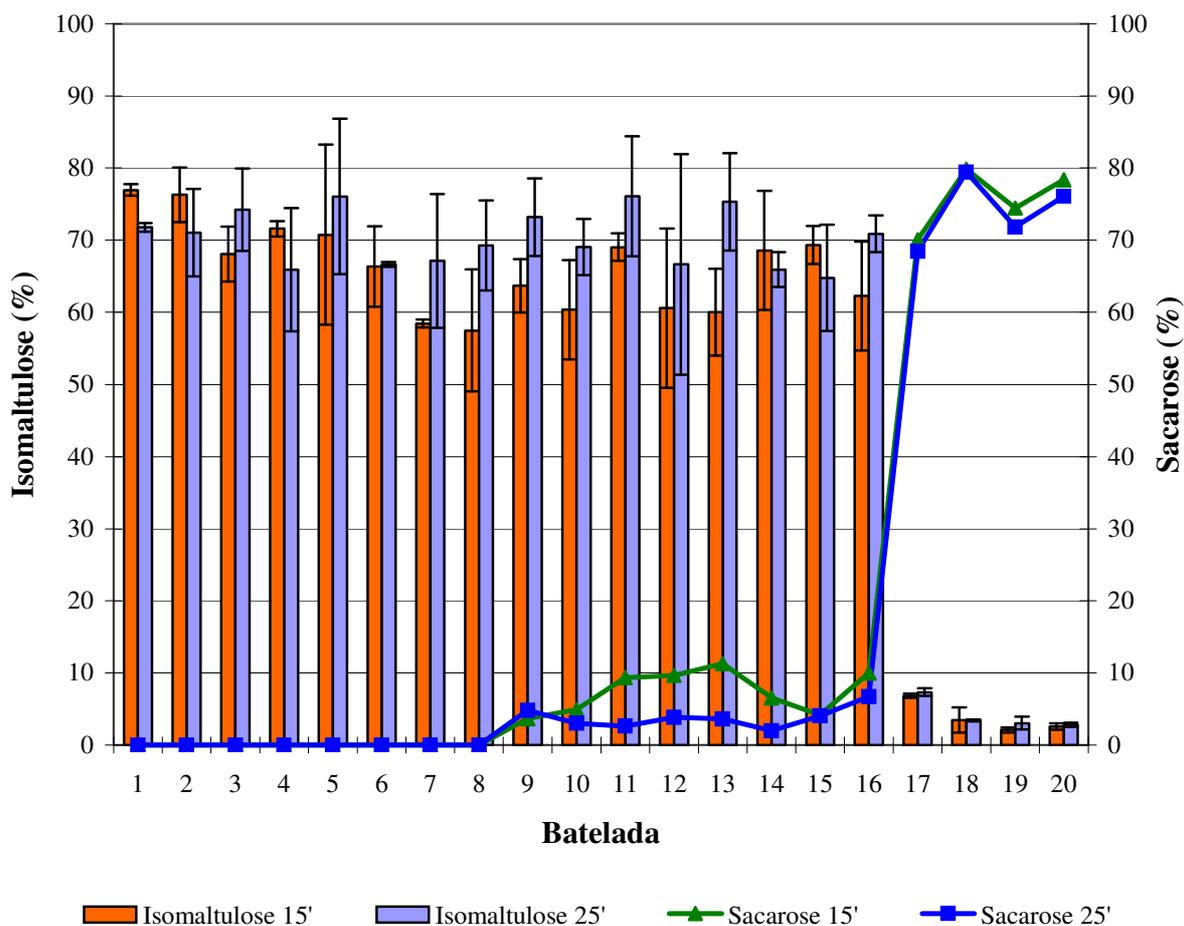


Figura 39: Estudo da vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 na produção de isomaltulose em processo em batelada.

A Figura 40 mostra a conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12, durante 20 bateladas consecutivas com tempo de incubação de 15 minutos.

Foram obtidos altos valores de conversão em isomaltulose em torno de 70% em todos os 20 ensaios realizados. Houve pouca formação de glicose e frutose com taxas inferiores a 3% e, excetuando-se o ensaio 1, não houve sacarose residual durante o processo. Pode-se observar que a queda de pH foi pequena durante o processo e que houve perda de massa celular durante o processo de centrifugação.



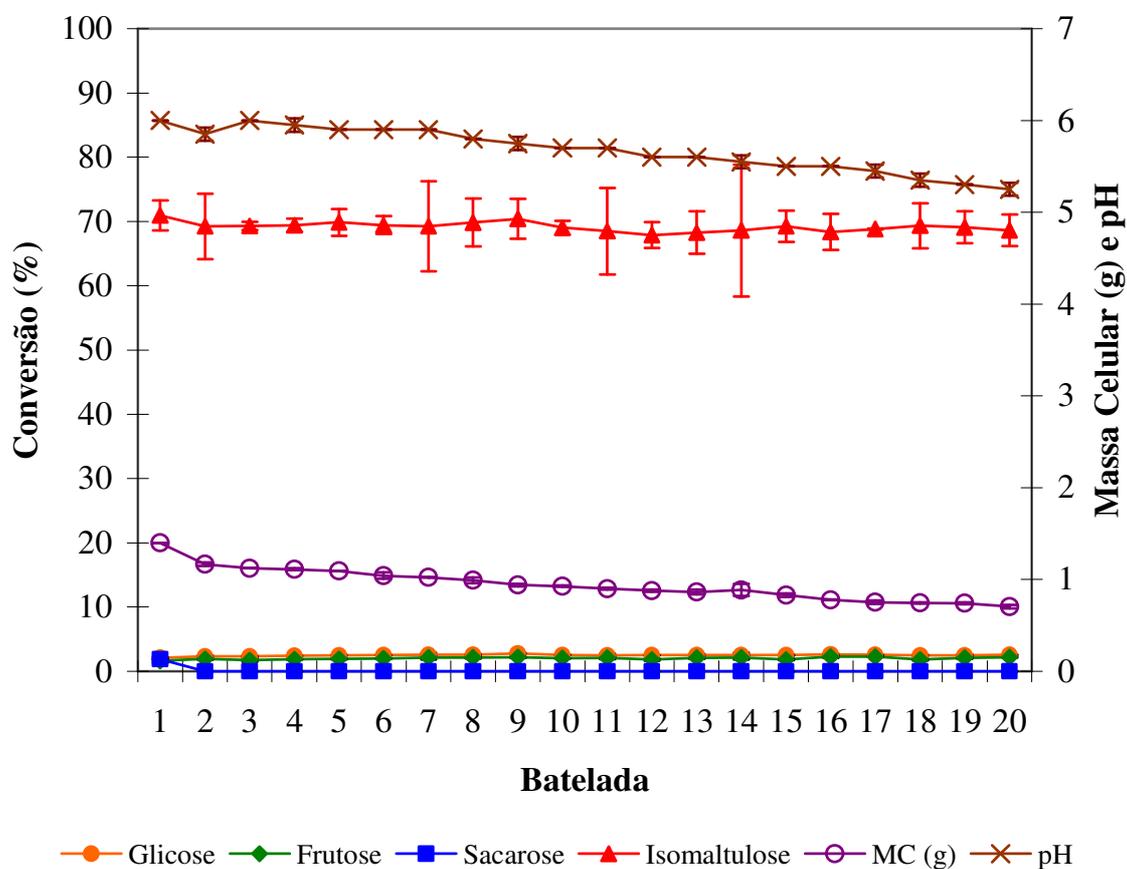


Figura 40: Estudo da vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12 na conversão de sacarose em isomaltulose em processo em batelada consecutiva sem pernoite.

As células mostraram grande estabilidade, reprodutibilidade e grande velocidade de transformação da sacarose em isomaltulose. A alta taxa de conversão de sacarose em isomaltulose foi mantida durante vinte bateladas. Não há descrição na literatura sobre o processo de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres em processo em batelada com reutilização da massa celular.



Krastanov e Yoshida (2003) descreveram uma cinética de conversão na qual 1 g de células úmidas de *Serratia plymuthica* ATCC15928 foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 50 mL, sob agitação, contendo 10 mL de solução de sacarose 40% em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 a 37°C. Praticamente toda a sacarose (99,82%) foi convertida em outros açúcares: 2,90% de glicose, 5,84% de frutose, 7,04% de trealulose, 1,30% de isomaltose, 79,95% de isomaltulose e 2,79% de outros açúcares. No entanto, foram necessárias 2 horas de incubação para a conversão completa da sacarose.

### **5.5. Produção de isomaltulose a partir de sacarose por células livres de *Erwinia* sp. D12 em escala piloto**

A produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12 em escala piloto, foi realizada como descrito no item 4.6. Foram feitas duas fermentações para a obtenção da massa celular e dois ensaios de produção de isomaltulose a partir de sacarose.

Na primeira fermentação foram obtidas cerca de 985 g de massa celular a partir de 60 litros de meio de cultivo otimizado contendo água de maceração de milho. A Tabela 31 mostra os valores de conversão de sacarose em isomaltulose e em outros açúcares. Pode-se observar que, nas cinco bateladas obtidas, houve alto rendimento de isomaltulose entre 58-70%. Para a recuperação da massa celular, a mistura de solução de açúcares e a massa celular foi centrifugada de 3-4 vezes, dependendo da aparência do material centrifugado. Houve perda de massa celular durante o processo devido a baixa eficiência da centrífuga contínua CEPA- LE, sendo que na quinta batelada a quantidade de massa celular foi de 340 g. Foram obtidas, após 5 bateladas, um total de 48,44 litros de xarope com alto teor de isomaltulose.

Foi realizada uma segunda fermentação em que foram obtidas 1.600 g de massa celular a partir de 60 litros de meio de cultivo contendo água de maceração de milho. A

massa celular foi utilizada três vezes para a conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, sendo obtidos 11 L, 30,25 L e 24,5 L de xarope com cerca de 58-61% de isomaltulose. Assim como na primeira fermentação, houve perda de massa celular durante as bateladas, sendo obtido 728 g após a centrifugação da terceira batelada.

O xarope de isomaltulose final (114,19 litros) apresentou 63,40% de isomaltulose, 0,65% de sacarose, 0,65% de glicose, 0,97% de frutose e 34,33% de outro açúcar (provavelmente trealulose). No final do processo de clarificação por ultrafiltração foram obtidos cerca de 100 litros de xarope de isomaltulose clarificado, sendo que parte da perda foi referente ao xarope retido ou volume morto, que é a quantidade mínima que ficou retida no sistema de ultrafiltração.

Tabela 30: Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12 em escala piloto em processo em batelada

Fermentação n <sup>o</sup>	Batelada n <sup>o</sup>	Volume (L)	Açúcares (%)				
			Isomaltulose	Sacarose	Glicose	Frutose	Outro
1	1	8,0	63,68	0,46	0,58	1,23	34,05
1	2	16,0	66,59	0,39	1,00	1,15	30,87
1	3	13,5	67,99	0,11	1,10	1,07	29,73
1	4	8,5	70,34	0,00	0,63	0,88	28,14
1	5	2,44	57,89	0,33	11,40	7,90	22,48
2	1	11,0	63,10	0,00	0,00	0,81	36,09
2	2	30,25	57,76	2,87	0,94	1,10	37,33
2	3	24,5	61,07	0,00	0,66	1,00	37,27
<b>Total</b>		114,19	63,40	0,65	0,65	0,97	34,33



## 5.6. Cristalização do Xarope

As etapas de clarificação, purificação do xarope e cristalização da isomaltulose foram realizadas como descrito no item 4.7. Os cristais de açúcar foram analisados e apresentaram 96,5% de isomaltulose (Figura 41). Este rendimento de isomaltulose foi obtido através de apenas um processo de cristalização, podendo ser obtido um produto mais puro se o mesmo fosse recristalizado. Cheetham (1987) obteve cristais contendo 99% de isomaltulose após dois processos de cristalização.



Figura 41: Cristais de isomaltulose obtidos após etapas de clarificação e purificação do xarope obtido a partir de sacarose e células livres de *Erwinia* sp. D12 em processo em batelada.



## 6. CONCLUSÕES

No estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se subproduto e resíduo agroindustrial para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12, o meio composto de melaço de cana-de-açúcar (150 g/L), água de maceração de milho (20 g/L), extrato de levedura comercial Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g/L) e pH ajustado a 7,5 apresentou, em frascos sob agitação a 200 rpm, máxima atividade de 12,4 UA de glicosiltransferase/mL de meio de cultivo, após 8 horas de fermentação a 30°C. Em fermentador de 6,6 litros a 200 rpm e aeração de 1 vvm, a máxima atividade obtida foi de 22,5 UA de glicosiltransferase/mL de meio de cultivo, após 8 horas de fermentação a 27°C, na fase exponencial de crescimento.

O melaço de cana-de-açúcar, a água de maceração de milho e o extrato de levedura Prodex Lac SD constituíram boas fontes de carbono e nitrogênio estimulando o incremento na atividade de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12., além de diminuir os custos de fermentação do microorganismo e, posteriormente, do processo de produção de isomaltulose.

No estudo do efeito e otimização dos aditivos polietilenoimina e glutaraldeído na imobilização de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 com alginato de cálcio, realizado através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, foi verificado que o tratamento dos grânulos de células íntegras imobilizadas com polietilenoimina não foi necessário; no entanto, o tratamento com 0,06% de glutaraldeído promoveu uma maior taxa de conversão, sendo obtido cerca de 72,3% de isomaltulose, após 12 horas de incubação dos grânulos em frascos sob agitação.

O tratamento das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio com solução 0,06% de glutaraldeído aumentou significativamente a estabilidade das colunas de leito empacotado, e mantiveram a conversão entre 55-65% por 256 horas

Não houve diferenças significativas entre a taxa de conversão e estabilidade das colunas contendo células imobilizadas e tratadas com solução 0,06% de glutaraldeído, obtidas através de meio de cultivo contendo peptona (meio de maior custo) e meio contendo água de maceração de milho (meio de menor custo). A conversão máxima de sacarose em isomaltulose foi de 59,7%, mantendo a produção estável, entre 50-60% por 10 dias.

Entre os diferentes tratamentos para preparação de células, células lisadas e extrato enzimático imobilizados em alginato de cálcio, os métodos que se mostraram mais eficientes, para a conversão de sacarose em isomaltulose, em processo em batelada, foram o extrato enzimático bruto imobilizado (EEI) que apresentou a maior estabilidade durante as cinco bateladas, em que foram obtidas taxas de conversão entre 59,7%-63,3%; e as células sonicadas imobilizadas (CSI), que apresentou taxa de conversão entre 47,6%-62,6%.

Em processo contínuo em colunas de leite empacotado, a coluna contendo CSI apresentou maior estabilidade e conseqüentemente maior produtividade em relação a coluna contendo EEI pois manteve a conversão por sete dias entre 53-59%, com queda lenta e gradual da conversão de sacarose em isomaltulose não ocorrendo mais a formação do produto após 21 dias. A coluna contendo EEI apresentou uma taxa de conversão (59,6%, 62,9% e 62,2%) apenas nos três primeiros dias.

As condições que favoreceram a conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em acetato de quitosana foram temperatura ao redor de 35°C, pH 6,0 e concentração de sacarose de 35%, obtendo-se 64,5% de isomaltulose. No entanto não foi possível realizar os estudos em coluna de leite empacotado devido à baixa resistência mecânica dos grânulos de quitosana.

A metodologia de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp. D12 mostrou um grande potencial, sendo obtida taxa de conversão superior à do método de imobilização de células com alginato de cálcio.

No estudo da influência do pH, da temperatura, da concentração do substrato sacarose e da concentração de massa celular na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando-se células livres, foi verificado que a conversão de sacarose em isomaltulose foi favorecida utilizando-se temperatura acima de 35°C, pH 6,0-7,0, 10% de massa celular e solução de sacarose entre 20-35%, obtendo-se taxas de conversão acima de 50%.

No estudo da vida útil das células livres de *Erwinia* sp. D12, em escala de bancada, foram obtidas altas taxas de conversão de sacarose em isomaltulose, em torno de 70%, por 20 bateladas consecutivas. Os ensaios realizados em escala piloto demonstraram a viabilidade da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres, em que foram obtidos cerca de 114 Litros de xarope com alto teor de isomaltulose (63,4%). Os cristais de isomaltulose, após clarificação e purificação do xarope convertido, apresentaram pureza de 96,5%.

## **7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho sugere-se: 1) Estudar outros suportes e técnicas de imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 para aumentar a estabilidade da conversão de sacarose em isomaltulose; 2) Aprofundar os estudos da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Erwinia* sp. D12, e 3) Otimizar o processo de purificação do xarope contendo isomaltulose e sua cristalização.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S.J.; YOO, J.H.; LEE, H.C.; KIM, S.Y.; NOH, B.S.; KIM, J.H.; LEE, J.K. Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapontici*. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1179-1183, 2003.
- BAHULEKAR, R.; AYYANGAR, N.R.; PONRATHNAM, S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p. 858-868, 1991.
- BOADI, D. K. & NEUFELD, R. J. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of the tea tannins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p.590-595, 2001
- BUCKE, C.; CHEETHAM, P.S.J. Fermentation production of isomaltulose. **US Patent** 4.670.387, 1982.
- CELESTINO, E.M. Produção, purificação e estudo das características bioquímicas de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12. Produção de isomaltulose a partir de sacarose. Campinas, 1998. 74p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CETINUS, S. A., ÖZTOP, H. N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p.889-894, 2003.
- CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p.259-262, 2002.
- CHEETHAM, P.S.J. Production of isomaltulose using immobilized microbial cells. **Methods in Enzymology**, v 136, p. 432-454, 1987.
- CHEETHAM, P.S.J.; GARRETT, C. e CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.471-481, 1985.
- CHEETHAM, P.S.J. The extration and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. **Biochemical Journal**, v.220, p.213-220, 1984.

- CHEETHAM, P.S.J.; IMBER, C.E. e ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, v.299, p.628-631, 1982.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Immobilised aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. **Applied Microbiology**. v. 27, p.878-885, 1974.
- DEGELMANN, H.; KOWALCZYK, J.; KUNZ, M.; SCHUTTNHELM, M. Process for the hydrogenation of sugars. **US Patent** 6.103.894, 15, 2000.
- DUFLOT, P; FOUACHE, C. Method for producing palatinitol. **US Patent**, 6.204.378, 2001.
- ERTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.
- GODSHALL, M.A. How carbohydrates influence food flavors. **Food Technology**, v.51, n.1, p.63-66, 1997.
- GOLDSCHER, R.L. Process for the manufacture of isomaltitol. **US Patent** 5.679.78121, 1997.
- GRENBY, T.H. Nutritive Sucrose Substitutes and Dental Health. Editores GRENBY,T.H.; PARKER, K.J.; LINDLEY, M.G. **Developments in Sweeteners**, v.2, p.51-88. 1983.
- HAMADA, S. Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries. **Pure and Applied. Chemistry**, v.74, n.7, p.1293-1300, 2002.
- HASHIMOTO, H.; YAMADA, K. e YOSHIMURA, J. Glucosylation of methyl  $\beta$ -D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, v.9, n.12, p.849-854, 1987.
- HAVENAAR, R. Dental advantages of some bulk sweeteners in laboratory animal trials.Editor GREENBY, T.H. **Developments in Sweeteners**, v. 3, p.189-211, 1987.
- HEIKKILA, H.; SARKKI, M.; LINDROOS, M.; OJALA, P.; RAVANKO, V.; TYLLI, M. Process of the production of isomaltulose and other products. **US Patent** 6.146.856, 2000.
- [http://www.conab.gov.br/download/safra/Primeiro\\_Levantamento\\_Cana\\_2006-07\\_maio06.pdf](http://www.conab.gov.br/download/safra/Primeiro_Levantamento_Cana_2006-07_maio06.pdf)  
(capturado no dia 05 de agosto de 2006).

- HUANG, J.H.; HSU, L.H. e SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1998.
- HULST, A.C.; TRAMPER, J. Immobilized plant cells: a literature survey. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p.546-558, 1989.
- IRWIN, W.E. Isomalt- a sweet, reduced-calorie bulking agent. **Food Technology**, v.44, p.128, 1990.
- IRWIN, W.E.; STRÄTER, P.J. Isomaltulose. Editores NABORS, L. O; GELARDI, R.C. **Alternative Sweeteners**, p. 299-307. 1991.
- JONKER, D.; LINA, B.A.R. ; KOZIANOWSKI, G. Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose<sup>®</sup>) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, n.10, p.1383-1389, 2002.
- KAKINUMA, H.; YUASA, H. e HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of alpha-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydrate Research**, v.312, p.103-115, 1998.
- KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells-engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p.1321-1354, 1985.
- KASHIMURA, J.; KIMURA, M. e ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.42, p.69-76, 1996.
- KAWAGUTI, H.Y.; MANRICH, E.; SATO, H.H. Production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. using experimental design and response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, n.3, p.227-234, 2005.
- KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M.F.; ORSI, D.C. SUZUKI, G.T.; SATO, H.H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. **Process Biochemistry**, v.41, n.9, p.2035-2040, 2006a.

- KAWAGUTI, H.Y.; MANRICH, E.; SATO, H.H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v.29, p.270-277, 2006b.
- KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M. F.; SATO, H.H. Isomaltulose production using free cells: optimization of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, (NO PRELO), 2007.
- KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose to isomaltulose using free *Erwinia* sp. cells. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.5, p.483-4932, 2006.
- KAWAI, K.; OKUDA, Y. e YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinology Japonica*, v.32, n.6, p.933-936, 1985.
- KAWAI, K.; YOSHIKAWA, H.; MURAYAMA, Y.; OKUDA, Y. e YAMASHITA, K. Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. **Hormone and Metabolic Research**, v.21, p.338-340, 1989.
- KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 86-91, 1983.
- KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p.377-397, 2004.
- KRASTANOV, A.; BLAZHEVA, D.; YANAKIEVA, I, A; KRATCHANOVA, M. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, n.39, p.1306-1312, 2006.
- KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.593-598, 2003.
- LANTERO, O.J. Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*. **US Patent** 82109404.2, 1983.

- LI, X.; ZHANG, D.; CHEN, F.; MA, J.; DONG, Y.; ZHANG, L. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2131-2136, 2004.
- LI, X.; ZHAO, C.; NA, Q. ZHANG, D. Substrate induction isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX 3. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.3, p.521, 2003.
- LICHTENTHALER, F.W.; MONDEL, S. Perspectives in the use of low molecular weight carbohydrates as organic raw materials. **Pure & Applied Chemistry**, v.89, n.9, p.1853-1997, 1997.
- LICHTENTHALER, F.W.; PETERS, S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. **Comptes Rendus Chimie**, v.7, p.65-90, 2004.
- LINA, B.A.R.; SMITS-VAN PROOIJJE, A.E. e WAALKENS-BERENDSEN, D.H. Embryotoxicity/ teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Zeist, v.35, out., 1997.
- LINA, B.A.R.; JONKER, D.; KOZIANOWSKI, G. Isomaltulose (Palatinose<sup>®</sup>): A review of biological and toxicological studies. **Food and Chemistry Toxicology**, v.40, n.10., p.1375-1381, 2002.
- LINKE, H.A.B. Sweeteners and Dental Health: the Influence of sugar substitutes on oral microorganisms. Editor GREENBY, T.H. **Developments in Sweeteners**, v.3, p.151-188, 1987
- LOO, J.V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T.V. e HEUVEL, E.V.D. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII-CT94-1095). **British Journal of Nutrition**, v.81, p.121-132, 1999.
- LUND, B.M. e WYATT, G.M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. atroseptica. **Journal of General Microbiology**, v.78, p.330-336, 1973.

- MAKI, Y.; OHTA, K.; TAKAZOE, Y.; MATSUKUBO, Y.; TAKAESU, Y.; TOPITSOGLU, V.; FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspensions of human dental plaque. **Caries Research**, v.17, p.335-339, 1983.
- MCALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E. e FOGARTY, W.M. The isomaltulose synthesing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v.12, n.9, p.667-672, 1990.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-749, 1938.
- MORAES, A.L.L. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp. D12 imobilizada em alginato de cálcio. Campinas, 2002. 95p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MORAES, A.L.L.; STECKELBERG, C.; SATO, H.H.; PINHEIRO, A. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.95-102, 2005.
- MOYNIHAN, P.J. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. **Journal of Dentistry**, v.26, n.3, p.209-218, 1998.
- NAGAI, Y.; SUGITANI, T. e TSUYUKI, K.I. Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.58, n.10, p.1789-1793, 1994.
- NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure Applied Chemistry**, v.74, n.7, p.1245-1251, 2002.
- NDINDAYINO, F.; HENRIST, D.; KIEKENS, F.; VERVAET, C. e REMON, J. P. Characterization and evaluation of isomalt performance in direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, v.189, p.113-124, 1999.
- OGBONNA, J.C.; AMANO, Y.; NAKAMURA, K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n.2, p. 92-96, 1989.

- OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N. e HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, v.39, n.1, p.43-49, 1983.
- PARK, J.K. e CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-319, 2000.
- PARK, Y.K.; UEKANE, R.T. e PUPIN, A.M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v.14, n.37, p.547-551, 1992.
- PARK, Y.K.; UEKANE, R.T. e SATO, H.H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista de Microbiologia**, v.27, . p.131-136, 1996.
- SARKKI, M.L.; HEIKKILA, H.; VILJAVA, T. Immobilization of microorganisms on weakly basic anion exchange substance for producing isomaltulose. **US Patent** 5.939.294, 1999.
- SASAKI, N.; TOPITSOGLU, V.; TAKAZOE, I. e FROSTELL, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E- 49. **Sweden Dental Journal**, v.9, p.149-155, 1985.
- SCHIWECK, H., STEINLE, G., MULLER, L., GAU, W., MUNIR, M. Glucopyranosido-1,6-mannitol, a process for producing the same and its use as a sugar substitute. **US Patent** 4.233.439, 1980.
- SCOTT, C.D. Immobilized cells: a review of recent literature. **Enzyme and microbial technology**, v. 9, p. 66-73, 1987.
- SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Method of producing an immobilized alpha-glucosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. **GB Patent** 2.082.591, 1982.
- SIDDIQUI, I.R.; FURGALA, B. Isolation and characterization of oligosaccharides from honey. Part I disaccharides. **Jounal of Agricultural Research**, v. 6, p. 139-145, 1967.
- SNODIN, D.J.; DANIEL, J.W. The toxicology and safety evaluation of non-nutritive sweeteners. Editores GRENBY, T.H.; PARKER, K.J.; LINDLEY, M.G. **Developments in Sweeteners**, v. 2, p.157-179, 1983

- STRÄTER, P.J. Palatinin-Technological and processing characteristics. Editores LYN O'BRIEN NABORS AND ROBERT C. GEKARDI. **Alternative Sweeteners**, p.217-245, 1985.
- TAKAZOE, I. New trends on sweeteners in Japan. **International Dental Journal**, v.35, n.1, p.58-65, 1985.
- TAKAZOE, I.; FROSTELL, G.; OHTA, K.; TOPITSOGLU, V. e SASAKI, N. Palatinose-a sucrose substitute. **Sweden Dental Journal**, v.9, p.81-87, 1985a.
- TAKAZOE, I.; OHTA, K.; SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; IWAKURA, T.; NAKAJIMA, Y. Low-cariogenic sweeteners. **US Patent** 4.556.429, 1985b.
- TAKAZOE, I. Palatinose- An Isomeric Alternative to Sucrose. Editores GRENBY, T. H. **Progress in Sweeteners**, p.143-167, 1989
- TOPITSOGLU, V.; SASAKI, N.; FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. *Caries Research*, Huddinge, v.18, p.47-51, 1984.
- TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trealulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal General Applied Microbiology**, v.38, p.483-490, 1992.
- UEKANE, R. T. Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. e produção de isomaltulose a partir de sacarose. Campinas, 1993. 63p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- VÉRONÈSE, T.; PERLOT, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.263-269, 1999.
- VÉRONÈSE, T.; PERLOT, P. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. **FEBS Letters**, v.441, p.348-352, 1998
- VORLOP, K. D.; KLEIN, J. New developments in the field of cell immobilization- Formation of biocatalysts by ionotropic gelation. LAFFERTY, R.M. editores, **Enzyme technology**, Springer, p.219-235, 1983.

- WALSH, P.K.; MALONE, D.M. Cell growth patterns in immobilization matrices. **Biotechnology Advances**, v.13, p.13-43, 1995.
- WEIDENHAGEN, R.; LORENZ, S. Palatinose [6-( $\alpha$ -glucopyranosidio)-fructofuranose], ein neues bakterielles Umwandlungsprodukt der saccharose. **Zeitschrift für die Zuckerindustrie**, v. 82, n. 7, 533-534, 1957.
- WILLIBALD-ETTLE, I.; SCHIWECK, H. M. Editor Grenby, T. H. **Advances in sweeteners**, p.134-149, 1996
- WU, L; BIRCH, R.G. Characterization of the highly efficiente sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.13, p. 1581-1590, 2005.
- WU, L; BIRCH, R.G.. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficiente sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p. 93-103, 2004.
- ZIESENITZ, S. C. Editor Grenby, T. H. **Advances in sweeteners**, p.109-133, 1996.

## 9. ANEXO- Artigos Publicados e No Prelo

- KAWAGUTI, H. Y., MANRICH, E., FLEURI, L. F., SATO, H H. Production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. using experimental design and response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.227-234, 2005.....212
- KAWAGUTI, H.Y., MANRICH, E., SATO, H.H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v.29, p.270-277, 2006.....224
- KAWAGUTI, H.Y., MANRICH, E., SATO, H.H. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia* sp. cells. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.3, p.482-493, 2006.....236
- KAWAGUTI, H.Y., BUZZATTO, M.F., ORSI, D.C., SUZUKI, G.T., SATO, H.H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. **Process Biochemistry**, v.41, p.2035-2040, 2006.....252
- KAWAGUTI, H.Y., SATO, H.H. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. **Process Biochemistry**, (NO PRELO) 2006.....262
- KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M. F.; SATO, H.H. Isomaltulose production using free cells: optimization of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, (NO PRELO), 2007.....274

## PRODUCTION OF GLUCOSYLTRANSFERASE BY *ERWINIA* SP. USING EXPERIMENTAL DESIGN AND RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Haroldo Yukio Kawaguti\*; Eiric Manrich; Luciana Francisco Fleuri; Hélia Harumi Sato

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Submitted: November 03, 2003; Returned to authors for corrections: July 25, 2005; Approved: September 20, 2005

### ABSTRACT

Glucosyltransferase produced by strain *Erwinia* sp. is an intracellular enzyme that catalyzes the formation of isomaltulose from sucrose. Isomaltulose is a non-cariogenic reducing disaccharide commercially used in foods. Response surface methodology and  $2^3$ -factorial central composite design were employed to optimize a fermentation medium for the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. in shaken flasks at 200 rpm and 30°C. The three variables involved in this study were sugar cane molasses (SCM), corn steep liquor (CSL) and yeast extract Prodex Lac SD (YEP). The statistical analysis of the results showed that, in the range studied, all the factors had a significant effect on glucosyltransferase production and the optimum medium composition for enzyme production was (in g l<sup>-1</sup>) SCM-100, CSL-60 and YEP-8, which lead to a glucosyltransferase activity of 6.65 U mL<sup>-1</sup>.

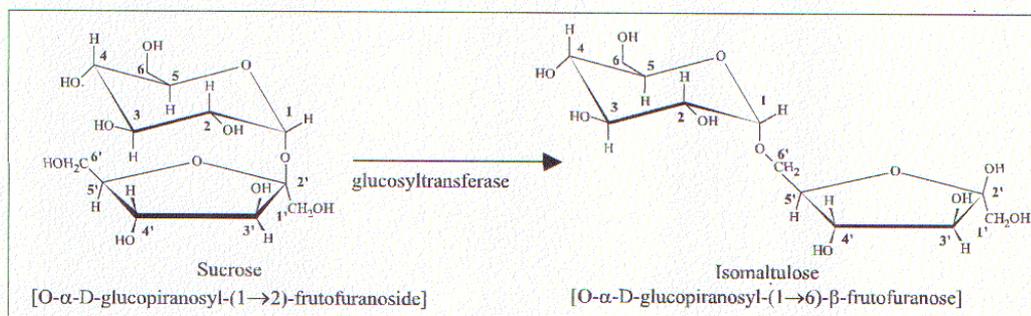
**Key words:** glucosyltransferase, isomaltulose, optimization, response surface

### INTRODUCTION

Isomaltulose [O- $\alpha$ -D-glucopiranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-fructofuranose] is a reducing disaccharide commercially obtained by the enzymatic conversion from sucrose catalyzed by a microbial glucosyltransferase as shown in Fig. 1. Several microorganisms including *Protaminobacter rubrum* (2), *Erwinia rhapontici* (1), *Klebsiella planticola* (4), can convert sucrose into isomaltulose. The interest on isomaltulose is due to the non-cariogenic property, low hydrolysis speed and formation of monosaccharides in the organism. Moreover, another important characteristic of this disaccharide is the possibility of converting this sugar to a sugar-alcohol mixture with low caloric value and non-cariogenic property known as Isomalt® or Palatinit®. Isomaltulose is naturally present in small quantities in honey and sugar cane extract (4,14,17). The low cariogenicity and the inhibitory action of insoluble polyglucan synthesis from isomaltulose were demonstrated in experimental studies with

rats (12,13) and in human studies (18). Isomaltulose presents about 50% the sweetness of sucrose (2,4,14,17) and similar physical and organoleptic properties (1,4,16). When used as sucrose substitute in candies and chocolates differences in the sweetness have not been noticed (16). In the organism, isomaltulose is hydrolysed by isomaltase and absorbed as glucose and fructose (17). However, the hydrolysis velocity and the absorption are lower when isomaltulose is used instead of sucrose. Isomaltulose has been recommended as potential parenteral nutrient for diabetics and non-diabetics (5,6,16). In experimental studies with rats, isomaltulose did not show teratogenic and mutagenic effects or any type of toxicity, being safety for the use in foods (7,16). The application of experimental design and response surface methodology in fermentations process can result in improved product yields, reduced process variability and development time and over all costs (12). In this work, the effect of both nitrogen source (corn steep liquor and yeast extract) and carbon source concentrations (sugar cane

\*Corresponding Author. Mailing address: Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Av. Monteiro Lobato 80, C.P.6121. 13083-862, Campinas, SP, Brasil. Tel.: (+5519) 3788-2175. Fax.: (+5519) 3788-2153. E-mail address: kawaguti@fea.unicamp.br



**Figure 1.** Conversion of sucrose into isomaltulose by glucosyltransferase.

molasses) on glucosyltransferase production by *Erwinia* sp. was studied at 30°C and the optimal conditions for enzyme production were determined.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganism and culture maintenance

The strain *Erwinia* sp. D12 producer of glucosyltransferase is able to convert sucrose into isomaltulose and it has been isolated in the Laboratory of Food Biochemistry, of the College Food Engineering/UNICAMP. The strain *Erwinia* sp. D12 was maintained on agar slants composed of 6% (w/v) sucrose, 4% (w/v) peptone, 0.4% (w/v) beef extract and 2% (w/v) agar and it was stored at 5°C.

### Culture medium optimization using Experimental Design and Response Surface Methodology

The *in vitro* study for culture medium optimization (in shaken flasks) was carried out using experimental design and response surface methodology (RSM). Three  $2^3$ -factorial central composite design ( $2^3$ -FCCD) was used with a combination of the concentration levels of the independent variables. All data were treated with the aid of STATISTICA® 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). The FCCD for  $k$  factors, codified as  $x_1, \dots, x_k$ , was composed of three parts: factorial (or cubical), containing a total of  $n_{fact}$  points of coordinates  $x_i = -1$  or  $x_i = +1$ , for all  $i = 1, \dots, k$ ; axial (or in star), formed by  $n_{ax} = 2k$  points with all the null coordinates except one, which is equal to a certain value  $\alpha$  (ou  $-\alpha$ ), where  $\alpha = n_{fact}^{1/4}$ ; and a total of  $n_{centr}$  assays carried out at the central point, where  $x_1 = \dots = x_k = 0$ . Central points provide additional degrees of freedom for error estimation, which increases power when testing the significance of effects and the  $\alpha$  value is the distance of the axial points. The dependent variables  $X_i$  were codified according to the following equation:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta x_i, \quad i = 1, 2, 3, \dots, k \quad (1)$$

where  $X_0$  corresponds to the value of the central point;  $x_i$  is the non-dimensional value of the independent variable;  $X_i$  corresponds to the real value of the independent variable;  $X_0$  is the real value of the independent variable at the central point; and  $\Delta x_i$  is the variation of the real value of the variable  $i$ , corresponding to the variation of a unit for the non-dimensional value of the variable  $i$ . The complete quadratic model for the  $k$  factors is given by the following equation:

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

where the values for  $\beta$  are estimated from the polynomial coefficients and the  $X_i$  values represent the codified values. The three  $2^3$ -FCCD included 8 factorial points, with six axial points ( $\alpha$ ) and three replicates at the central point resulting in a total of 17 assays per experiment. The three FCCD are shown in Tables 1, 2 and 3 and they were used to study the effect of the following components: sugar cane molasses (Companhia Energética Santa Elise), corn steep liquor (Corn Products Brasil) and yeast extract Prodex Lac SD® (Prodesa produtos especiais para alimentos S.A.) in the production of glucosyltransferase by strain *Erwinia* sp. D12 so that both the maximum enzymatic activity and reduced costs for the fermentation process could be aimed.

### Inoculum and fermentation conditions

The strain was grown in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 ml of a seed culture medium according to  $2^3$ -FCCD (Tables 1, 2 and 3), for 15 h at 30°C in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., U.S.A.). An aliquot of 5 mL of the seed culture was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 45 mL of the former medium and incubated at 30°C for 8 h,



**Table 1.** Coded levels and real values (in parentheses) for the first factorial design (17 trials) and glucosyltransferase activity (U mL<sup>-1</sup>).

Assay	Variable (g L <sup>-1</sup> )			Enzyme activity (U mL <sup>-1</sup> )
	SCM	CSL	YEP	
1	-1 (70.24)	-1 (42.14)	-1 (7.23)	3.50
2	+1 (129.76)	-1 (42.14)	-1 (7.23)	4.46
3	-1 (70.24)	+1 (77.86)	-1 (7.23)	3.67
4	+1 (129.76)	+1 (77.86)	-1 (7.23)	5.28
5	-1 (70.24)	-1 (42.14)	+1 (16.77)	3.49
6	+1 (129.76)	-1 (42.14)	+1 (16.77)	5.32
7	-1 (70.24)	+1 (77.86)	+1 (16.77)	3.78
8	+1 (129.76)	+1 (77.86)	+1 (16.77)	0.53
9	-1.68 (50)	0 (60)	0 (12)	3.27
10	+1.68 (150)	0 (60)	0 (12)	1.43
11	0 (100)	-1.68 (30)	0 (12)	4.92
12	0 (100)	+1.68 (90)	0 (12)	3.19
13	0 (100)	0 (60)	-1.68 (4)	5.73
14	0 (100)	0 (60)	+1.68 (20)	5.73
15	0 (100)	0 (60)	0 (12)	4.97
16	0 (100)	0 (60)	0 (12)	5.10
17	0 (100)	0 (60)	0 (12)	5.40

**Table 2.** Coded levels and real values (in parentheses) for the second factorial design (17 trials) and glucosyltransferase activity (U mL<sup>-1</sup>).

Assay	Variable (g L <sup>-1</sup> )			Enzyme activity (U mL <sup>-1</sup> )
	SCM	CSL	YEP	
1	-1 (97.74)	-1 (72.14)	-1 (2.02)	2.94
2	+1 (32.26)	-1 (72.14)	-1 (2.02)	5.25
3	-1 (97.74)	+1 (107.86)	-1 (2.02)	2.94
4	+1 (32.26)	+1 (107.86)	-1 (2.02)	3.31
5	-1 (97.74)	-1 (72.14)	+1 (7.98)	3.38
6	+1 (32.26)	-1 (72.14)	+1 (7.98)	6.37
7	-1 (97.74)	+1 (107.86)	+1 (7.98)	4.21
8	+1 (32.26)	+1 (107.86)	+1 (7.98)	4.45
9	-1.68 (10)	0 (90)	0 (5)	2.64
10	+1.68 (120)	0 (90)	0 (5)	4.89
11	0 (65)	-1.68 (60)	0 (5)	4.71
12	0 (65)	+1.68 (120)	0 (5)	3.90
13	0 (65)	0 (90)	-1.68 (0)	4.93
14	0 (65)	0 (90)	+1.68 (10)	4.19
15	0 (65)	0 (90)	0 (5)	4.33
16	0 (65)	0 (90)	0 (5)	4.21

**Table 3.** Coded levels and real values (in parentheses) for the third factorial design (17 trials) and glucosyltransferase activity (U mL<sup>-1</sup>).

Assay	Variable (g L <sup>-1</sup> )			Enzyme activity (U mL <sup>-1</sup> )
	SCM	CSL	YEP	
1	-1 (70.24)	-1 (36.19)	-1 (4.43)	4.26
2	+1 (129.76)	-1 (36.19)	-1 (4.43)	5.42
3	-1 (70.24)	+1 (83.81)	-1 (4.43)	4.12
4	+1 (129.76)	+1 (83.81)	-1 (4.43)	5.35
5	-1 (70.24)	-1 (36.19)	+1 (11.57)	4.52
6	+1 (129.76)	-1 (36.19)	+1 (11.57)	5.89
7	-1 (70.24)	+1 (83.81)	+1 (11.57)	5.63
8	+1 (129.76)	+1 (83.81)	+1 (11.57)	7.20
9	-1.68 (50)	0 (60)	0 (8)	4.85
10	+1.68 (150)	0 (60)	0 (8)	6.42
11	0 (100)	-1.68 (20)	0 (8)	5.77
12	0 (100)	+1.68 (1000)	0 (8)	6.27
13	0 (100)	0 (60)	-1.68 (2)	6.53
14	0 (100)	0 (60)	+1.68 (14)	6.04
15	0 (100)	0 (60)	0 (8)	6.30
16	0 (100)	0 (60)	0 (8)	6.69
17	0 (100)	0 (60)	0 (8)	6.95

shaken at 200 rpm. The culture broth was centrifuged at 10,070 x g for 15 min at 5°C, and the precipitated cell mass was used for the determination of glucosyltransferase activity. For the extraction of intracellular enzyme, the cell mass was washed twice with distilled water and then suspended in 50 mL citrate-phosphate buffer 0.05 M, pH 6.0. The cell suspension was cooled to 5°C and disrupted by ultrasonic vibration Labline Ultra-Tip (Labline Instruments, Inc., Illinois, USA). After cell wall disruption, the samples were centrifuged at 12,300 x g for 15 min at 5°C. The enzyme activity of the supernatant was determined.

#### Glucosyltransferase activity

The glucosyltransferase activity was performed by the increase of the reducing power from a solution containing sucrose, described by Park (11) with modifications. A mixture of 450 µL of a 4.0% (w/v) sucrose solution in 0.05 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0 and 50 µL of enzyme solution was incubated for 20 min. at 35°C. Reducing sugars were measured by the Somogyi method (15) using glucose as standard. One activity unit (U) of glucosyltransferase is defined as the amount of enzyme that liberates one mmol of reducing sugars (isomaltulose) minute<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> of the enzyme from sucrose under standard assay conditions.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### First Experimental Design

The experimental conditions and the results for glucosyltransferase activity to the first 2<sup>3</sup>-FCCD are shown in Table 1. The effect estimates for the first 2<sup>3</sup>-FCCD for each variable, sugar cane molasses (SCM), corn steep liquor (CSL) and yeast extract Prodex Lac SD® (YEP) were determined and reported in Table 4. An estimation of a main effect is obtained by evaluating in the difference in process performance caused by a change from the low (-1) to the high (+1) level of the corresponding factor. In this case, the process performance was measured by the glucosyltransferase activity response. In addition, both the t-test and p-value statistical parameters were used to confirm the significance of factors studied. The t-value that measure how large the coefficient is in relation to its standard error was obtained by dividing each coefficient by its standard error. The p-value is the chance of getting a larger t-value (in absolute value) by chance by itself. A small p-value suggested that the coefficient was a large signal in comparison to the noise

1. The independent and the dependent variables were fitted to the second-order model equation. They were examined in terms of the goodness of fit. Furthermore, the analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the adequacy of the fitted model. The R-square (correlation coefficient) value provides a measure of how much of the variability in the observed response values could be explained by the experimental factors and their interactions. A good model explains most of the variations in the response. The closer the R-square value is to 1.0, the stronger the model and the better are the response predictions. On the basis of the ANOVA, as shown in Table 5, a second order model (Equation 3) was established, describing the enzyme activity as a function of SCM, CSL and YEP concentrations. The pure error was very low, indicating a good reproducibility of the experimental data. Based on the F test, the model is predictive, since its calculated F value is higher than the critical F value and the regression coefficient is close to unity. The coded model was used to generate response surfaces and contour curves (Figs. 2 and 3) for the analysis of the variable effects on glucosyltransferase activity:

**Table 4.** Main effects and interactions analysis for glucosyltransferase activity from the first and second factorial design.

First factorial design					Second factorial design				
Factor	Effect	Std. Err.	t-value	p-value	Factor	Effect	Std. Err.	t-value	p-value*
(1)SCM(L)	-0.29	0.12	-2.39	0.1390	(1)SCM(L)	1.418	0.045	31.195	0.0204*
SCM(Q)	-2.09	0.13	-15.80	0.0040*	SCM(Q)	-0.409	0.055	-7.395	0.0856
(2)CSL(L)	-0.94	0.12	-7.84	0.0159*	(2)CSL(L)	-0.647	0.045	-14.223	0.0447*
CSL(Q)	-0.88	0.13	-6.66	0.0218*	CSL(Q)	-0.024	0.055	-0.437	0.7379
(3)YEP(L)	-0.56	0.12	-4.65	0.0432*	(3)YEP(L)	0.401	0.045	8.817	0.0719
YEP(Q)	0.31	0.13	2.31	0.1466	YEP(Q)	0.160	0.055	2.894	0.2118
(1)x(2)	-1.11	0.16	-7.06	0.0195*	(1)x(2)	-1.172	0.059	-19.743	0.0322*
(1)x(3)	-1.00	0.16	-6.37	0.0238*	(1)x(3)	0.141	0.059	2.374	0.2538
(2)x(3)	-1.37	0.16	-8.77	0.0128*	(2)x(3)	0.209	0.059	3.523	0.1761

(L): linear factor; (Q): quadratic factor; \*Significant factors ( $p \leq 0.05$ ).

because it was too large to have arisen by chance by itself. In this case,  $p \leq 0.05$  suggested significance at the 0.05 level. This also corresponded to a 95% of confidence level for test of the hypothesis that the effects (or coefficients) in this situation were equal to zero. Small p-values were associated with larger t-value seeing that they imply that the effects (or coefficients) were too much greater than its standard error. It can be seen that all variables and the interactions between the three factors concerning the glucosyltransferase activity were statistically significant.

The variable SCM (Q) showed the highest effect in glucosyltransferase activity. An increase in SCM concentration resulted in a negative influence. A fitting model was accomplished for the first experimental design as shown in Table

**Table 5.** ANOVA for the first factorial design.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	29.78	6	4.96	9.78 <sup>a</sup>
Residual	5.07	10	0.51	
Lack of fit	4.98	8	0.62	12.40 <sup>b</sup>
Pure error	0.10	2	0.05	
Total	34.85	16		

Correlation coefficient:  $R^2=0.80$ ;  $F_{0.95,6,10}=3.22$ ;  $F_{0.95,8,2}=19.37$ ; <sup>a</sup>F-ratio (regression/residual); <sup>b</sup>F-ratio (lack of fit/pure error).

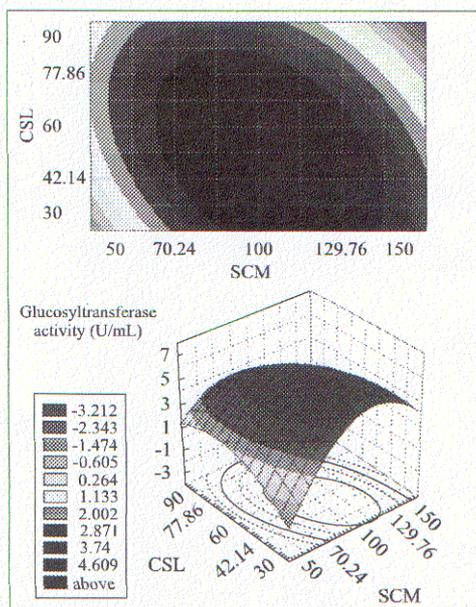


Figure 2. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of CSL and SCM concentrations, according to the first experimental design.

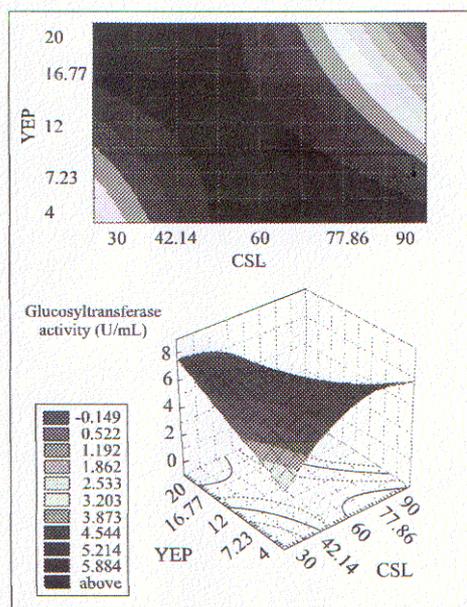


Figure 3. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of YEP and CSL concentrations, according to the first experimental design.

$$y = 5.17 - 1.04x_1^2 - 0.47x_2 - 0.44x_2^2 - 0.28x_3 - 0.55x_1x_2 - 0.50x_1x_3 - 0.68x_2x_3 \quad (3)$$

where  $y$  is the predicted response and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  are the coded values of sugar cane molasses, corn steep liquor and yeast extract Prodex Lac SD®, respectively. As can be seen in Figs. 2 and 3, the best SCM concentration is between 70 and 130 g L<sup>-1</sup>. Not only an increase in CSL but also a decrease in YEP concentrations led to an increase in glucosyltransferase activity. In a subsequent experimental design, higher concentrations of CSL and lower concentrations of SCM and YEP were chosen to produce maximum enzyme activity.

#### Second Experimental Design

The assays and the results for the second 2<sup>3</sup>-FCCD are shown in Table 2. The effect estimates were determined being reported in Table 3. The analysis of the effects shows that the SCM (L) is the most important variable, since an increase in the concentration of this variable from 10 to 120 g L<sup>-1</sup> led to an

increase in glucosyltransferase activity. However, the variable CSL had a negative influence in the enzyme activity. In other words, the increase of this variable from 60 to 120 g L<sup>-1</sup> led to a decreased in the enzyme activity. The increase in YEP concentration from 0 to 10 g L<sup>-1</sup> did not show significant influence in glucosyltransferase activity ( $p \leq 0.05$ ), while its interaction with CSL was statistically significant for the enzyme activity. In the third experimental design, the SCM and YEP concentration ranges were increased and, in the case of CSL, it decreased. On the basis of the ANOVA, shown in Table 6, a second order coded model (Equation 4) was established, describing the glucosyltransferase activity as a function of SCM, CSL and YEP concentrations:

$$y = 4.28 - 0.71x_1 - 0.32x_2 - 0.59x_1x_2 \quad (4)$$

where  $y$  is the predicted response and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  are the coded values of sugar cane molasses, corn steep liquor and yeast extract Prodex Lac SD®, respectively. Based on the F



**Table 6.** ANOVA for the second factorial design.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	11.04	2	5.52	21.89 <sup>a</sup>
Residual	3.28	13	0.25	
Lack of fit	3.28	12	0.27	27.00 <sup>b</sup>
Pure error	0.00	1	0.01	
Total	14.31	15		

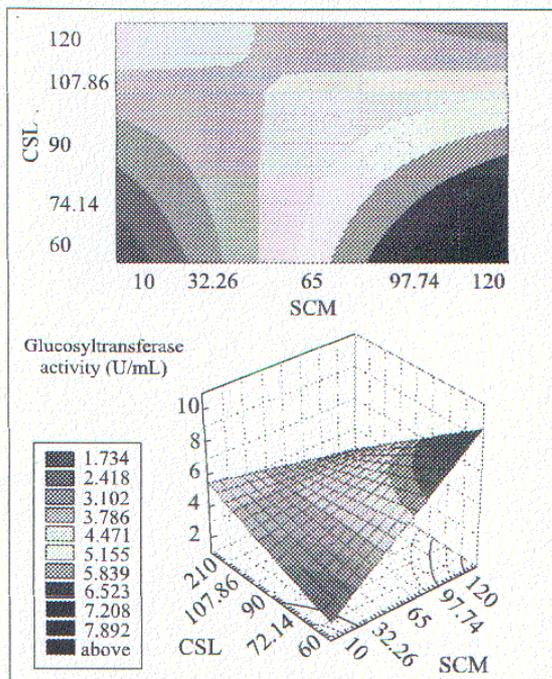
Correlation coefficient:  $R^2=0.77$ ;  $F_{0.95,2,13}=3.81$ ;  $F_{0.95,11,1}=242.98$ ; <sup>a</sup>F-ratio (regression/residual); <sup>b</sup>F-ratio (lack of fit/pure error).

test, the model is predictive, since the F value calculated is 5.75 times higher than the critical F value. After the ANOVA, the response surfaces and contour curves (Figs. 4 and 5) were obtained using Equation 4. It can be seen that an increase in SCM and a decrease in CSL concentrations led to an increase

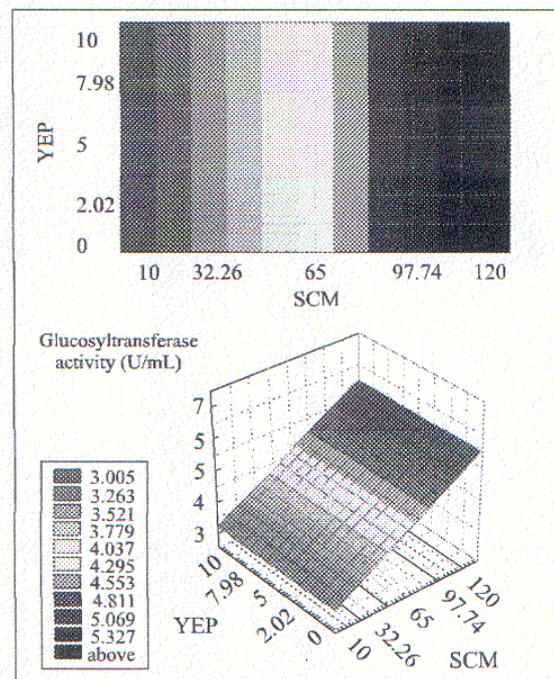
in enzyme activity. The increase or increase in YEP concentrations did not show significant influence on glucosyltransferase activity. Based on these results, in a subsequent experimental design, higher concentrations of SCM and YEP and lower concentration of CSL were chosen to obtain maximum enzyme activity.

**Third Experimental Design**

The experimental conditions and the results are shown in Table 3 and Figs. 6 and 7. Table 3 presents the 2<sup>3</sup>-FCCD used to evaluate the effect of the independent variables sugar cane molasses (SCM), corn steep liquor (CSL) and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> (YEP) and the dependent variable in glucosyltransferase activity. Table 7 presents the ANOVA, demonstrating that the model was significant in a confidence level of 85% which is evident in the F-test ( $F_{model}$  exceeds 5.64 times the tabulated value of F). All the components of the culture medium were the most important effects in the glucosyltransferase production. After the ANOVA analysis and from the validation of the studied parameters, the

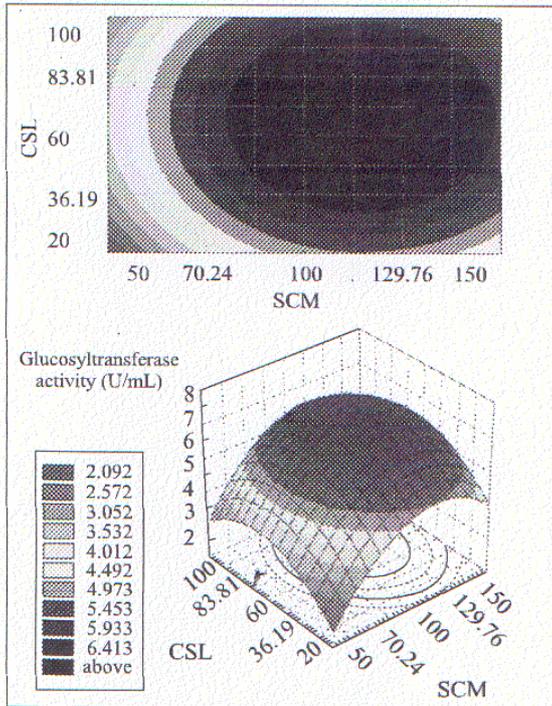


**Figure 4.** Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of CSL and SCM concentrations, according to the second experimental design.

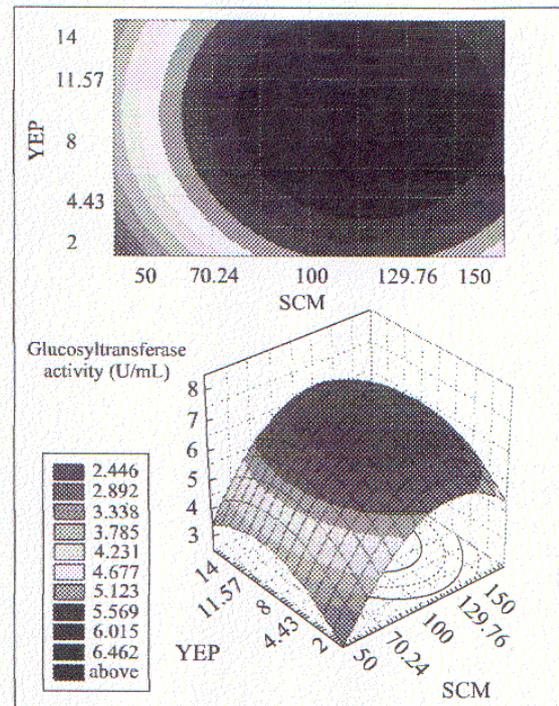


**Figure 5.** Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of YEP and SCM concentrations, according to the second experimental design.





**Figure 6.** Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of CSL and SCM concentrations, according to the third experimental design.



**Figure 7.** Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of YED and SCM concentrations, according to the third experimental design.

glucosyltransferase activity model (equation 5) was used to obtain the response surfaces and contour curves:

$$y = 5.65 - 0.47x_1 - 1.38x_1^2 - 0.73x_2 - 0.77x_2^2 - 0.58x_3^2 \quad (5)$$

**Table 7.** ANOVA for the third factorial design.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	11.45	5	2.29	11.50 <sup>a</sup>
Residual	2.19	11	0.20	
Lack of fit	1.97	9	0.21	1.91 <sup>b</sup>
Pure error	0.22	2	0.11	
Total	13.65	16		

Correlation coefficient:  $R^2=0.72$ ;  $F_{0.85,5,11}=2.04$ ;  $F_{0.85,9,2}=6.04$ ; <sup>a</sup>F-ratio (regression/residual); <sup>b</sup>F-ratio (lack of fit/pure error).

where  $y$  is the predicted response and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  are the coded values of sugar cane molasses, corn steep liquor and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>, respectively. The contour curves and response surfaces showing the effect of SCM, CSL, and YEP are shown in Figs. 6 and 7. The statistical optimal values of variables are obtained when moving along the major and the minor axis of the contour. The response at the central point yields to a maximum glucosyltransferase production. In the study of the culture medium optimization by *Erwinia* sp. D12 for the production of glucosyltransferase using RSM, the optimal value for concentrations of  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  (sugar cane molasses, corn steep liquor and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>) were found to be 100 gL<sup>-1</sup>, 60 gL<sup>-1</sup> and 8 gL<sup>-1</sup>, respectively. It was obtained 6.65 U mL<sup>-1</sup> (mean of the central points) after 8 h fermentation at 30°C. This value is approximately 9.5 times higher than the one produced by Park *et al.* (11) using strain *Klebsiella* sp. in a culture medium composed by beef extract and sucrose. Moraes *et al.* (8) obtained 12.8 U mL<sup>-1</sup> of glucosyltransferase activity from *Erwinia* sp. cells. In this case, the culture medium



was composed by sugar cane molasses, bacteriological peptone and beef extract. The glucosyltransferase purified from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, isolated by Nagai *et al.* (9), presented 13.89 U mg protein<sup>-1</sup>. These authors used a synthetic media composed by beef extract, peptone, NaCl and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Using *Klebsiella planticola* CCRC 19112, Huang *et al.* (4) obtained a maximum glucosyltransferase activity of 5.2 U mL<sup>-1</sup> using a culture medium composed by sucrose, tryptic soy broth and fructose. Overall, in this work, corn steep liquor (agro-industrial residue) and commercial yeast extract were used with the purpose of resulting in a low cost culture media. The results were satisfactory and the components sugar cane molasses and corn steep liquor are very useful carbon and nitrogen sources, respectively to enzyme production.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos em Pesquisa (FINEP) and GETEC Guanabara Química Industrial S.A. We thank the Prodesa Produtos Especiais para Alimentos S/A for the supply of the yeast extract Prodex Lac SD® and the Corn Products Brasil for the corn steep liquor supply.

#### RESUMO

##### Produção de glicosiltransferase por *Erwinia* sp. utilizando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta

A glicosiltransferase obtida pela linhagem *Erwinia* sp. é uma enzima intracelular que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose. A isomaltulose é um dissacarídeo redutor, não cariogênico e comercialmente utilizado em alimentos como substituto da sacarose. A metodologia de superfície de resposta e planejamento fatorial composto central-2<sup>3</sup> foram utilizados para otimizar o meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. em frascos sob agitação a 200 rpm e 30°C. As três variáveis independentes envolvidas no estudo foram o melão de cana de açúcar, a água de maceração de milho e o extrato de levedura Prodex Lac SD. As análises estatísticas dos resultados mostraram que, dentro da faixa estudada das concentrações dos componentes de meio de cultivo, todas as variáveis apresentaram efeito significativo na produção de glicosiltransferase. O meio de cultivo otimizado foi composto de 100 gL<sup>-1</sup> de melão de cana de açúcar, 60 gL<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 8 gL<sup>-1</sup> de extrato de levedura Prodex Lac SD, apresentando atividade de glicosiltransferase de 6.65 U mL<sup>-1</sup>.

**Palavras-chaves:** glicosiltransferase, isomaltulose, otimização, superfície de resposta

#### REFERENCES

1. Cheethan, P.S.J.; Imber, C.E.; Isherwood, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapsodica*. *Nature.*, 299, 628-631, 1982.
2. Hamada, S. Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries. *Pure Appl. Chem.*, 74(7), 2002.
3. Hashimoto, H.; Yamada, K.; Yoshimura, J. Glucosylation of methyl β-D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. *Biotechnol. Lett.*, 9(12), 849-854, 1987.
4. Huang, J.H.; Hsu, L.H.; Su Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 22-27, 1998.
5. Kawai, K.; Okuda, Y.; Yamashita, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinol. Japon.*, 32(6), 933-936, 1985.
6. Kawai, K.; Yoshikawa, H.; Murayama, Y.; Okuda, Y.; Yamashita K. Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. *Horm. Metabol. Res.*, 21, 338-340, 1989.
7. Lina, B.A.R.; Smits-Van Prooije, A.E.; Waalkens-Berendsen, D.H. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 309-314, 1997.
8. Moraes, A.L.L.; Steckelberg, C.; Sato, H.H.; Pinheiro, A. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 25(1), 95-102, 2005.
9. Nagai, Y.; Sugitani, T.; Tsuyuki, K. Characterization of α-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 58(10), 1789-1793, 1994.
10. Ooshima, T.; Izumitani, A.; Sobue, S.; Okahashi, N.; Hamada S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. *Infect. Immun.*, 39(1), 43-49, 1983.
11. Park, Y.K.; Uekane, R.T.; Pupin, A.M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. *Biotechnol. Lett.*, 14(9), 37, 547-551, 1992.
12. Rao, J.R.; Kim, C.H.; Rhee, S.K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochem.*, 35(7), 639-647, 2000.
13. Sasaki, N.; Topitsoglou, V.; Takazoe, I.; Frostell, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E-49. *Swed. Dent. J.*, 9, 149-155, 1985.
14. Shimizu, J.; Suzuki, K.; Nakajima, Y. Method of producing an immobilized α-glucosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. *U.K. Pat. 2,082,591*, Aug. 13, 1982.
15. Somogyi, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160, 61-68, 1945.
16. Takazoe, I. New trends on sweeteners in Japan. *Int. Dent. J.* 35, 58-65, 1985.
17. Takazoe, I.; Otha, K.; Shimizu, J.; Suzuki, K.; Iwakura, T.; Nakajima, Y. Low-cariogenic sweeteners. *U.S. Pat. 4,556,429*, Dec. 3, 1985.
18. Topitsoglou, V.; Sasaki, N.; Frostell, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. *Caries Res.*, 18, 47-51, 1984.

## Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: Culture medium optimization and cell immobilization in alginate

Haroldo Yukio Kawaguti\*, Eiric Manrich, Hélia Harumi Sato

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Avenida Monteiro Lobato 80, CEP 13083-862, C.P.6121, Campinas, Brazil

Received 1 July 2005; received in revised form 8 January 2006; accepted 8 January 2006

### Abstract

Isomaltulose is a structural isomer of sucrose commercially used in food industries. Glucosyltransferase produced by *Erwinia* sp. D12 catalyses an intramolecular transglucosylation of sucrose giving isomaltulose. An experimental Design and Response Surface Methodology were applied for the optimization of the nutrient concentration in the culture medium for enzyme production in shaken flasks at 200 rpm and 30 °C. A higher production of glucosyltransferase (7.47 Uml<sup>-1</sup>) was observed in the culture medium containing sugar cane molasses (160 gl<sup>-1</sup>), bacteriological peptone (20 gl<sup>-1</sup>) and yeast extract Prodex Lac SD® (15 gl<sup>-1</sup>) after 8 h, at 30 °C. The highest production of glucosyltransferase in the 6.6-l bioreactor (14.6 Uml<sup>-1</sup>) was obtained in the optimized culture medium after 10 h at 26 °C. When *Erwinia* sp. D12 cells were immobilized in sodium alginate, it was verified that sodium alginate solution A could be substituted by a cheaper one, sodium alginate solution B. Using a 40% cell suspension and 2% sodium alginate solution B for cell immobilization in a packed-bed reactor, 64.1% conversion of sucrose to isomaltulose was obtained. The packed-bed reactor with immobilized cells plus glutaraldehyde and polyethylenimine solutions remained in a pseudo-steady-state for 180 h.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Experimental design; Immobilized cells; Isomaltulose; Optimization; Packed-bed reactor; Response surface methodology

### 1. Introduction

Isomaltulose or palatinose® is a non-cariogenic sugar obtained commercially by the enzymatic conversion of sucrose catalyzed by glucosyltransferase as shown in Fig. 1. The interest in isomaltulose is due to the low cariogenic, low hydrolysis rate and the formation of monosaccharides in the organism, and also due to the possibility of the conversion of this sugar to a sugar-alcohol mixture with low caloric value and non-cariogenic property known as Isomalt® or Palatinit®. In experimental studies with rats [1] and in human studies [2], it was demonstrated that the production of insoluble glucan and acids from isomaltulose by strains of *Streptococcus mutans* is very low when compared with sucrose. Isomaltulose presents about 50% of the sweetness of sucrose [3] and very similar physical and organoleptic properties [4]. When used in foods, as substitute for sucrose in candies and chocolates, differences in sweetness have not been noticed [5,6]. In the organism, isomaltulose is

hydrolyzed by isomaltase and absorbed as glucose and fructose. However, the hydrolysis speed and absorption are lower when isomaltulose is used instead of sucrose. Isomaltulose is recommended as a potential parenteral nutrient for diabetics and non-diabetics [7]. In experimental studies with rats, isomaltulose did not show teratogenic or mutagenic effects or any other type of toxicity, being safe for use in food [8].

The conversion of sucrose to isomaltulose can be obtained by free enzymes [9,10], free cells [11] and immobilized cells [12–14]. Several microorganisms including *Protaminobacter rubrum* [15], *Erwinia rhapsodicus* [11], *Serratia plymuthica* [9], *Klebsiella planticola* [16] and *Klebsiella* sp. [17] can convert sucrose to isomaltulose. The immobilized cells in a hydrogel matrix can be protected from harsh environmental conditions such as pH, temperature, organic solvents and other compounds capable of inactivating them. Immobilized cells can also be handled more easily and recovered from the solution without difficulty [5]. Continuous processes can be operated at a high cell density without the loss of microbial cells, even at high dilution rates, which results in a higher bioreactor volumetric productivity. In this study, we demonstrate the optimization of the culture medium to obtain maximum enzymatic activity from

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 2175; fax: +55 19 3788 2153.  
E-mail address: kawaguti@fea.unicamp.br (H.Y. Kawaguti).

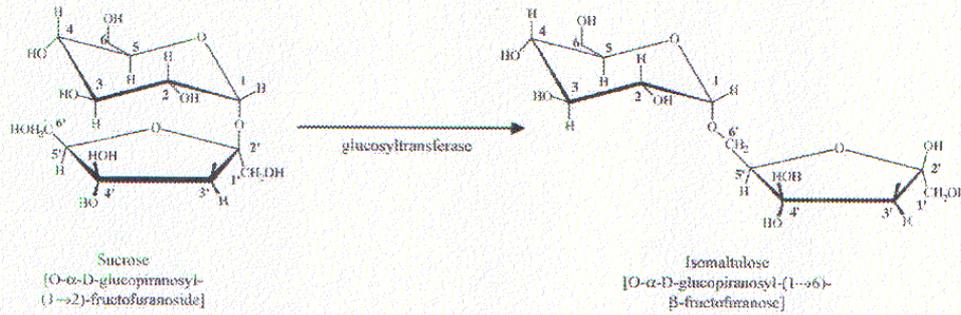


Fig. 1. Conversion of sucrose to isomaltulose by glucosyltransferase.

*Erwinia* sp. D12 cells, the cell biomass production in a bioreactor and the use of cell immobilization in alginate to obtain isomaltulose from sucrose.

**2. Materials and methods**

**2.1. Microorganism and culture maintenance**

The strain *Erwinia* sp. D12 that converts sucrose to isomaltulose, was isolated in the Laboratory of Food Biochemistry, the College of Food Engineering/UNICAMP, and is maintained on agar slants composed of 6% (w/v) sucrose, 4% (w/v) peptone, 0.4% (w/v) beef extract and 2% (w/v) agar, at 5 °C.

**2.2. Culture medium optimization using an experimental design and response surface methodology (RSM)**

The in vitro study for culture medium optimization (in shaken flasks) was carried out using an experimental design and response surface methodology (RSM). A factorial central composite design (FCCD) was used with a combination of the concentration levels of the independent variables. All data were treated with the aid of STATISTICA® 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13th Street, Tulsa, OK 74104, USA). The FCCD for *k* factors, codified as  $x_1, \dots, x_k$ , were composed of three parts: factorial (or cubical), containing a total of  $n_{\text{fact}}$  points of coordinates  $x_i = -1$  or  $x_i = +1$ , for all  $i = 1, \dots, k$ ; axial (or in star), formed by  $n_{\text{ax}} = 2k$  points with all the null coordinates except one, which is equal to a certain value  $\alpha$  (or  $-\alpha$ ), where  $\alpha = n_{\text{fact}}^{1/4}$ , and a total of  $n_{\text{centr}}$  assays were carried out at the central point, where  $x_1 = \dots = x_k = 0$ . The dependent variables  $X_i$  were codified according to the following equation:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta x_i}, \quad i = 1, 2, 3, \dots, k \tag{1}$$

where  $X_0$  corresponds to the value of the central point;  $x_i$  corresponds to the non-dimensional value of the independent variable;  $X_i$  corresponds to the real value of the independent variable;  $X_0$  corresponds to the real value of the independent variable at the central point; and  $\Delta x_i$  corresponds to the variation of the real value of the variable  $i$ , corresponding to the variation of a unit

for the non-dimensional value of the variable  $i$ . The complete quadratic model for the  $k$  factors is given by the following equation:

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \tag{2}$$

where the values for  $\beta$  are estimated from the polynomial coefficients and the  $X_i$  values represent the codified values. A 2<sup>3</sup>-FCCD, with six axial points ( $\alpha$ ) and three replicates at the central point giving a total of 17 assays per experiment as per Table 1, was used to study the effect of the components sugar cane molasses (Companhia Energética Santa Elisa), bacteriological peptone (Biobrás S.A.) and yeast extract Prodex Lac SD® (Prodesa produtos especiais para alimentos S.A.) in the production of glucosyltransferase by the strain of *Erwinia* sp. D12 to obtain maximum enzymatic activity and reduced costs in the fermentation process for the production of glucosyltransferase.

Table 1  
Factorial central composite design matrix (2<sup>3</sup>-FCCD) and response for glucosyltransferase activity

Assay	Variable levels			Response
	SCM <sup>a</sup>	BP <sup>b</sup>	YEP <sup>c</sup>	Enzyme activity (U/ml)
1	-1	-1	-1	4.23
2	+1	-1	-1	3.97
3	-1	+1	-1	5.07
4	+1	+1	-1	3.87
5	-1	-1	+1	4.85
6	+1	-1	+1	4.23
7	-1	+1	+1	5.53
8	+1	+1	+1	3.15
9	-1.68	0	0	4.89
10	+1.68	0	0	3.27
11	0	-1.68	0	6.14
12	0	+1.68	0	4.32
13	0	0	-1.68	5.19
14	0	0	+1.68	4.91
15	0	0	0	7.47
16	0	0	0	7.12
17	0	0	0	7.19

<sup>a</sup> Sugar cane molasses.  
<sup>b</sup> Bacteriological peptone.  
<sup>c</sup> Yeast extract Prodex Lac SD®.



### 2.2.1. Inoculum and fermentation conditions

The strain was grown in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of a seed culture medium according to 2<sup>3</sup>-FCCD (Table 1), for 15 h at 30 °C in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). An aliquot (5 ml) of the seed culture was transferred to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 45 ml of the same seed culture medium and incubated at 30 °C for 8 h, shaken at 200 rpm. The culture broth was centrifuged at 10,070 × g for 15 min at 5 °C and the cell mass was used for the determination of glucosyltransferase activity. For the extraction of intracellular enzyme, the cell mass was washed twice with distilled water and then suspended in 50 ml 0.05 M citrate–phosphate buffer, pH 6.0. The cell suspension was cooled to 5 °C and disrupted by ultrasonic vibration Labline Ultra-Tip (Labline Instruments, Inc., IL, USA). After cell wall disruption, the samples were centrifuged at (12,300 × g) for 15 min at 5 °C. The enzyme activity of the supernatant was determined.

### 2.2.2. Estimation of glucosyltransferase activity

The activity of glucosyltransferase was assayed by the measurement of the reducing sugar formed from the sucrose using the Somogyi method [18] with glucose as the standard. A mixture of 450 µl of a 4.0% (w/v) sucrose solution in 0.05 M citrate–phosphate buffer, pH 6.0 and 50 µl of enzyme solution was incubated for 20 min at 35 °C. One unit of glucosyltransferase activity (U) was defined as the amount of enzyme that liberates 1 µmol of reducing sugars from sucrose per minute under the above assay conditions.

### 2.3. Batch enzyme kinetic studies and production of cell biomass

The production of cell biomass was performed in a 6.6-l bioreactor New Brunswick Bioflo IIc (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) with a 3.0-l working volume. The growth of the microorganism, alteration of the culture medium pH and the production of glucosyltransferase by the strain of *Erwinia* sp. D12 was carried out at 24, 26 and 28 °C.

### 2.3.1. Inoculum preparation and fermentation conditions

The inoculum was prepared by transferring a loopful of cells from a freshly grown culture into 100 ml of a liquid medium in 250 ml Erlenmeyer flasks. The culture medium was composed of sugar cane molasses (160 g l<sup>-1</sup>), bacteriological peptone (20 g l<sup>-1</sup>) and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g l<sup>-1</sup>). The flasks were incubated in a rotary shaker at 200 rpm for 15 h at 30 °C. An aliquot (300 ml) of the culture was added aseptically to the 6.6-l bioreactor containing 2700 ml of culture medium identical to that of the inoculum. Fermentation was carried out at 24, 26 and 28 °C with an aeration rate of 1 vvm and stirrer speed of 200 rpm. Aliquots (20 ml) of culture medium were collected at different incubation times. The cell growth, variation in the pH of the culture medium and the glucosyltransferase activity of the supernatant were determined.

### 2.3.2. Growth of the microorganism, glucosyltransferase activity and variation of the culture medium pH

Aliquots (20 ml) of the culture broth were centrifuged at (12,300 × g) for 15 min, at 5 °C. The cell mass was washed twice with 20 ml of distilled water and re-suspended in 20 ml of distilled water. A Beckman DU 70 spectrophotometer (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA) was used to monitor cell growth by measuring the optical density at 660 nm (OD<sub>660</sub>). Glucosyltransferase activity was estimated as described in Section 2.2.2. The pH of the culture medium was measured with an Orion model 710A potentiometer.

### 2.4. Cell immobilization in different sodium alginates and batch enzyme kinetic studies with immobilized cells

The immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in different alginates and the effect of the immobilized cell concentrations on the production of isomaltulose were studied. Aliquots (60 ml) of 20% (w/v) wet cell suspensions were mixed with 120 ml of different (A, B and C) 1, 1.5 and 2% (w/v) sodium alginate solutions (A: Sigma Chemical Co. obtained from *Macrocystis pyrifera*, high viscosity; B: LabSynth Ltda. analytical grade; C: Vetec Química Fina Ltda. analytical grade) and 0.1% (w/v) Tween 80. The cell suspensions in the different alginates were immobilized by extruding drop wise into 2% (w/v) CaCl<sub>2</sub> solutions to form immobilized beads (3 mm diameter). After maintaining in the 2% (w/v) CaCl<sub>2</sub> solution for 24 h at 5 °C, the beads were washed with distilled water. Samples (20 g) of beads were transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of 35% (w/v) sucrose solution. The flasks were incubated in batches at 30 °C with agitation at 150 rpm. Aliquots were collected after 24, 36 and 48 h. After each collection, the aliquot (50 ml) of 35% (w/v) sucrose was substituted by a new sample (50 ml) of sucrose solution. The carbohydrate analyses were carried out using a Waters 600E High Performance Liquid Chromatograph with a Waters 410 Differential Refractometer detector.

### 2.4.1. HPLC analysis

The analysis was performed using a WATERS HPLC 600E chromatograph coupled to a refractive index detector (WATERS 410) and using a Zorbax-NH2 column (250 mm × 4.6 mm). The mobile phase was acetonitrile:water 75:25 (v:v), the flow rate 1 ml min<sup>-1</sup> and the temperature 35 °C. The carbohydrates were identified from their retention times, in comparison with standards of fructose, glucose, sucrose and isomaltulose.

### 2.5. Cell immobilization in sodium alginates A and B and continuous enzyme kinetic studies with immobilized cells

To determine the optimum concentration of sodium alginate for isomaltulose production the conversion of sucrose to isomaltulose was performed in a packed-bed reactor using cells immobilized in 1.5% (w/v) sodium alginate solution B, 1.5% (w/v) sodium alginate solution A and 2% (w/v) sodium alginate solution B. Suspensions containing 20% (w/v) of wet *Erwinia* sp. D12 cells in sterile distilled water were mixed with sterile sodium alginate solutions A and B containing

0.1% (w/v) Tween 80. The cell suspensions were immobilized as described previously. Samples (100 g) of beads containing immobilized cells were transferred to packed-bed columns (15 cm × 30 cm diameter). A 35% (w/v) sucrose solution was circulated in ascending flow rate at 20 ml h<sup>-1</sup>, and the conversion continued for 72 h. The temperature of the column was maintained at 30 °C. The parameters temperature and sucrose solution concentration were studied previously [19]. The conversion of sucrose to isomaltulose was determined as described in Section 2.4.1.

To study the appropriate concentration of cells in immobilization, suspensions containing 20, 30 and 40% (w/v) of wet *Erwinia* sp. D12 cells were mixed, separately, with 2% (w/v) sodium alginate solution B containing 0.1% (w/v) Tween 80. The mixture was immobilized as described previously. Samples (100 g) of beads containing immobilized cells were transferred into three packed-bed columns (15 cm × 30 cm diameter). Samples of 35% (w/v) sucrose solution were circulated in ascending flow rate at 20 ml h<sup>-1</sup>. The temperature of the columns was maintained at 30 °C and the conversion of sucrose to isomaltulose continued for 96 h. The conversion was determined as described in Section 2.4.1.

To verify the effect of the addition of glutaraldehyde and polyethylenimine on immobilized cells in the packed-bed reactor, 40% (w/v) wet cell suspension was immobilized with 2% (w/v) sodium alginate solution B as described previously and used to study the effect on the production of isomaltulose. Half of the immobilized cells were treated with a 1% (w/v) solution of glutaraldehyde solution plus a 1.5% (w/v) solution of polyethylenimine (Sigma Chemical Company), and then filtered and washed with distilled water. The beads containing the immobilized cells were packed into two column reactors. A 35% (w/v) sucrose solution was passed through the columns, and the eluate collected to determine the amount of isomaltulose produced, using High Performance Liquid Chromatography as described in Section 2.4.1.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Culture medium optimization using an experimental design and response surface methodology (RSM)

A 2<sup>3</sup>-Factorial Central Composite Design (2<sup>3</sup>-FCCD) was used to identify the optimum levels of the parameters for glucosyltransferase production by *Erwinia* sp. D12. The study required 17 experiments, including 8 factorial points and 3 central points to provide information about the middle of the experimental region, also allowing for checking of the curvature and providing additional degrees of freedom for error, resulting in greater power when testing the significance of the effects. The three axial points ( $\alpha = 1.68$ ) were used to fit a second order model. Table 1 presents the 2<sup>3</sup>-FCCD used to evaluate the effects of the independent variables sugar cane molasses (SCM/110–210 gl<sup>-1</sup>), bacteriological peptone (BP/5–35 gl<sup>-1</sup>) and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> (YEP/5–25 gl<sup>-1</sup>) on the dependent variable of glucosyltransferase activity. The levels studied with the decoded values are shown in Table 2. The max-

Table 2  
Decoded values used in the factorial central composite design matrix (2<sup>3</sup>-FCCD) for glucosyltransferase activity

Variable	Coded variable levels				
	-168	-1	0	+1	+168
SCM <sup>a</sup> (g/l)	110	130	160	190	210
BP <sup>b</sup> (g/l)	5.0	11.1	20.0	28.9	35.0
YEP <sup>c</sup> (g/l)	5.0	9.1	15.0	21.0	25.0

<sup>a</sup> Sugar cane molasses.

<sup>b</sup> Bacteriological peptone.

<sup>c</sup> Yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

Table 3  
Analysis of variance (ANOVA) and regression analysis for glucosyltransferase activity

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-test <sup>a</sup>
Regression	24.8	04	6.2	31.0
Residual	2.7	12	0.2	
Lack of fit	2.6	10		
Pure error	0.1	02		
Total	27.5	16		

Coefficient of determination:  $R^2 = 0.94$ .

<sup>a</sup>  $F_{0.95;4;12}$  ( $F_{\text{tabulated}}$ ) = 3.26.

imum activity of glucosyltransferase observed was 7.47 Uml<sup>-1</sup>, with SCM (160 gl<sup>-1</sup>), BP (20 gl<sup>-1</sup>) and YEP (15 gl<sup>-1</sup>), which corresponded to the central points. The average value obtained from the three trial central points was 7.26 Uml<sup>-1</sup>.

Table 3 shows the analysis of variance (ANOVA) for glucosyltransferase activity. The quadratic regression model demonstrated that the model was significant at a confidence level of 95% ( $p < 0.05$ ), as evidenced by the *F*-test ( $F_{\text{model}}$  exceeded the tabulated value of  $F_{0.95;4;12}$  by 9.5 times). The adequacy of the model was checked by the coefficient of determination ( $R^2$ ), whose value was 0.94. The pure error was very low (0.07), indicating good reproducibility of the data obtained. All of the culture medium components were needed for glucosyltransferase production. These results were good enough indicators for a model representing the real relationship between glucosyltransferase activity and the independent variables. After the ANOVA analysis and validation of the study parameters, the glucosyltransferase activity model Eq. (3) was used to construct the contour curves:

$$y = 7.28 - 1.05x_1 - 2.38x_1^2 - 1.56x_2^2 - 1.69x_3^2 - 0.68x_1x_2 \quad (3)$$

where *y* was the predicted response for glucosyltransferase activity and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  were the coded values for sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>, respectively. The contour curves (Fig. 2) represented the predicted model, indicating the levels of the variables for an optimal process. The components SCM, BP and YEP affected the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. D12. The Experimental Design and Response Surface Methodology indicated that amounts of SCM between 110 and 175 gl<sup>-1</sup>, BP

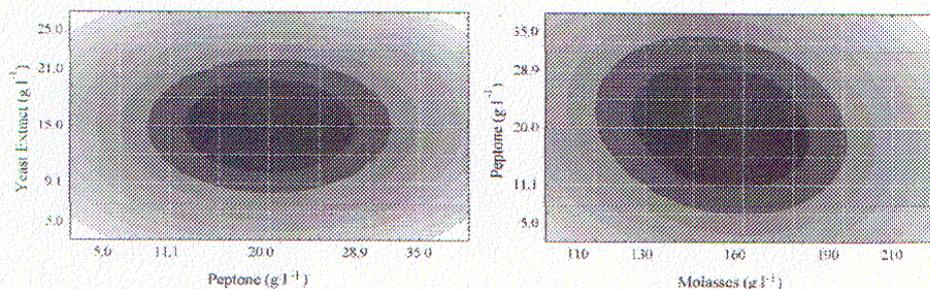


Fig. 2. Contour curve for glucosyltransferase activity as a function of sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> concentrations.

between 11 and 28 g l<sup>-1</sup> and YEP between 9 and 20 g l<sup>-1</sup>, increased glucosyltransferase activity. The optimum culture medium components to obtain the greatest production of isomaltulose by *Erwinia* sp. of 7.47 U ml<sup>-1</sup>, was obtained in a culture medium containing SCM (160 g l<sup>-1</sup>), BP (20 g l<sup>-1</sup>) and YEP<sup>®</sup> (15 g l<sup>-1</sup>). The glucosyltransferase activity was approximately 2.5 times higher than that produced by Park et al. [17] using a strain of *Klebsiella* sp. in a culture medium composed of beef extract and sucrose, when they obtained 2.95 U ml<sup>-1</sup>. Moraes et al. [19] obtained 12.8 U ml<sup>-1</sup> of glucosyltransferase activity from *Erwinia* sp. cells. In this case, the culture medium was composed of sugar cane molasses, bacteriological peptone and beef extract. The glucosyltransferase purified from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 isolated by Nagai et al. [10] presented 13.9 U mg<sup>-1</sup> of protein. These authors used a synthetic media composed of beef extract, peptone, NaCl and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Using *Klebsiella planticola* CCRC 19112, Huang et al. [16] obtained a maximum glucosyltransferase activity of 5.2 U ml<sup>-1</sup> using a culture medium composed of sucrose, tryptic soy broth and fructose. In the present study, sugar cane molasses (agro-industrial residue) and commercial yeast extract were used, with the purpose of producing a low cost culture media. The results were satisfactory and the components sugar cane molasses and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> were respectively very useful carbon and nitrogen sources for enzyme production. In the following experiment, the influence of temperature on the growth of *Erwinia* sp. D12 to produce cell mass with high glucosyltransferase activity in a 6.6-l bioreactor was studied. After this experiment, the cell mass was immobilized with sodium alginate to study the conversion of sucrose to isomaltulose.

### 3.2. Batch enzyme kinetic studies and production of cell biomass

Using the optimized culture medium composed of sugar cane molasses (160 g l<sup>-1</sup>), bacteriological peptone (20 g l<sup>-1</sup>) and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g l<sup>-1</sup>), the growth profile of *Erwinia* sp. D12 was carried out at 24, 26 and 28 °C. The effect of temperature and the fermentation time were examined so as to obtain cells with a higher conversion activity. Fig. 3 shows a short lag time. At 24 °C, the maximum glucosyltransferase activity (14.0 U ml<sup>-1</sup>) was produced in the logarithmic phase after 11 h

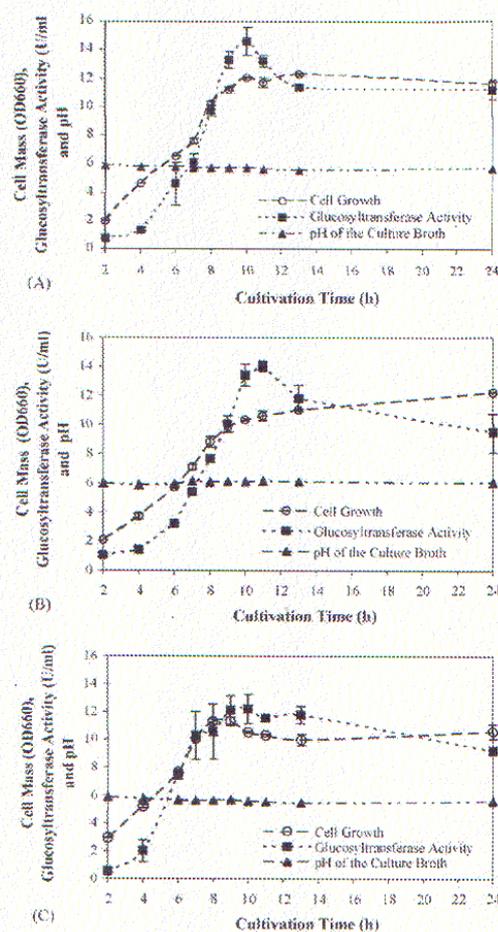


Fig. 3. Study of the growth of the microorganism and production of glucosyltransferase: (A) at 24 °C, (B) at 26 °C and (C) at 28 °C.



(Fig. 3A). After 24 h this activity decreased to  $9.42 \text{ Uml}^{-1}$ . After 11 h at  $26^\circ\text{C}$ , the maximum enzyme activity in the logarithmic phase was  $14.6 \text{ Uml}^{-1}$  (Fig. 3B). After this, a decrease in the enzyme activity was observed, resulting in an activity of  $11.2 \text{ Uml}^{-1}$  after 24 h.

Comparing fermentation at the different temperatures, it appears that glucosyltransferase production was lower during fermentation at  $28^\circ\text{C}$  than at  $24$  or  $26^\circ\text{C}$ , with a maximum activity of  $12.2 \text{ Uml}^{-1}$  after 10 h (Fig. 3C), the enzyme activity then gradually reducing, reaching  $9.16 \text{ Uml}^{-1}$  after 24 h. The highest enzyme activity ( $14.6 \text{ Uml}^{-1}$ ) was obtained at  $26^\circ\text{C}$  after 11 h of fermentation, coinciding with the exponential phase, which characterizes this enzyme as a primary metabolic one. These results are compatible with those of Egerer [20] who also observed an increase in the glucosyltransferase activity of *Protaminobacter rubrum* after 8 h fermentation in the logarithmic phase of cell growth. The author suggested that this could be explained by periplasmic formation by the enzyme during cell growth and by structural changes in the proteins both in the final growth phase and in the old cells. The reduction in enzyme activity was verified more clearly at  $28^\circ\text{C}$ , due to its thermosensibility, as described by Moraes et al. [19]. Moreover, the pH of the culture medium was about 5.5–6.0 during fermentation, suggesting little production of acid as a by-product. The cell mass obtained from the bioreactor fermentation at  $26^\circ\text{C}$  was used in further studies to verify the conversion of sucrose to isomaltulose from immobilized cells.

### 3.3. Cell immobilization in different sodium alginates and enzyme kinetic studies with immobilized cells

The wet cell mass of *Erwinia* sp. D12 obtained from fermentation in a bioreactor at  $26^\circ\text{C}$  after 11 h as previously described, was immobilized in alginate gel. Three sodium alginates were examined and compared in batch rotary shakers and in packed-bed reactors. Comparing the cells immobilized in the 1% sodium alginate solutions A, B and C, it can be seen in Fig. 4 that after

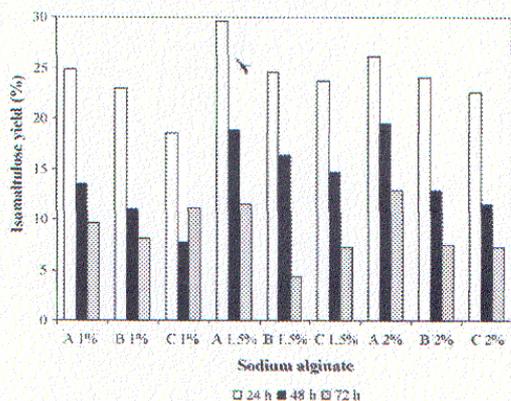


Fig. 4. Conversion of sucrose to isomaltulose using immobilized cells in a batch process, at varying alginate concentrations.

24 h the cells in these conditions were showing sucrose to isomaltulose conversion rates of 24.8, 22.9 and 18.5%, respectively. Also, after the third addition of 50 ml of sucrose solution in the samples after 48 h, the conversion rates decreased to 13.5, 10.9 and 14.7%, respectively. *Erwinia* sp. D12 cells in the 1.5% sodium alginate solutions A, B and C, produced respectively, 29.6, 24.5 and 23.7% of isomaltulose after 24 h. Under these conditions, following the third addition of 50 ml of sucrose solution after 48 h, the conversion rates decreased to 18.8, 16.3 and 11.6%, respectively.

Using the 2% sodium alginate solutions A, B and C, 26.1, 24.0 and 22.5%, respectively of isomaltulose were obtained after 24 h. After the third addition of 50 ml of sucrose solution after 48 h, the conversion rates fell to 19.4, 12.9 and 11.5%, respectively. The conversion rates of the immobilized preparations showed that those from sodium alginate A and sodium alginate B had approximately equal conversion rates during the first 24 h. The greatest conversion rate of sucrose to isomaltulose using immobilized cells was in sodium alginate A. However, due to the high cost of the latter, 1.5 or 2% sodium alginate solution B can be used for the cell immobilization, in substitution for sodium alginate A. With the aim of achieving more stable preparations and higher conversion rates, the conversion of sucrose into isomaltulose using cells immobilized in 1.5% sodium alginate solution A and 1.5 and 2.0% sodium alginate solutions B in packed-bed reactors, was studied in the next experiment.

### 3.4. Cell immobilization in sodium alginates A and B and continuous enzyme kinetic studies with immobilized cells

Beads containing the immobilized cells were packed into three packed-bed reactors. Fig. 5 illustrates the conversion of sucrose to isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells immobilized in 1.5 and 2% of sodium alginate solution B and 1.5% of sodium alginate solution A. The conversion of sucrose to isomaltulose was initially shown to be 16.52% in 1.5% alginate solution A, and after 72 h, it was 23.7%. In 1.5% alginate solution B, conversion of sucrose to isomaltulose was 15.9%

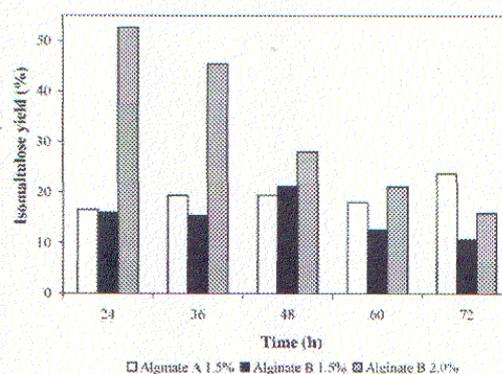


Fig. 5. Conversion of sucrose to isomaltulose using cells immobilized in 1.5% alginate A, 1.5% B and 2.0% B in packed-bed reactors.



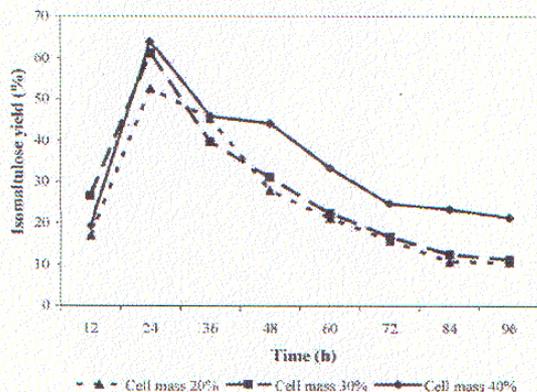


Fig. 6. Conversion of sucrose to isomaltulose using 20, 30 and 40% cell suspensions immobilized in 2.0% alginate B in packed-bed reactors.

after 24 h, increasing to 21.2% after 48 h and then decreasing to 10.6% after 72 h. In 2% alginate solution B, the conversion of sucrose into isomaltulose in the first 12 h reached a maximum of 52.6%. To sum up, 1.5% sodium alginate solution A may be substituted by 2% sodium alginate solution B, which is cheaper than alginate A, since solution B results in higher conversion rates of sucrose to isomaltulose. Based on these experiments, isomaltulose was produced continuously by immobilized cells using different concentrations of cell mass.

The optimal cell concentration for the immobilized cells was investigated. Three packed-bed reactors were operated with different cell concentrations at 30 °C for 96 h. Fig. 6 illustrates the conversion of sucrose to isomaltulose using 20, 30 and 40% (wet cell, w/v) cell suspensions on immobilization in 2% sodium alginate solutions. Comparing the three cell suspensions, the conversion yields at the initial stage were 17.0, 26.7 and 19.3%, respectively. These values increased, giving values for the maximum conversion of sucrose to isomaltulose of 52.6, 61.2 and 64.1%, respectively. However, after 96 h the conversion yields decreased to 10.6, 11.3 and 21.3%, respectively. It was also observed that increments in the cell concentration of the immobilized cells resulted in an increase in the conversion of sucrose to isomaltulose. Furthermore, it was noticeable that the rate of conversion was considerably higher in the first 24 h, and that the conversion velocity tended to decrease with reaction time. The half-life of immobilized cells is shorter due to the escape of the cells on the matrix gel. In accordance with Shimizu et al. [14] when the additive polyethylenimine is gelled by treatment with glutaraldehyde after having first been permeated into the sodium alginate gel, a gel having high cell retention power and high physical strength is formed. Thus, the additives were used to increase the half-life of immobilized cells.

The effect of glutaraldehyde and polyethylenimine on the immobilized cells can be seen in Fig. 7. The maximum conversion yields without additives and with additives were 60.5 and 47.7% and these values then decreased to 3.2 and 25.2%,

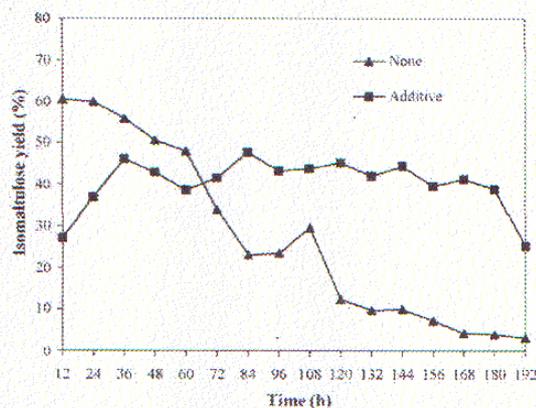


Fig. 7. Conversion of sucrose to isomaltulose using cells immobilized in calcium-alginate in a packed-bed reactor: influence of the use of the additives glutaraldehyde and polyethylenimine.

respectively. The initial conversion yield of the immobilized cells with additives was 27.2%, reaching a maximum conversion of 47.7% after 84 h. The column packed with immobilized cells plus glutaraldehyde and polyethylenimine solutions remained in a steady state for 180 h with a yield of about 40%. Fig. 7 shows that treating the immobilized cells with additives decreased the yield but on the other hand, cell stability was greatly increased.

Tsuyuki et al. [21] obtained isomaltulose (65.4%) from a 20% sucrose solution using *Klebsiella planticola* MX10 cells immobilized in sodium alginate plus the additives glutaraldehyde and polyethylenimine, using a batch process. Using immobilized *Erwinia rhapsodici* cells (40% wet cell/v) with 5% sodium alginate in a packed-bed reactor (18 cm × 5 cm diameter, 300 ml), Ahn et al. [22] obtained 89% of isomaltulose from a 55% sucrose solution at 30 °C. Zhao and Zhang [23] observed that immobilized *Klebsiella* sp. LX 3 cells converted 99.7% of sucrose (10% solution) into isomaltulose with a flow rate of 6 mL/min. Cells entrapped in 2% sodium alginate were packed in 200 ml column reactors, and sucrose solutions of different concentrations were passed through the columns at different flow speeds. Increments in the sucrose concentration of up to 20% further increased the yield of isomaltulose, although the sucrose conversion rate decreased and thus higher sucrose concentrations did not result in better yields. Moraes et al. [19] achieved a maximum conversion rate (56.4%) when a 19.4% sucrose solution passed through a packed-bed reactor (20 cm × 2.5 cm diameter containing 40 g of immobilized cells) at a flow speed of 21.9 ml/min. In this study, the *Erwinia* sp. cells (20% wet cells/v) were immobilized in 1% sodium alginate. Using response surface methodology, the effects of sucrose concentration (12.5–60%) and temperature (25–35 °C) on the conversion rate were evaluated. At 35 °C, the yield of isomaltulose was approximately 50% from sucrose solutions ranging from 20 to 30%. The excess of sucrose affected the activity of the immobilized cells, decreasing the conversion of sucrose to isomaltulose.



#### 4. Conclusions

With the aid of an experimental design and response surface methodology, the optimal concentrations of  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  (sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>) for the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. D12 were found to be 160, 20 and 15 g l<sup>-1</sup>, respectively. The highest glucosyltransferase activity was 7.47 U ml<sup>-1</sup> at 30 °C after 8 h of fermentation time. When *Erwinia* sp. D12 was grown aerobically in a 6.6-l bioreactor, the greatest production of glucosyltransferase (14.6 U ml<sup>-1</sup>) occurred after 10 h of fermentation at 26 °C. The results were satisfactory, suggesting that the components sugar cane molasses and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> were very useful as carbon and nitrogen sources, respectively, for the enzyme production. In the study on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in alginate, it was verified that the 1.5% solution of sodium alginate A could be substituted by a cheaper one: a 2% solution of sodium alginate B. In the conversion of sucrose to isomaltulose using cells immobilized in 1.5% alginate A, 1.5% B and 2% B, in a bioreactor, there was a maximum conversion of 23.7, 21.2 and 52.9%, respectively. In the study on the effect of concentration on the cells immobilized in alginate with respect to the conversion of sucrose to isomaltulose in a packed-bed reactor, the highest conversion rate of 64.1% occurred after 24 h, using a 40% cell suspension (wet cells, w/v). On one hand, the addition of both glutaraldehyde and polyethylenimine to the calcium-alginate immobilized cells resulted in a decrease in enzyme activity but on the other hand, it increased the stability of the column packed immobilized cells for about 180 h, with a yield of 40%.

#### Acknowledgments

We thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and GETEC Guanabara Química Industrial S/A for their financial support.

#### References

- [1] N. Sasaki, V. Topitsoglou, I. Takazoe, G. Frostell, Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E-49, Swed. Dent. J. 9 (1985) 149–155.
- [2] V. Topitsoglou, N. Sasaki, G. Frostell, Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque, Caries Res. 18 (1984) 47–51.
- [3] I. Takazoe, New trends on sweeteners in Japan, Int. Dent. J. 35 (1985) 58–65.
- [4] I. Takazoe, Palatinose—An Isomeric Alternative to Sucrose, Progress in Sweeteners, Elsevier Applied Science, London, 1989.
- [5] G.A. Dervakos, C. Webb, On the merits of viable-cell immobilisation, Biotechnol. Adv. 9 (1991) 559–612.
- [6] I. Takazoe, K. Otha, J. Shimizu, K. Suzuki, T. Iwakura, Y. Nakajima, Low-cariogenic sweeteners, US Patent 4,556,429, (1985).
- [7] K. Kawai, H. Yoshikawa, Y. Murayama, Y. Okuda, K. Yamashita, Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients, Horm. Metab. Res. 21 (1989) 338–340.
- [8] B.A.R. Lina, A.E. Smits-Van Prooije, D.H. Waalkens-Berendsen, Embryo-toxicity/teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats, Food Chem. Toxicol. 35 (1997) 309–314.
- [9] M. Mcallister, C.T. Kelly, E. Doyle, W.M. Fogarty, The isomaltulose synthesising enzyme of *Serratia plymuthica*, Biotechnol. Lett. 12 (1990) 667–672.
- [10] Y. Nagai, T. Sugitani, K. Tsuyuki, Characterization of  $\alpha$ -glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, Biosci. Biotech. Biochem. 58 (1994) 1789–1793.
- [11] H. Heikkilä, M. Sarkki, M. Lindroos, P. Ojala, V. Ravanko, M. Tylli, Process of the production of isomaltulose and other products, US Patent 6,146,854, (2000).
- [12] P.S.J. Cheetham, C. Garrett, J. Clark, Isomaltulose production using immobilized cells, Biotechnol. Bioeng. 27 (1984) 471–481.
- [13] O.J. Lantero, Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*, European Patent Application 007,771, (1983).
- [14] J. Shimizu, K. Suzuki, Y. Nakajima, Method of producing an immobilized  $\alpha$ -glucosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose, UK Patent 2,082,591, (1982).
- [15] H. Kakinuma, H. Yuasa, H. Hashimoto, Glycosyl transfer mechanism of  $\alpha$ -glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*, Carbohydr. Res. 312 (1998) 103–115.
- [16] J.H. Huang, L.H. Hsu, Y.C. Su, Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112, J. Ind. Microbiol. Biot. 21 (1998) 22–27.
- [17] Y.K. Park, R.T. Uekane, H.H. Sato, Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose, Rev. Microbiol. 27 (1996) 131–136.
- [18] M. Somogyi, A new reagent for the determination of sugars, J. Biol. Chem. 160 (1945) 61–68.
- [19] A.L.L. Moraes, C. Steckelberg, H.H. Sato, A. Pinheiro, Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp. D12 immobilizada com alginato de cálcio, Ciênc. Technol. Aliment. 25 (2005) 95–102.
- [20] P. Egerer, Downstream processing of sucrose 6-glucosylmutase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener, Hindustan Antibiot. Bull. 36 (1994) 65–77.
- [21] K. Tsuyuki, Y. Sugitani, Y. Miyata, T.E. Ebashi, Y. Nakajima, Isolation and characterization of trealulose-producing bacteria from Thailand soil, J. Gen. Appl. Microbiol. 38 (1992) 483–490.
- [22] S. Ahn, J. Yoo, H. Lee, S. Kim, B. Noh, J. Kim, J. Lee, Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapsodici*, Biotechnol. Lett. 25 (2003) 1179–1183.
- [23] X.L.C. Zhao, D. Zhang, Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3, J. Appl. Microbiol. 95 (2003) 521–527.

## Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia* sp. cells

Haroldo Yukio Kawaguti\*

Laboratory of Food Biochemistry  
Department of Food Science  
Faculty of Food Engineering  
State University of Campinas (UNICAMP)  
Rua Monteiro Lobato 80  
CEP 13083-862, C.P.6121  
Campinas, Brazil  
Tel: 55 19 3788 2175  
Fax: 55 19 3788 2153  
E-mail: kawaguti@fea.unicamp.br

Eiric Manrich

Biocen do Brasil  
Rua Pedro Stancato, 690  
Chácara Campos dos Amarais  
CEP 13082-050  
Campinas, Brazil  
Tel: 55 19 3246 1697  
Fax: 55 19 3246 2581  
E-mail: eiric@biocendobrasil.com.br

Hélia Harumi Sato

Laboratory of Food Biochemistry  
Department of Food Science  
Faculty of Food Engineering  
State University of Campinas (UNICAMP)  
Rua Monteiro Lobato 80  
CEP 13083-862, C.P.6121  
Campinas, Brazil  
Tel: 55 19 3521 2175  
Fax: 55 19 3521 2153  
E-mail: heliah@fea.unicamp.br

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos em Pesquisa (FINEP) and GETEC Guanabara Química Industrial S.A.

Keywords: batch process, *Erwinia* sp., free cells, glucosyltransferase, isomaltulose, response surface methodology.

Abbreviations: 2<sup>3</sup>-FCCD: 2<sup>3</sup>-factorial central composite designs  
SCM: sugar cane molasses  
BP: bacteriological peptone  
YEP: yeast extract Prodex Lac SD®

Isomaltulose is a structural isomer of sucrose commercially used in food industries. Glucosyltransferase produced by *Erwinia* sp. D12 catalyses an intramolecular transglucosylation of sucrose giving isomaltulose. The Experimental design and response surface methodology were applied for the optimization of the nutrient concentration in the culture medium for the enzyme production in shaken flasks at

200 rpm and 30°C. The three variables involved in this study were sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD®. The statistical analysis of the results showed that, in the range studied, all the factors had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on glucosyltransferase production and the highest enzyme activity was observed in culture medium containing sugar cane molasses (160 g/L), bacteriological peptone

\*Corresponding author

(20 g/L) and yeast extract Prodex Lac SD® (15 g/L). Maximum glucosyltransferase activity of 29.88 U/mL was achieved in a 6.6-L fermenter using the optimized medium. Free *Erwinia* sp. D12 cells were used for isomaltulose production from sucrose during fifteen successive batches. The final isomaltulose concentration of 75.6% obtained in the first batch increased to 77.21% (mean value) in the other fourteen batches and the productivity of 1.1 g/L x hr was obtained in batch process.

The enzyme glucosyltransferase is an industrially important enzyme since it produces non-cariogenic isomaltulose (6-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-6-D-fructofuranose) from sucrose by an intramolecular transglucosylation (Kakinuma et al. 1998). Isomaltulose is a reducing sugar and it is a structural isomer of sucrose naturally presents in honey in very small quantities. The interest in isomaltulose is due to the low cariogenic, low hydrolysis speed and formation of monosaccharides in the organism, and also due to the possibility of conversion of this sugar to a mixture of sugar-alcohol with low caloric value and non-cariogenic property known as Isomalt® or Palatinit®. This disaccharide has a sweet taste and very similar physical and organoleptic properties to sucrose (Krastanov and Yoshida, 2003).

Chemical synthesis of isomaltulose is very difficult but a small number of bacterial strains can convert sucrose into isomaltulose: *Protaminobacter rubrum* (Kakinuma et al. 1998), *Erwinia rhapsodica* (Cheetham et al. 1985), *Serratia plymuthica* (McAllister et al. 1990), *Klebsiella planticola* (Huang et al. 1998), *Klebsiella* sp. (Park et al. 1996) and *Klebsiella singaporensis* sp. (Li et al. 2004). The microbial formation of isomaltulose has attracted commercial interest and the production of this sugar has aroused great interest since this structural isomer of sucrose has interesting potential.

The application of experimental design and response surface methodology in fermentations process can result in improved product yields, reduced process variability and development time and over all costs (Rao et al. 2000). In this work, the effect of both nitrogen source (bacteriological peptone and yeast extract) and carbon source concentrations (sugar cane molasses) on glucosyltransferase production by *Erwinia* sp. D12 was studied at 30°C and the optimal conditions for glucosyltransferase production were determined in shaken flasks and on a bioreactor 6.6 litres. The conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells well knows process (Cheetham et al. 1982; Cheetham et al. 1985; Ahn et al. 2003; Krastanov and Yoshida, 2003; Zhao et al. 2003; Moraes et al. 2005). An attempt was made to study the production of isomaltulose in repeated batch operations using free *Erwinia* sp. D12 cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganism and culture maintenance

*Erwinia* sp. D12 producer of glucosyltransferase isolated from the Laboratory of Biochemistry, Department of Food Science, College of Food Engineering/UNICAMP was used in this study. Bacteria were maintained in culture medium containing per litre sterilized water: 6 g sucrose, 4 g peptone, 0.4 g beef extract and 2 g agar. The cultures were kept at 5°C and renewed every 8 weeks.

### Culture medium optimization using response surface methodology

Three 2<sup>3</sup>-factorial central composite designs (2<sup>3</sup>-FCCD) were carried out in order to identify optimum parameter levels for the glucosyltransferase production. The parameters (or independent variables) studied were: sugar cane molasses (Companhia Energética Santa Elisa), bacteriological peptone (Biobrás) and yeast extract Prodex Lac SD® (Prodesa produtos especiais para alimentos S.A.). The dependent variables and their levels are presented in Table 1 (first 2<sup>3</sup>-FCCD), Table 2 (second 2<sup>3</sup>-FCCD) and Table 3 (third 2<sup>3</sup>-FCCD). The FCCD contained a total of 17 experimental trials that included eight trials for factorial points, six trials for axial points and three trials for replication of the central points. Central points provide additional degrees of freedom for error estimating, which increases power when testing the significance of effects. The distance of the axial points was  $\pm 1.68$ , calculated from Equation 1:

$$\alpha = (2^n)^{1/4} \quad [1]$$

where  $\alpha$  is the distance of the axial points and  $n$  is the number of independent variables. All data were treated with STATISTICA® 5.0 from Statsoft Inc.

### Cultivation and enzyme production

The inoculum had the same composition of the production medium which they are shown in Table 1, Table 2 and Table 3. A loop full of cells was inoculated to inoculum in Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 50 mL of culture medium and the flasks were incubated in a rotary shaker (200 rpm) at 30°C for 15 hrs. Then a 10% (v/v) inoculum was added to production medium. Throughout the work, liquid cultures were incubated at 30°C and 200 rpm in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA). After 8 hrs of fermentation, the culture was centrifuged (Centrifuge Beckman J2-21, Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) at 9,650 x g for 15 min and glucosyltransferase activity was determined.

### Glucosyltransferase assay

The glucosyltransferase activity was performed by the increase of the reducing power from a solution containing sucrose, described by Park et al. (1996) with modifications.

For the extraction of intracellular enzyme, the cell mass was washed twice with distilled water and then suspended in 50 mL citrate-phosphate buffer 0.05 M pH 6.0. The cell suspension was cooled to 5°C and disrupted by ultrasonic oscillation 180 W for 20 sec (Labline Instruments, Inc., Illinois, USA). After cell wall disruption, the samples were centrifuged at 7,850 x g for 15 min at 5°C. The enzyme activity of the supernatant was determined. A mixture of 450 µL of a 4% (w/v) sucrose solution in 0.05 M citrate-phosphate buffer pH 6.0 and 50 µL of enzyme solution was incubated for 20 min at 35°C. Reducing sugars were measured by Somogyi method (Somogyi, 1945) using glucose as standard. One activity unit (U) of glucosyltransferase is defined as the amount of enzyme that liberates one µmol of reducing sugars/minute/mL of the enzyme from sucrose under standard assay conditions.

#### Production of cell biomass: growth determination and glucosyltransferase production under optimal culture medium in 6.6-L fermenter

Bacterial growth and glucosyltransferase activity were determined under optimal culture medium: sugar cane molasses (160 g/L), bacteriological peptone (20 g/L) and yeast extract Prodex Lac SD (15 g/L) on a bioreactor 6.6-L fermenter New Brunswick Bioflo IIc (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA). Two loop full of culture were inoculated in three 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium optimized each one and incubated in a rotatory shaker 200 rpm at 30°C for 15 hrs. An aliquot of 300 mL inoculum was transferred to 2.700 mL of culture medium optimized contained in a 6.6-L fermenter and incubated under the following conditions: temperature 26°C, initial pH 6.5, aeration rate 1 vvm, and agitation speed 200 rpm. Samples were collected at time-defined intervals and submitted to analysis. Aliquots (20 mL) of the culture broth were centrifuged at 7,850 x g for 15 min, at 5°C. The cell mass was washed twice with 20 mL of distilled water and re-suspended in 20 mL of distilled water. A Beckman DU 70 spectrophotometer (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) was used to monitor cell growth by measuring the optical density at 660 nm ( $OD_{660}$ ). Glucosyltransferase activity was estimated as described previously. The pH of the culture medium was measured with an Orion model 710A potentiometer (Orion Research Inc, Boston, MA, USA).

#### Performance of repeated batch operations using free cells

Duplicate repeated batch conversion runs were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing the mixture of 35% (w/v) sucrose solution and free-cell of *Erwinia* sp. D12 (sucrose solution:free-cell - 10:1). The flasks were maintained in a rotatory shaker at 150 rpm and 35°C for 15 min. At the end of each batch, samples were collected and submitted to analysis, the reaction mixture was centrifuged and the free-cells were used for the next batch conversion

of sucrose into isomaltulose with the fresh substrate. This process was repeated for several times.

#### Viable cell numbers, biomass, pH and HPLC-PAD analysis

Samples were submitted to serial dilutions and viable counts were performed by spread plate technique. The biomass (wet cell mass) was measured with a precision balance (Satorius AG, Goettingen, GE). The pH of the culture medium was measured with an Orion model 710A potentiometer (Orion Research Inc, Boston, MA, USA). The sugars analysis was performed with HPLC system consisted of a DIONEX DX-600 chromatograph equipped with a Electrochemical Detector ED50, a CarboPac™ PA 1 column (4 mm x 270 mm), and a CarboPac™ PA 1 guard column (4 mm x 500 mm), with a mobile phase of 200 mM NaOH solution and a flow rate of 1 mL/min at 20°C. The carbohydrates were analyzed from their retention times as compared to those of the fructose, glucose, sucrose and isomaltulose standards (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Culture medium optimization using response surface methodology

**First experimental design.** The experimental results of glucosyltransferase production by the first 2<sup>3</sup>-FCCD are shown in Table 1. The effect estimates for each variable: sugar cane molasses (SCM), bacteriological peptone (BP) and yeast extract Prodex Lac SD® (YEP), as well as the interaction between them, were determined and reported in Table 4. Both the *t*-test and *p*-value statistical parameters are used to confirm the significance of factors studied. All the independent variables had significant influence in glucosyltransferase activity ( $p < 0.05$ ), as well as the interactions between them. The increase in BP concentration from 10 to 50 g/L led to an increase in enzyme activity.

The parameter SCM (L) showed higher effect than SCM (Q) indicating that the increase the concentration from 100 to 250 g/L led to a decreased in glucosyltransferase production. The independent variable ELP showed the same effect. A model fitting was accomplished for the first 2<sup>3</sup>-FCCD in Table 1. The independent (glucosyltransferase activity) and the dependent variables were fitted to the second-order model equation and examined in terms of the goodness of fit. The analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the adequacy of the fitted model. The R-square value (determination coefficient) provided a measure of how much of the variability in the observed response values could be explained by the experiment factors and their interactions.

On the basis of ANOVA, as shown in Table 5, a second-order model was established (Equation 2) describing the

enzyme activity as a function of SCM, BP and YEP concentrations. The pure error was very low (0.002) indicating a good reproducibility of the experimental data. Based on the *F-test*, the model is predictive, since its calculated *F-value* is higher than the critical *F-value*. The coded model was used to generate response surfaces and contour curves for the analysis of the variable effects on glucosyltransferase activity:

$$y = 0.39 - 0.95x_1 + 0.52x_1^2 + 0.24x_2 + 0.34x_2^2 - 0.68x_3 - 0.27x_3 + 0.24x_1x_2 + 1.59x_1x_3 + 0.14x_2x_3 \quad [2]$$

where *y* is the predicted response (glucosyltransferase activity) and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  are the coded values of sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>, respectively. As can be seen in Figure 1 and Figure 2 an increase in sugar cane molasses and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> concentrations led to an decrease in enzyme activity. In the second experimental design, the concentration ranges of SCM, BP and YEP were decreased.

**Second experimental design.** The trials and results for the second 2<sup>3</sup>-FCCD are shown in Table 2. The effect estimates were determined and reported in Table 4. The analysis of the effects shows that an increase in the concentration of bacteriological peptone from 5 to 35 g/L and concentration of yeast extract from 10 to 50 g/L led to a decrease in glucosyltransferase activity. All interactions between SCM, BP and YEP were statistically significant for enzyme activity. To test the fit of the model the regression equation and determination coefficient (R-square) were calculated. The model presented high determination coefficient (R-square = 0.90) explaining 90% of the variability in the response (Table 6). The ANOVA of quadratic regression model demonstrates that the model is highly significant, as is evident from the *F-test*.

Based on these results the model can be utilized to generate response surfaces and contour curves for the analysis of the variable effects on glucosyltransferase activity. The response surface and contour curves were obtained using Equation 3:

$$y = 8.13 + 0.56x_1 - 0.64x_1^2 - 0.19x_2^2 - 0.33x_3 - 0.27x_1x_2 - 0.30x_1x_3 - 0.63x_2x_3 \quad [3]$$

It can be seen that an decrease in YEP led to an increase in enzyme activity and the best concentrations for SCM and BP were 135 to 190 g/L and 5 to 30 g/L, respectively.

**Third experimental design.** The trials and results for the third 2<sup>3</sup>-FCCD are shown in Table 3. According to the results obtained, the best conditions for glucosyltransferase production occurred in experiments 15, 16 and 17 corresponding to the central points. These experiments correspond to the cultivation medium composed by sugar cane molasses 160 g/L, bacteriological peptone 20 g/L and yeast extract Prodex Lac SD 15 g/L.

On the basis of the ANOVA, shown in Table 6, a second-order model (Equation 4) was established, describing the enzyme activity as a function of SCM, BP and YEP concentrations:

$$y = 7.28 - 1.05x_1 - 2.38x_1^2 - 1.56x_2^2 - 1.69x_3^2 - 0.68x_1x_2 \quad [4]$$

Based on the *F-test* the model is predictive, since the *F-value* calculated is 8.75 higher than the critical *F-value* and the determination coefficient 0.94 is close to unity. The pure error was very low, indicating a good reproducibility of the experimental data. The response surfaces and contour curves in Figure 5 and Figure 6 were obtained using Equation 4. It can be see that the maximum glucosyltransferase activity point is situated close to the central point.

The model predicted the maximum activity in culture medium composed by SCM (160 g/L), BP (20 g/L) and YEP (15 g/L) in the conditions studied. It was obtained 7.26 U/mL (average of the central points) after 8 hrs fermentation at 30°C.

#### Production of cell biomass: growth determination and glucosyltransferase production under optimal culture medium in 6.6-L fermenter

After optimization, fermentation kinetics was determined at the optimized conditions, as observed in Figure 7. Glucosyltransferase production and growth characteristics of *Erwinia* sp. D12 using culture medium optimized are illustrated. The glucosyltransferase production started at exponential growth phase and the enzyme activity was increased at the beginning of the cultivation (2 hrs of fermentation time) and reached a maximum level. Subsequently, the glucosyltransferase activity decreased slowly after 9 hrs of fermentation time. The highest enzyme activity was obtained after 9 hrs (29.88 U/mL) after inoculum and the activity was maintained constant, between 23-25 U/mL, until 14 hrs of fermentation time. Thereafter, the glucosyltransferase production was diminished and after 24 hrs de enzyme activity decreased to 16.06 U/mL. The pH of the culture medium was about 6.5-6.5 during fermentation, suggesting little production of acid as a by-product.

The activity value of 29.88 U/mL obtained from *Erwinia* sp D12 cells is approximately ten times higher than the one produced by Park et al. (1996) using strain *Klebsiella* sp. in a culture medium composed by 1% bacteriological peptone, 0.4% beef extract powder and 4% sucrose when they obtained 2.95 U/mL. Huang et al. (1998) examined the effects of carbon sources, inorganic salt and supplemental nitrogen sources on intracellular glucosyltransferase activity of *Klebsiella planticola* CCRC 19112. It was obtained a maximum glucosyltransferase activity of 11.08 U/mL using a culture medium composed by 1% bacto-tryptone, 7% sucrose, 3% tryptic soy broth and 0.5% NaCl.

Li et al. (2004) using the strain *Klebsiella* sp. LX3 cultured aerobically in the culture medium composed by 4% sucrose, 1% bacteriological peptone and 0.4% yeast extract. The authors determined the glucosyltransferase activity in cell culture, supernatant, cell-free extract and cell-debris fractions. The enzyme activity of the cell-debris fraction (19.2 U/mL) was almost identical to that of cell culture fraction (20.1 U/mL). This result suggesting that the glucosyltransferase is a cell wall bound enzyme. Moraes et al. (2005) obtained 15.6 U/mL of glucosyltransferase activity from *Erwinia* sp. cells incubated in 3.0-L fermenter containing culture medium composed by 12% sugar cane molasses, 4% bacteriological peptone and 0.4% beef extract, at 30°C 200 rpm and 1 vvm. Overall, in this work, sugar cane molasses (agro-industrial residue) and commercial yeast extract were used with the purpose of resulting in a low cost culture media. The cell mass obtained from the bioreactor fermentation was used in further studies to verify the conversion of sucrose into isomaltulose from free-cells.

#### Performance of repeated batch operations using free cells

The data obtained for 15 cycles of repeated batch operation shown in Table 8 and Figure 8 indicated that free cells were active and could be reused. The biomass (wet cell mass) decreased with the batches of operation for the first five cycles of operation and remained almost steady for the subsequent batches between 3.73 g and 3.33 g of wet cell mass. The pH of the medium reaction remained constantly between 6.0-6.5, however after seventy batches the pH decrease to 5.5 remained in this value suggesting little production of acid as a by-product. It can be observe that the growth as free cells did occur slowly (viable cell number) in the reaction medium between the first and the fifteenth batches. After eight batches the viable cell number diminished gradually. The wet cell mass and the viable cell number decreased but did not affect the conversion of sucrose into isomaltulose. Table 8 and Figure 8 show the high conversion of sucrose into isomaltulose between 73-79%. As can be verified the efficiency of production of isomaltulose increased after the first batch, leading to increases in the isomaltulose concentration and productivities (around 1.1 g/L x h) in the last batches. The highest conversion of sucrose into isomaltulose was 79.2% (batch number eight). The isomaltulose production using free *Erwinia* sp. cells was very efficient. It was obtained high yield from 35% sucrose solution with high speed about fifty minutes reaction time for complete conversion. Tsuyuki et al. (1992) obtained 63.9% isomaltulose using cells of *Klebsiella planticola* MX-10 incubated with 20% sucrose solution in 0.04 M calcium acetate buffer pH 5.6 at 20°C for 1 h incubation time. When 1 mL *Klebsiella planticola* CCRC 19221 cell suspension was incubated with 5 mL of a 50% sucrose solution at 40°C for 24 hrs incubation time with agitation it was obtained 76% of isomaltulose (Huang et al. 1998). Harvested cells of *Pantoea dispersa* UQ68J, *Protaminobacter rubrum*

CBS574.77 and *Erwinia rhapontici* WAC2928 (Wu and Birch, 2004) were resuspended in 0.2 mL citrate-fosphate buffer 0.1 mol/L and they were incubated with 0.2 mL of the same buffer containing 50% sucrose solution. After 20 min incubation time, the cell suspension of *Pantoea dispersa* UQ68J yielded 79% isomaltulose. In the same incubation time, *Protaminobacter rubrum* CBS574.77 accomplished 50% conversion, and *Erwinia rhapontici* WAC2928 accomplished only 2% conversion.

#### CONCLUDING REMARKS

With the aid of the experimental design and response surface methodology, the optimal concentrations of sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD® for the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. D12 were found to be 160 g/L, 20 g/L and 15 g/L, respectively. The highest glucosyltransferase activity was obtained at 30°C after 8 hrs of fermentation time. The results were satisfactory and the components sugar cane molasses and yeast extract Prodex Lac SD® are very useful carbon and nitrogen sources, respectively to enzyme production. Maximum glucosyltransferase activity of 29.88 U/mL was achieved in a 6.6-l fermenter using the optimized medium at 26°C, 200 rpm agitation, and 1 vvm aeration rate. The free *Erwinia* sp. D12 cells supported high production levels in repeated batch operations and the results showed potential for repeated reuse of free-cells.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Prodesa Produtos Especiais para Alimentos S/A for the supply of the yeast extract Prodex Lac SD®.

#### REFERENCES

- AHN, Seung-Joon; YOO, Ji-Hyun; LEE, Hyeon-Cheol; KIM, Sang-Yong; NOH, Bong-Soo; KIM, Jung-Hoe and LEE, Jung-kul. Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapontici*. *Biotechnology Letters*, July 2003, vol. 25, no. 14, p. 1179-1183.
- CHEETHAM, Peter S.J.; IMBER, Carol E. and ISHERWOOD, Jamie. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. *Nature*, October 1982, vol. 299, no. 5884, p. 628-631.
- CHEETHAM, Peter S.J.; GARRETT, Christine and CLARK, Jeremy. Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotechnology and Bioengineering*, April 1985, vol. 27, no. 4, p. 471-481.
- HUANG, J.-H.; HSU, L.-H. and SU, Y.-C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, August 1998, vol. 21, no. 1-2, p. 22-27.
- KAKINUMA, Hiroyuki; YUASA, Hideya and HASHIMOTO, Hironobu. Glycosyltransfer mechanism of

Kawaguti, H.Y. et al.

$\alpha$ -glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. *Carbohydrate Research*, November 1998, vol. 312, no. 3, p. 103-115.

KRASTANOV, Albert and YOSHIDA, Toshiomi. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, October 2003, vol. 30, no. 10, p. 593-598.

LI, Xianzhen; ZHANG, Daohai; CHEN, Feng; MA, Jie; DONG, Yihu and ZHANG, Lianhui. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, November 2004, vol. 54, no. 6, p. 2131-2136.

MCALLISTER, M.; KELLY, C.T.; DOYLE, E. and FOGARTY, W.M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. *Biotechnology Letters*, September 1990, vol. 12, no. 9, p. 667-672.

MORAES, Ana Lúcia Leite; STECKELBERG, Cláudia; SATO, Hélia Harumi and PINHEIRO, Andreina. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwiniasp* D12 imobilizada com alginato de cálcio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, January-March 2005, vol. 25, no. 1, p. 95-102.

PARK, Y.K.; UEKANE, R.T. and SATO, H.H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to patatinose. *Revista de Microbiologia*, April-June 1996, vol. 27, p. 131-136.

RAO, K. Jagannadha; KIM, Chul-Ho and RHEE, Sang-Ki. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochemistry*, February 2000, vol. 35, no. 7, p. 639-647.

SOMOGYI, Michael. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, September 1945, vol. 160, no. 1, p. 61-68.

TSUYUKI, K.; SUGITANI, T.; MIYATA, Y.; EBASHI, T. and NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of Isomaltulose- and trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. *Journal of General and Applied Microbiology*, October 1992, vol. 38, no. 5, p. 483-490.

WU, L. and BIRCH, R.G. Characterization of *Pantoeae dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, July 2004, vol. 97, no. 1, p. 93-103.

ZHAO, C.; ZHANG, D. and LI, X. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3. *Journal of Applied Microbiology*, September 2003, vol. 95, no. 3, p. 521-527.

.....  
.....  
.....



APPENDIX

FIGURES

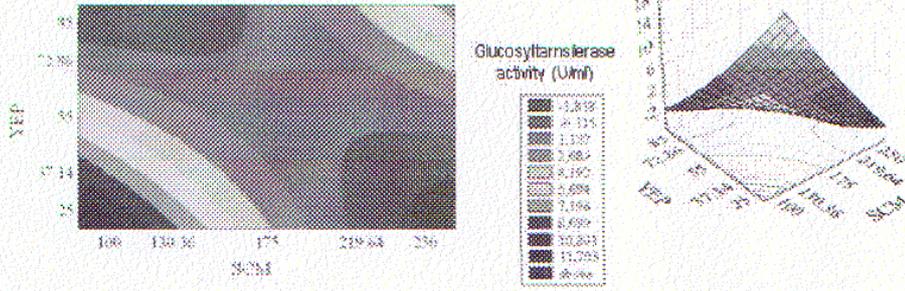


Figure 1. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of sugar cane molasses (SCM) and yeast extract Prodex Lac SD (YEP) concentrations, according to the first experimental design.

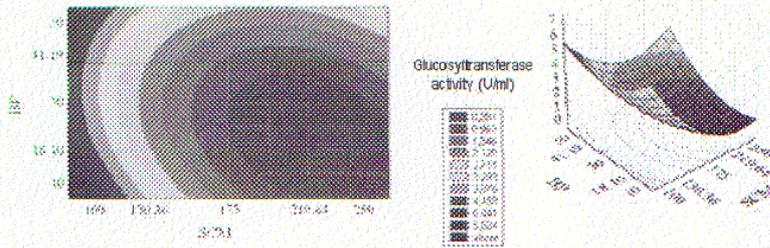


Figure 2. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of sugar cane molasses (SCM) and bacteriological peptone (BP) concentrations, according to the first experimental design.

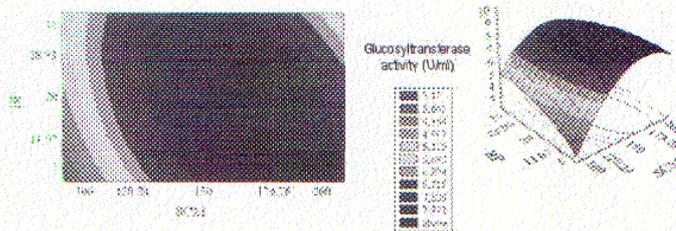


Figure 3. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of sugar cane molasses (SCM) and bacteriological peptone (BP) concentrations, according to the second experimental design.



Glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose

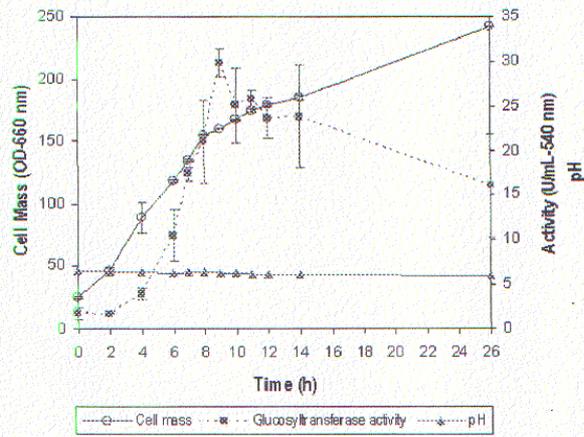


Figure 7. Time profile of fed-batch fermentation in 6.6-L fermenter using optimized medium.

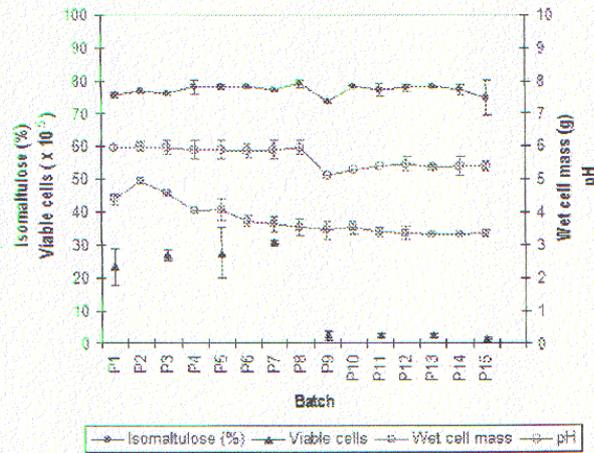


Figure 8. Repeated batch conversion of sucrose to isomaltulose using free *Erwinia* sp. D12 cells.



## TABLES

Table 1. Coded levels and real values (in parentheses) for the first factorial design (17 trials) and glucosyltransferase activity (U/mL).

Assay	Variable (g/L)			Enzyme activity (U/mL)
	SCM <sup>a</sup>	BP <sup>b</sup>	YEP <sup>c</sup>	
1	-1 (130.36)	-1 (18.10)	-1 (37.14)	5.63
2	+1 (219.64)	-1 (18.10)	-1 (37.14)	0.13
3	-1 (130.36)	+1 (41.90)	-1 (37.14)	5.97
4	+1 (219.64)	+1 (41.90)	-1 (37.14)	0.20
5	-1 (130.36)	-1 (18.10)	+1 (72.86)	0.63
6	+1 (219.64)	-1 (18.10)	+1 (72.86)	0.28
7	-1 (130.36)	+1 (41.90)	+1 (72.86)	0.32
8	+1 (219.64)	+1 (41.90)	+1 (72.86)	2.12
9	-1.68 (100)	0 (30)	0 (55)	2.26
10	+1.68 (250)	0 (30)	0 (55)	0.38
11	0 (175)	-1.68 (10)	0 (55)	0.41
12	0 (175)	+1.68 (50)	0 (55)	1.19
13	0 (175)	0 (30)	-1.68 (25)	0.85
14	0 (175)	0 (30)	+1.68 (85)	0.40
15	0 (175)	0 (30)	0 (55)	0.42
16	0 (175)	0 (30)	0 (55)	0.47
17	0 (175)	0 (30)	0 (55)	0.48

<sup>a</sup>sugar cane molasses, <sup>b</sup>bacteriological peptone, <sup>c</sup>yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>

Table 2. Coded levels and real values (in parentheses) for the second factorial design (17 trials) and glucosyltransferase activity (U/mL).

Assay	Variable (g/L)			Enzyme activity (U/mL)
	SCM <sup>a</sup>	BP <sup>b</sup>	YEP <sup>c</sup>	
1	-1 (120.24)	-1 (11.07)	-1 (18.10)	6.34
2	+1 (179.76)	-1 (11.07)	-1 (18.10)	8.28
3	-1 (120.24)	+1 (28.93)	-1 (18.10)	7.56
4	+1 (179.76)	+1 (28.93)	-1 (18.10)	8.97
5	-1 (120.24)	-1 (11.07)	+1 (41.90)	7.39
6	+1 (179.76)	-1 (11.07)	+1 (41.90)	8.68
7	-1 (120.24)	+1 (28.93)	+1 (41.90)	6.63
8	+1 (179.76)	+1 (28.93)	+1 (41.90)	6.28
9	-1.68 (100)	0 (20)	0 (30)	4.99
10	+1.68 (200)	0 (20)	0 (30)	7.01
11	0 (150)	-1.68 (5)	0 (30)	7.06
12	0 (150)	+1.68 (35)	0 (30)	7.47
13	0 (150)	0 (20)	-1.68 (10)	8.47
14	0 (150)	0 (20)	+1.68 (50)	7.06
15	0 (150)	0 (20)	0 (30)	8.43
16	0 (150)	0 (20)	0 (30)	8.23
17	0 (150)	0 (20)	0 (30)	7.83

<sup>a</sup>sugar cane molasses, <sup>b</sup>bacteriological peptone, <sup>c</sup>yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>

Glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose

Table 3. Coded levels and real values (in parentheses) for the third factorial design (17 trials) and glucosyltransferase activity (U/mL).

Assay	Variable (g/L)			Enzyme activity (U/mL)
	SCM <sup>a</sup>	BP <sup>b</sup>	YEP <sup>c</sup>	
1	-1 (130.24)	-1 (11.07)	-1 (9.05)	4.23
2	+1 (189.76)	-1 (11.07)	-1 (9.05)	3.97
3	-1 (130.24)	+1 (28.93)	-1 (9.05)	5.07
4	+1 (189.76)	+1 (28.93)	-1 (9.05)	3.87
5	-1 (130.24)	-1 (11.07)	+1 (20.95)	4.85
6	+1 (189.76)	-1 (11.07)	+1 (20.95)	4.23
7	-1 (130.24)	+1 (28.93)	+1 (20.95)	5.53
8	+1 (189.76)	+1 (28.93)	+1 (20.95)	3.15
9	-1.68 (110)	0 (20)	0 (15)	4.89
10	+1.68 (210)	0 (20)	0 (15)	3.27
11	0 (160)	-1.68 (5)	0 (15)	6.14
12	0 (160)	+1.68 (35)	0 (15)	4.32
13	0 (160)	0 (20)	-1.68 (5)	5.19
14	0 (160)	0 (20)	+1.68 (25)	4.91
15	0 (160)	0 (20)	0 (15)	7.47
16	0 (160)	0 (20)	0 (15)	7.12
17	0 (160)	0 (20)	0 (15)	7.19

<sup>a</sup>sugar cane molasses; <sup>b</sup>bacteriological peptone; <sup>c</sup>yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

Table 4. Main effects and interactions analysis for glucosyltransferase activity from the first and second factorial designs.

First factorial design					Second factorial design				
Factor	Effect	Std. Err.	t-value	p-value	Factor	Effect	Std. Err.	t-value	p-value
(1)SCM <sup>a</sup> (L)	-1.90	0.02	-118.74	0.00007*	(1)SCM (L)	1.13	0.17	6.82	0.02082**
SCM (Q)	1.04	0.02	59.08	0.00029*	SCM (Q)	-1.28	0.18	-7.01	0.01972**
(2)BP <sup>b</sup> (L)	0.48	0.02	29.69	0.00113*	(2)BP (L)	-0.08	0.17	-0.49	0.67433
BP (Q)	0.68	0.02	38.31	0.00068*	BP (Q)	-0.38	0.18	-2.08	0.17278**
(3)YEP <sup>c</sup> (L)	-1.37	0.02	-85.28	0.00014*	(3)YEP (L)	-0.66	0.17	-4.01	0.05682**
YEP (Q)	0.55	0.02	31.06	0.00104*	YEP (Q)	-0.02	0.18	-0.13	0.90632
(1) x (2)	0.47	0.02	22.61	0.00195*	(1) x (2)	-0.54	0.22	-2.51	0.12869**
(1) x (3)	3.18	0.02	151.86	0.00004*	(1) x (3)	-0.60	0.22	-2.79	0.10795**
(2) x (3)	0.28	0.02	13.44	0.00549*	(2) x (3)	-1.27	0.22	-5.88	0.02772

<sup>a</sup>sugar cane molasses; <sup>b</sup>bacteriological peptone; <sup>c</sup>yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup>.

(L): linear factor

(Q): quadratic factor

\*Significant factors (p < 0.05)

\*\*Significant factors (p < 0.20)

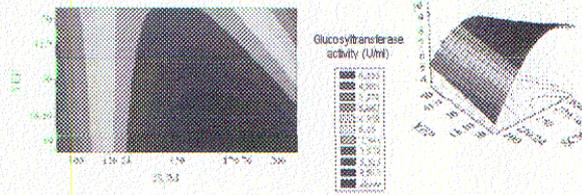


Figure 4. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of sugar cane molasses (SCM) and yeast extract Prodex Lac SD (YEP) concentrations, according to the second experimental design.

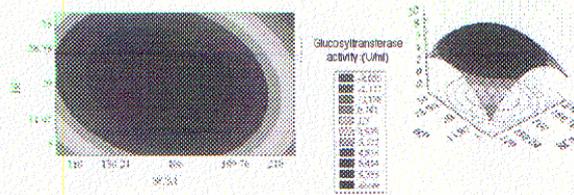


Figure 5. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of sugar cane molasses (SCM) and bacteriological peptone (BP) concentrations, according to the third experimental design.

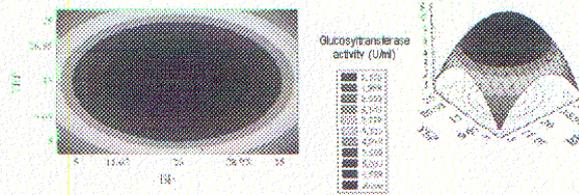


Figure 6. Contour curve and response surface for the glucosyltransferase activity as a function of bacteriological peptone (BP) and yeast extract Prodex Lac SD (YEP) concentrations, according to the third experimental design.



Table 5. ANOVA for the first factorial design.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	45.53	8	5.69	7.06 <sup>a</sup>
Residual	6.45	8	0.81	
Lack of fit	6.44	6	1.07	
Pure error	0.002	2	0.001	
Total	51.97	16		

Determination coefficient:  $R^2 = 0.85$ ;  $F_{0.95,8,8} = 3.44$ .  
<sup>a</sup>F-ratio (regression/residual).

Table 6. ANOVA for the second factorial design.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	15.75	6	2.63	19.13 <sup>a</sup>
Residual	1.37	10	0.14	
Lack of fit	1.56	8	0.19	
Pure error	0.19	2	0.09	
Total	17.12	16		

Determination coefficient:  $R^2 = 0.90$ ;  $F_{0.95,6,10} = 4.37$ .  
<sup>a</sup>F-ratio (regression/residual).

Table 7. ANOVA for the third factorial design.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	24.84	4	6.21	28.53 <sup>a</sup>
Residual	2.61	12	0.28	
Lack of fit	2.55	10	0.25	
Pure error	0.07	2	0.03	
Total	27.45	16		

Determination coefficient:  $R^2 = 0.94$ ;  $F_{0.95,4,12} = 3.26$ .  
<sup>a</sup>F-ratio (regression/residual).

Table 8. Conversion performance of the free cell system during the fifteen successive conversion batches of sucrose to isomaltulose.

	Batch															
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	6 <sup>th</sup>	7 <sup>th</sup>	8 <sup>th</sup>	9 <sup>th</sup>	10 <sup>th</sup>	11 <sup>th</sup>	12 <sup>th</sup>	13 <sup>th</sup>	14 <sup>th</sup>	15 <sup>th</sup>	
Sucrose consumed (%)	95,1	97,4	96,9	98,8	100,0	100,0	100,0	98,5	94,6	100,0	98,1	99,2	100,0	98,6	95,5	
Isomaltulose produced (%)	75,6	76,7	76,2	78,3	78,1	78,2	77,1	79,2	73,4	78,2	77,3	77,8	78,3	77,3	74,8	
Productivity (g/L x h) <sup>a</sup>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	

<sup>a</sup>Productivity (isomaltulose concentration/incubation time).

## Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production

Haroldo Yukio Kawaguti\*, Michele Ferrari Buzzato, Daniela Castilho Orsi,  
Gaby Tiemi Suzuki, Hélia Harumi Sato

Laboratory of Food Biochemistry, Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP),  
Rua Monteiro Lobato 80, CEP 13083-862, C.P.6121, Campinas, Brazil

Received 21 January 2006; received in revised form 24 April 2006; accepted 3 May 2006

### Abstract

Isomaltulose is a reducing disaccharide commercially produced from the enzymatic conversion of sucrose, catalyzed by a microbial glucosyltransferase. It is naturally found in small quantities in sugar cane extracts and honey. Not only does it have a low cariogenic potential, but it is also used in the food industry as a sucrose substitute. In this study, the concentrations of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde in the process of alginate cell immobilization were optimized with the aid of an experimental design and response surface methodology. The highest conversion rate of sucrose into isomaltulose occurred after 12 h conversion in Erlenmeyer flasks at 30 °C with 150 rpm agitation. The statistical analysis at a confidence level of 90% produced a correlation coefficient of 0.90, and the polynomial model indicated 0.06% of glutaraldehyde as being the best concentration of this additive for the immobilization procedure. Under these conditions the immobilized cells showed better stability, and maintained a conversion rate above 50% after 282 h, as compared to cells without the additive.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Additives; Experimental design; Immobilized cells; Isomaltulose; Packed-bed column; Response surface methodology

### 1. Introduction

Isomaltulose is not only a reducing disaccharide but also a structural isomer of sucrose. Naturally found in small quantity in honey, sugar cane extracts and other fluids rich in sugar, it is of great interest as a food ingredient, substituting sucrose. As for the sensory and physical–chemical properties of isomaltulose, they are similar to those of sucrose, the former showing about half the sweetness of the latter. Moreover, isomaltulose is less hygroscopic than sucrose [1].

Isomaltulose is non-cariogenic; bacteria of the oral flora are unable to metabolize this sugar, preventing injury to the teeth enamel [2,3]. It also has a low glycemic rate, meaning that the velocity of the formation of monosaccharides in the blood plasma is slower than for sucrose [4]. Thus, insulin release is relatively reduced when compared to the administration of

other sugars, making its use possible for diabetics as well as for foods and drinks for sports adepts [5]. Its ingestion selectively promotes the growth of the intestinal flora, including that of the bifidobacteria [6]. Since its stability is higher than that of sucrose due to its higher stability to acids and resistance to microbial metabolism, it protects the sweetness and taste of both fermented foods and drinks [1]. It may be converted by hydrogenation to a non-cariogenic sugar alcohol of low caloric value called Isomalt<sup>®</sup>, an equimolar mixture of  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1,6-sorbitol and  $\alpha$ -glucopyranosyl-1,2-mannitol, used in dietetic and pharmaceutical products. The safety of applying isomaltulose in the diet has been carefully studied and verified, resulting in its unqualified approval for use as human food [7]. It is currently used commercially as a sucrose replacement in foods, drinks and pharmaceutical products [8].

Isomaltulose is produced from sucrose in a reaction involving an enzyme named isomaltulose synthase (EC 5.4.99.11), also known as  $\alpha$ -glucosyltransferase, sucrose isomerase and sucrose mutase [5]. The chemical synthesis of isomaltulose is rather demanding, but a small group of bacteria

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 2175; fax: +55 19 3788 2153.  
E-mail address: kawaguti@fea.unicamp.br (H.Y. Kawaguti).

exists, that is capable of producing this sucrose isomer. They include *Protaminobacter rubrum* [9], *Erwinia rhapsontici* [10], *Serratia plymuthica* [11], *Klebsiella planticola* [12] and *Pantoea dispersa* [13]. There has been a vested interest in this microbial transformation, and it has already been produced on an industrial scale in reactors using immobilized cells, allowing for the continuous use of the cells and impeding product contaminations, making immobilization a very advantageous procedure. Furthermore, this process stabilizes the bio-catalysis as well as maintaining the cells uniformly distributed in the reactor, so that each molecule of the enzyme is provided with an equal substrate supply [14]. According to the literature, the use of additives in cell immobilization is beneficial, increasing stability and resulting in a longer period of conversion as compared to cells without treatment with additives [15]. In a preliminary study, it was shown that the addition of polyethylenimine and glutaraldehyde contributed to the increase in stability of the immobilized cells, as cross-linking agents. Subsequently, the concentration of these additives was optimized in shaken flasks with, verifying the shelf-life of the cells immobilized in a packed bed reactor, as described below.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism

A stock culture of *Erwinia* sp. D12, which is capable of converting sucrose into isomaltulose, was maintained on a medium containing 6% (w/v) sucrose, 4% (w/v) peptone, 0.4% (w/v) meat extract and 2% (w/v) agar, incubating for 15 h at 30 °C. After incubation, sterile vaseline was added to the tubes. The cultures were maintained at 5 °C.

### 2.2. Cell mass production

In order to obtain cells of *Erwinia* sp. D12 containing intracellular glucosyl-transferase, the cultivation of the microorganism was studied in a New Brunswick Bioflo IIc 6.6-l capacity fermenter, in a medium composed of sugar cane molasses (160 g/l), bacteriological peptone Biobrás (20 g/l) and yeast extract Prodex Lac SD (15 g/l). A loopful of the *Erwinia* sp. D12 culture grown in the medium described in Section 2.1 was inoculated into 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the medium. The flasks were incubated in a rotary shaker at 30 °C and 200 rpm for 15 h. A 300 ml aliquot was aseptically transferred into a 6.6-l fermenter containing 2700 ml of the optimized culture medium. Fermentation occurred at 26 °C, with constant agitation and aeration at 200 rpm and 1 vvm, respectively. After 10 h of fermentation, the cell mass was separated by centrifugation for 15 min at 9650 × g at 5 °C and then washed twice with sterile water. The wet cells obtained were used in the following experiments.

### 2.3. Effects of the treatments with additives on the stability of the immobilized cells and on the conversion of sucrose to isomaltulose

#### 2.3.1. The influence of the addition of additives on cell immobilization for the conversion of sucrose to isomaltulose

For the preliminary study of the effects of additives on cell immobilization, 40% (w/v) wet cells of *Erwinia* sp. D12 suspended in sterile distilled water, as described in Section 2.2, were mixed with a 2% (w/v) sterile solution of Synth sodium alginate containing 0.1% (w/v) of Tween 80, in the volume proportion of 1:2. Immobilization was carried out with the aid of a peristaltic pump. The mixture was extruded through silicone tubing and dripped into a 2% (w/v) calcium chloride solution to form small 3 mm diameter beads, which were maintained immersed in the same solution for 24 h at 5 °C. A 100 g sample of

the immobilized cells was treated with a 0.75% (w/v) solution of polyethylenimine for 5 min. The granules were then washed with sterile distilled water, treated with a 0.25% (v/v) glutaraldehyde solution for 20 min and finally washed with sterilized distilled water again. Another 100 g sample of the immobilized cells suffered no treatment with additives. Both cell samples, treated and non-treated with additives, were transferred to two packed bed reactors (150 mm × 30 mm). A 35% (w/v) sucrose solution was then passed through the reactors in an ascending flow of approximately 20 ml/h. The column temperatures were maintained at 30 °C and the conversion of sucrose into isomaltulose was observed during 192 h.

#### 2.4. The influence of additive concentration on the conversion of sucrose into isomaltulose determined by response surface methodology

An experiment was conducted using an experimental design and response surface methodology to optimize the concentrations of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde. The *Erwinia* sp. D12 cells were immobilized as described above. The beads were washed with sterile distilled water and treated with different concentrations of the additives as shown in Table 1. For each assay, 100 ml of each additive solution were used to treat 20 g of immobilized cells. After treatment with the additives, the immobilized cell granules were washed with distilled water and re-suspended in 50 ml of a 35% sucrose solution in flasks and shaken at 150 rpm and 30 °C. Aliquots were taken at 12, 24 and 36 h reaction and the isomaltulose production determined as described in Section 2.6.

##### 2.4.1. Experimental design and response surface methodology

Response surface methodology (RSM) is a technique for optimization based on factorial planning using a modelling process. RSM has two different stages, modelling and displacement, which are repeated as many times as necessary, with the aim of achieving the best area of the studied surface. Modelling is usually carried out by adjusting to simple models (linear and polynomial of a secondary order or quadratic) and the responses obtained by factorial planning. Displacement always occurs in the direction of the maximum inclination of a determined model, in which the response varies in a sharper way.

A central composite design for  $k$  factors, duly codified as  $(x_1, \dots, x_k)$ , is formed of three parts: one is factorial (or cubic), having a total of  $n_{\text{factorial}}$  coordinated points, in which  $x_i = -1$  or  $x_i = +1$ , for all the  $i = 1, \dots, k$ ; an axial part (or star), formed by

$$n_{\text{axial}} = 2k \quad (1)$$

which represents the points with all the null coordinates, except one, which is equal to a certain value  $\alpha$  (or  $-\alpha$ ), in which

$$\alpha = n_{\text{factorial}}^{1/4} \quad (2)$$

Table 1

Coded levels and real values (in brackets) for the  $2^2$  central composite design (11 trials) for the conversion of sucrose into isomaltulose using additive-treated immobilized cells

Assay	Variable (%)		Isomaltulose yield (%)		
	Polyethylenimine	Glutaraldehyde	12 h	24 h	36 h
1	-1 (0.10)	-1 (0.06)	65.92	56.65	52.30
2	+1 (0.65)	-1 (0.02)	38.99	47.27	49.41
3	-1 (0.10)	+1 (0.11)	68.35	61.75	63.18
4	+1 (0.65)	+1 (0.11)	45.89	50.77	51.58
5	-1.41 (0)	0 (0.06)	72.27	56.96	55.73
6	+1.41 (0.75)	0 (0.06)	33.25	47.83	52.76
7	0 (0.38)	-1.41 (0)	32.54	45.01	44.65
8	0 (0.38)	+1.41 (0.13)	42.08	58.40	47.69
9	0 (0.38)	0 (0.06)	58.52	48.76	47.69
10	0 (0.38)	0 (0.06)	61.33	47.02	47.89
11	0 (0.38)	0 (0.06)	57.17	50.48	48.49



and a total of  $n_{\text{central}}$  assays made at the central point, where  $x_1 = \dots = x_k = 0$ . The dependent variables  $X_i$  were codified according to the following equation, in which  $X_0$  corresponds to the value of the central point:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta x_i, \quad i = 1, 2, 3, \dots, k \quad (3)$$

where  $x_i$  corresponds to the non-dimensional value of the independent variable;  $X_i$  is the real value of the independent variable;  $X_0$  is the real value of the independent variable at the central point and  $\Delta x_i$  corresponds to the variation in the real value of the variable  $i$ , equivalent to a variation of one unit in the non-dimensional value of the variable  $i$ . The complete quadratic model for  $k$  factors is given by the following equation:

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

where the  $\beta$  values are estimated from the polynomial coefficients and the values for  $x_i$  represent the codified values. The data were analyzed using the STATISTICA software (5.0-StatSoft version). After additive optimization, conversion in the packed-bed columns with and without additive treated cells was compared.

### 2.5. The influence of the additive glutaraldehyde on cell immobilization for conversion of sucrose into isomaltulose

After optimization of the concentration of the additive in cell immobilization using an experimental design and response surface methodology, the conversion of sucrose to isomaltulose and the half-life of the column of immobilized cells with and without glutaraldehyde were evaluated. The cells were immobilized as described in Section 2.3.1. About 100 g of the cells were then treated with 500 ml of 0.06% (v/v) glutaraldehyde for 20 min. Another 100 g sample was not treated with the additive. The (100 g) samples of beads containing immobilized cells were then washed with distilled water and packed into packed-bed reactors as described previously (15 cm  $\times$  3 cm diameter). A 35% (w/v) sucrose solution was then circulated through the reactors in an ascending flow at a rate of 20 ml/h, and the conversion continued for 282 h. The temperature of the column was maintained at 30 °C. The conversion of sucrose to isomaltulose was determined as described in Section 2.6.

### 2.6. Carbohydrate analysis

The sugars were determined using HPLC-PAD. The HPLC analysis was performed using a DIONEX-DX 600 chromatograph with an IP25 isocratic pump and electrochemical detector. The sugars were separated using a Carbo Pac™ PA1 column (4 mm  $\times$  270 mm), Carbo Pac™ PA1 guard column and a 400 mM sodium hydroxide solution as the mobile phase. The flow rate was 1 ml/min at 20 °C. The carbohydrates were analyzed from their retention times as compared to those of the fructose, glucose, sucrose and isomaltulose standards (Sigma Ultra<sup>®</sup> – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

## 3. Results and discussions

### 3.1. The influence of the addition of additives on cell immobilization for the conversion of sucrose to isomaltulose

The influence of the additives on the immobilized cells was evaluated by comparing the effects on cell stability and the conversion of sucrose into isomaltulose. Fig. 1 compares the conversion by immobilized cells treated and not treated with polyethylenimine and glutaraldehyde and packed into packed-bed columns. Non-treated cells resulted in the highest conversion of 60.54% at 12 h. The conversion rate remained high until 60 h, when it was 47.96%. At 108 h there was a slight increase in the rate of isomaltulose conversion, probably due to a decrease in the flow rate. However, it seems that at 72 h, at

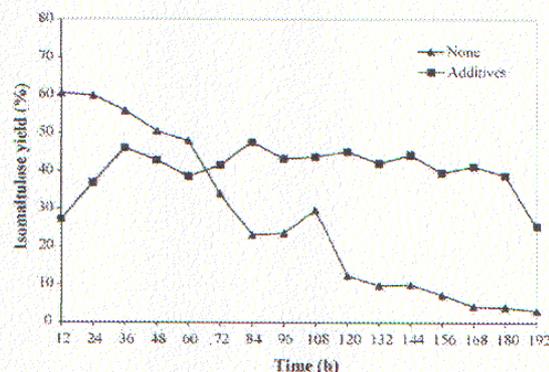


Fig. 1. Sucrose to isomaltulose conversion using cells immobilized in calcium-alginate in a packed-bed reactor: influence of the use of the additives glutaraldehyde and polyethylenimine.

which point the conversion rate was 33.94%, there was a gradual decrease in the rate of isomaltulose formation, reaching 3.15% conversion at 192 h.

The packed-bed columns containing additive treated immobilized cells showed better stability, but compared to the non-treated cell columns, the conversion rate was lower, being 27.15% at 12 h and then gradually increasing to a maximum of 47.86% at 84 h. The rate remained stable between 40% and 45% until 168 h, and then decreased reaching 25.18% at 192 h. Treatment of the cells with the additives polyethylenimine and glutaraldehyde resulted in a significant increase in the stability of the immobilized cells. After this study, in which the positive effect of the addition of the additives on the conversion of sucrose to isomaltulose was verified, the influence of the concentration of the additives on cell immobilization was evaluated with the aid of an experimental design and response surface methodology.

### 3.2. The influence of additive concentration on the conversion of sucrose into isomaltulose determined by response surface methodology

An experimental design and response surface methodology were used in the study of the effect of additives on the immobilized cells used in the conversion of sucrose into isomaltulose, in order to determine the optimal levels of polyethylenimine and glutaraldehyde required to obtain better stability of the immobilized cells. The  $2^2$  central composite design ( $2^2$ -CCD) presented in Table 1 was used to evaluate both the independent variables polyethylenimine and glutaraldehyde and the dependent variable or response for the conversion of sucrose to isomaltulose.

The  $2^2$ -CCD resulted in a set of 11 experiments, with 4 factorial points, 3 replications at the central point, employed to estimate the pure error and consequently the analysis of variance, and 4 axial points ( $\alpha = 1.41$ ), to obtain the linear or quadratic model resulting in a response surface and contour curve after verification of the model. The conversion of sucrose



Table 2

Estimated effects, standard errors, Student's *t*-test and *p*-test calculated for the 2<sup>2</sup> central composite design

Factor	Effect	Standard error	<i>t</i> -Value	<i>p</i> -Value
(1)				
Polyethylenimine (L) <sup>a</sup>	58.9673	1.2256	48.1143	0.0004
Polyethylenimine (Q) <sup>a</sup>	-26.1802	1.5033	-17.4155	0.0033
(2)				
Glutaraldehyde (L)	-1.2958	1.7938	-0.7224	0.5451
Glutaraldehyde (Q) <sup>a</sup>	5.7092	1.5033	3.7978	0.0629
(1) × (2) <sup>a</sup>	-16.8387	1.7938	-9.3872	0.0112

(L) linear factor; (Q) quadratic factor.

<sup>a</sup> Significant factors (*p* < 0.10).

into isomaltulose was determined at 12, 24 and 36 h, but since the highest conversion was observed at 12 h, the statistical analysis was evaluated at this point. Furthermore, the conversion of sucrose into isomaltulose showed a minimum of 38.99% for assay 2 (0.65% polyethylenimine and 0.02% of glutaraldehyde) and a maximum of 72.27% for assay 5 (0% polyethylenimine and 0.06% of glutaraldehyde) both at 12 h of fermentation. The concentrations of polyethylenimine and glutaraldehyde evaluated and the decoded values are shown in Table 1.

Table 2 presents the estimates of the main effects in the conversion of sucrose into isomaltulose. The analysis of variance (ANOVA) is shown in Table 3 and the significance level of each coefficient was determined using Student's *t*-tests. By comparing the *p*-values for all the parameters, only glutaraldehyde (L) was shown to have a significant effect (*p* < 0.10). The *R*<sup>2</sup> (coefficient of determination) of the regression equation obtained from ANOVA was also high since there was a highly significant value for *F*. Moreover, both the pure error (9.01) and the lack of fit (206.30) were low in comparison to the regression (1846.40), showing that this equation could be used efficiently to predict the response of the independent variables.

The coefficient of determination (*R*<sup>2</sup>) obtained was 0.90, which means that the model explained 90% of the variation in the response. Also, the low value for the pure error shows good reproducibility of the experimental data. In order to confirm the validation and adequacy of the model to represent the system, the analysis of variance and *F*-test were carried out. The Fisher

Table 3

Analysis of variance (ANOVA) and regression analysis for the 2<sup>2</sup> central composite design

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	<i>F</i> -test <sup>a</sup>
Regression	1846.40	03	615.47	20.01
Residual	215.31	07	30.76	
Lack of fit	206.30	05	41.26	9.14
Pure error	9.01	02	4.51	
Total	2061.71	10		

Coefficient of determination: *R*<sup>2</sup> = 0.90.

<sup>a</sup>  $F_{0.90;3;7}(F_{\text{tabulated}}) = 3.26$ .

*F*-test ( $F_{3,7} = 20.01 > F_1 = 3.26$ ) was 6.51 times higher than the *F*<sub>1</sub>, which is considered excellent for a confidence level of 90%. This value ensured a satisfactory adjustment of the quadratic model to the experimental data. After ANOVA and the validation of the study parameters, the following regression equation was obtained:

$$y = 58.97 - 13.09x_1 + 2.85x_2 - 8.49x_1^2 \quad (5)$$

where *y* was the predicted response for the isomaltulose yield (%) and *x*<sub>1</sub> and *x*<sub>2</sub> were the coded values for polyethylenimine and glutaraldehyde, respectively. From the coded model, both the response surface and contour curve were then plotted (Fig. 2). It was observed that in the additive concentration range studied, the production of isomaltulose was enhanced at low levels of polyethylenimine (below 0.1%), with a tendency to be optimum when the concentration was zero. Table 1 shows that the lower the concentration of polyethylenimine, the higher the conversion of sucrose at 12 h. The highest conversion of 72.27% occurred in assay 5, which contained only 0.06% of glutaraldehyde and no polyethylenimine. Fig. 2 shows that the ideal concentration for glutaraldehyde would be 0.06%. Based on the results of the response surface methodology for the additive concentrations, immobilized cells with 0.06% of glutaraldehyde were tested in terms of the conversion rate and cell stability.

### 3.3. The influence of the additive glutaraldehyde on cell immobilization in the conversion of sucrose to isomaltulose

Fig. 3 shows the conversion of sucrose into isomaltulose using cells immobilised in calcium alginate, comparing cells

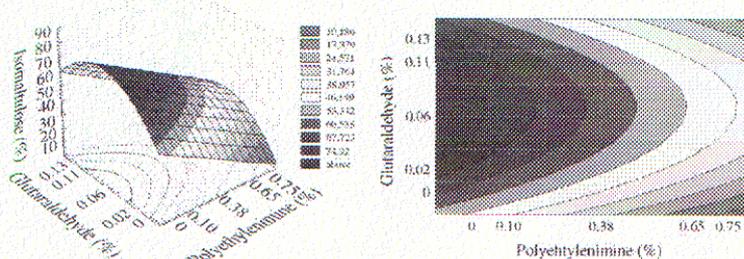


Fig. 2. Response surface and contour curve for isomaltulose yield as a function of polyethylenimine and glutaraldehyde concentrations.



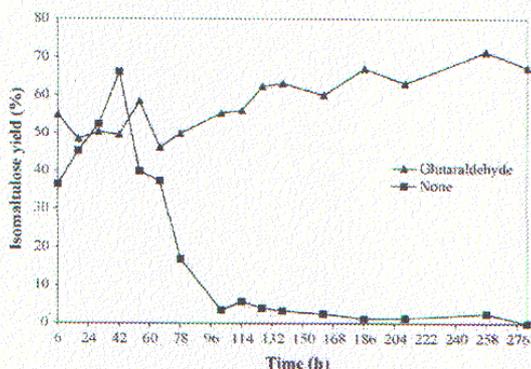


Fig. 3. Sucrose to isomaltulose conversion using cells immobilized in calcium-alginate in a packed-bed reactor after optimization of glutaraldehyde concentration on immobilization.

treated with 0.06% of glutaraldehyde with non-treated cells. The maximum conversion rate of 66.08% of the 35% sucrose solution was obtained with non-treated cells at 42 h. Nevertheless, the column stability was low, resulting in a rapid decline in the conversion rate with time, from 37.33% at 66 h to 0% conversion at 282 h. The initial conversion rate in the column with immobilized cells treated with 0.06% of glutaraldehyde was 54.78% at 6 h, remaining stable at between 45% and 60% up to 114 h. After this point, a gradual increase in sucrose conversion occurred, reaching 71.42% at 258 h. Comparing these results with those of the preliminary study, it was verified that the consequence of the optimization of the additive by response surface methodology was to enhance the conversion of sucrose into isomaltulose and obtain better stability of the packed-bed column containing the immobilized cells. The reduction in the conversion rate of sucrose into isomaltulose that occurred with the non-glutaraldehyde-treated immobilized cells could have been due to the un-bonding of the cells from the support matrix, which would not have occurred with the cross-linking alginate beads of immobilized cells treated with glutaraldehyde, and the increase in isomaltulose production in this case could be explained by the increase in viable cells on the surface and on the inside of the beads.

Shimizu et al. [15] studied the use of glutaraldehyde and polyethylenimine in the immobilization of *S. plymuthica* NCIB-8285 cells in alginate, in batch processes for the conversion of sucrose into isomaltulose. The authors described polyethylenimine as a cross-linking agent in the cells immobilized in alginate and reported that glutaraldehyde conferred greater rigidity and physical strength to the cells immobilized in alginate. Without additive treatment, 62.9% of isomaltulose was obtained from a 30% sucrose solution in the first batch. In the second batch, the conversion decreased to 8.4%. In the third batch, there was no formation of isomaltulose. Using a 0.1% glutaraldehyde solution, the authors observed that, although the conversion decreased in the first batch, obtaining only 31% of isomaltulose, the enzyme remained stable, and after eight batches the conversion was

about 20%, possibly because a concentration of 0.1% glutaraldehyde was not sufficient to continue retaining the immobilized cells in the alginate. They also showed that using 1.5% polyethylenimine, a larger amount of glutaraldehyde of about 1% was required. They processed 36 batches with conversion rates above 50% and 70 batches with conversion rates above 25%. To sum up, optimization of the additive concentration increased the stability of the immobilized cells as compared to the values found in the preliminary study, before optimization. In the latter case, the non-treated immobilized cells quickly lost their conversion capacity. In contrast, before optimization, the additive treated cells carried out conversion for a shorter time. Barranco-Florida et al. [16] used immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells treated with three glutaraldehyde concentrations (0.1, 0.3 and 0.6 M) for the hydrolysis of inulin in batch processes. Initially, beads without glutaraldehyde showed the highest enzymatic activity; but after five runs, it had decreased to 39% of the initial activity. Meanwhile, for immobilized cells treated with glutaraldehyde, the residual activity was 79, 85 and 83% after five cycles for concentrations of 0.1, 0.3 and 0.6 M. Using *Teredinobacter turnirae* immobilized for alkaline protease production, the application of glutaraldehyde at different concentrations and treatment times was evaluated aimed at overcoming cell leakage from the matrix. It was observed that higher concentrations of glutaraldehyde and longer times reduced protease production although the beads were stronger. The authors attributed this to diffusional restrictions of the treated beads [17]. Nighojkar et al. [18] used glutaraldehyde in the cell immobilization of *Aspergillus niger* for polygalacturonase production. Glutaraldehyde was used as a hardening agent in the sodium alginate bead preparation and the beads formed were very compact and very stable, leading to an increase in the rigidity and mechanical strength of the immobilized cells. However, the enzyme production decreased, possibly because glutaraldehyde is toxic to the cells and may affect the viability of the immobilized cells. Glutaraldehyde and polyethylenimine were used as cross-linking agents with a sodium alginate gel for the immobilization of *Acidovorax facilis* 72W cells for the production of 4-cyanopentanoic acid. It was observed that immobilization in alginate, followed by cross-linking with glutaraldehyde and polyethylenimine stabilized the nitrilase activity in consecutive batch reactions [19]. In the present study, it was verified that the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in alginate followed by cross-linking with glutaraldehyde, produced a sucrose to isomaltulose conversion with greater stability than that obtained with non-additive treated immobilized cells.

#### 4. Conclusions

An experimental design and response surface methodology were used to determine the optimal concentration of additives in order to enhance the stability of *Erwinia* sp. D12 immobilized cells. In a preliminary study, it was verified that immobilized cells treated with polyethylenimine and glutaraldehyde were more stable than non-treated cells. After



optimization, the study showed that the additive polyethyleneimine was not essential to the immobilization, so only glutaraldehyde at a concentration of 0.06% was applied. The cells treated with the optimized additive presented a higher yield (71.42%) as compared to the preliminary conversion study (47.86%), also presenting better stability, with a conversion rate above 55% at 282 h.

#### Acknowledgments

We thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and GETEC Guanabara Química Industrial S/A for their financial support.

#### References

- [1] Takazoe I, Otha K, Shimizu J, Suzuki K, Iwakura T, Nakajima Y. Low-cariogenic sweeteners. 1985; US Patent 4,556,429.
- [2] Topitsoglou V, Sasaki N, Frostell G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. *Caries Res* 1984;18:47–51.
- [3] Sasaki N, Topitsoglou V, Takazoe I, Frostell G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E-49. *Swed Dent J* 1985;9:149–55.
- [4] Kawai K, Yoshikawa H, Murayama Y, Okuda Y, Yamashita K. Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. *Horm Metab Res* 1989;21:338–40.
- [5] Krastanov A, Yoshida A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003;30:593–8.
- [6] Kashimura J, Kimura M, Ito K, Ito Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1996;42:69–76.
- [7] Lina BAR, Smits-Van Prooije AE, Waalkens-Berendsen DH. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. *Food Chem Toxicol* 1997;35:309–14.
- [8] Freres RPD, Fouache C. Method for producing palatinol. 1997; US Patent 6,204,378.
- [9] Kakinuma H, Yuasa H, Hashimoto H. Glycosyltransfer mechanism of alpha-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. *Carbohydr Res* 1998;312:103–15.
- [10] Heikkila H, Sarkki M, Lindroos M, Ojala P, Ravanko V, Tylli M. Process of the production of isomaltulose and other products. 2000; US Patent 6,146,854.
- [11] Mcallister M, Kelly CT, Doyle E, Fogarty WM. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. *Biotechnol Lett* 1990;12:667–72.
- [12] Huang JH, Hsu LH, Su YC. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;21:22–7.
- [13] Wu L, Birch RG. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:1581–90.
- [14] Dervakov G, Webb C. On the merits of viable-cell immobilization. *Biotechnol Adv* 1991;9:559–612.
- [15] Shimizu J, Suzuki K, Nakajima Y. Method of producing an immobilized alpha-glycosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. 1982; UK Patent 2,082,591.
- [16] Barranco-Florido E, Garcia-Garibay M, Gomez-Ruiz L, Azaola A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Process Biochem* 2001;37:513–9.
- [17] Elibol M, Moreira AR. Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*. *Process Biochem* 2003;38:1445–50.
- [18] Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochem* 2006;41:1136–40.
- [19] Hann EC, Sigmund AM, Hennessey SM, Gavagan JE, Short DR, Bassat AB, et al. Optimization of an immobilized-cell biocatalyst for production of 4-cyanopentanoic acid. *Org Process Res Dev* 2002;6:492–6.



Short communication

## Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology

Haroldo Yukio Kawaguti\*, Hélia Harumi Sato.

Laboratory of Food Biochemistry, Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP),  
Rua Monteiro Lobato 80, CEP 13083-862, C.P.6121 Campinas, Brazil

Received 27 May 2006; received in revised form 24 August 2006; accepted 13 September 2006

### Abstract

The food industry is constantly seeking novel ingredients to improve existing products or to allow for the introduction of new products. Isomaltulose is a reducing sugar with a sweet taste and very similar physical and organoleptic properties to those of sucrose. The strain *Erwinia* sp. is able to convert sucrose into isomaltulose. A two level rotatory central composite design and response surface methodology were applied to verify the influence and conditions for the production of isomaltulose by *Erwinia* sp. D12 free-cells in a batch process. The statistical analysis carried out at a confidence level of 90% gave a coefficient of determination of 0.90, and the polynomial model resulted in a response surface and contour curve that indicated the best parameters for the conversion of sucrose into isomaltulose as follows: temperature 35 °C, pH 6.5, wet cell mass 10% and sucrose 35%. The free-cells of *Erwinia* sp. D12 were recycled during repeated-batch processes to produce isomaltulose from sucrose obtaining high isomaltulose yields.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Fermentation; Free-cells; Isomaltulose; Repeated-batch process; Response surface methodology; Rotatory central composite design

### 1. Introduction

Isomaltulose, also called palatinose, is a reducing sugar and a structural isomer of sucrose. This sugar, naturally present in very small quantities in honey, sugar cane extract and other sugar-rich fluids [1], has generated significant interest in the last two decades. It shows physicochemical and organoleptic properties similar to those of sucrose. Isomaltulose is noncarcinogenic and has a low glycemic index. Therefore the insulin release is correspondingly reduced as compared to other sugars, creating the possibility of its application in diabetic and sport food and drinks. Its ingestion selectively promotes the growth of beneficial bifidobacteria amongst the human intestinal micro flora. It is more stable than sucrose, which facilitates the maintenance of its sweetness and taste in fermented foods and beverages, is less hygroscopic, and can be simply converted into sugar alcohol, which has other useful properties in foods [2,3]. The safety of isomaltulose has been

comprehensively verified, resulting in its unqualified approval as human food, and it is widely used commercially as a sucrose substitute in foods, soft drinks and medicines [4,5]. A small range of bacterial species are known to have the ability to produce isomaltulose. These microorganisms include *Proteobacterium rubrum* [6], *Erwinia rhapontici* [7], *Serratia plymuthica* [8], *Klebsiella planticola* [1], *Pantoea dispersa* UQ68J [9] and *Erwinia* sp. D12 [10,11]. In this work, the effect of temperature, pH, wet cell mass concentration and substrate concentration on the production of isomaltulose by *Erwinia* sp. D12, was studied with the aid of rotatory central composite design and response surface methodology. An attempt was then made to study the production of isomaltulose in repeated-batch operations using free *Erwinia* sp. D12 cells.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Microorganism and culture conditions

The strain *Erwinia* sp. D12, isolated from fruits, was maintained and cultured as described previously [11]. The strain was grown in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of a seed culture medium containing 15% (w/v) sugar cane molasses, 1.5% (w/v) yeast extract Prodex® and 2% (w/v) corn steep

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 2175; fax: +55 19 3788 2153.  
E-mail address: kawaguti@fea.unicamp.br (H.Y. Kawaguti).

liquor Milhocina<sup>®</sup> for 15 h at 30 °C in an orbital shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). An aliquot of 300 ml of the seed culture was transferred into 2700 ml of culture medium contained in a 6.6-l fermenter New Brunswick Bioflo IIc (New Brunswick Scientific) and incubated under the following conditions: temperature 27 °C, aeration rate 1 vvm, and agitation speed 200 rpm. After 8 h of fermentation, the cell mass was separated by centrifugation at 9650 × g for 15 min at 5 °C and washed twice with sterile water.

### 2.2. Conversion of sucrose into isomaltulose using a rotatory central composite design

Response surface methodology was employed to evaluate the variables that significantly affected isomaltulose production. A two level rotatory central composite design (2<sup>4</sup>-RCCD) composed of 16 factorial points, eight axial points ( $\alpha = 2$ ), three replicates at the central point and giving a total of 27 assays, was used in this study. The variables considered for the design were temperature, pH, wet cell mass and sucrose concentration, and the coded and real values are listed in Table 1 (the range values were chosen after preliminary tests). The in vitro study for isomaltulose production was carried out in an orbital shaker at 150 rpm. All data were treated with the aid of the STATISTICA<sup>®</sup> 5.5 programme from Statsoft Inc. (2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). The carbohydrate analyses were carried out using a Dionex DX-600 High Performance Liquid Chromatograph (Dionex Corporation, 1228 Titan Way, Sunnyvale, CA, USA) as previously described [11].

### 2.3. Production of isomaltulose using repeated-batch process

After studying the influence of temperature, pH and substrate and wet cell mass concentrations on isomaltulose production, repeated-batch processes were

carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks to confirm the best conditions for isomaltulose production, corresponding to assays four, six and the central point, obtained from 2<sup>4</sup>-RCCD. Erlenmeyer flasks containing 50 ml of sucrose solution and free-cell of *Erwinia* sp. D12 were maintained in an orbital shaker at 150 rpm for 15 min. At the end of the incubation of each batch, samples were collected and submitted to analysis. The reaction medium was centrifuged at 9650 × g for 20 min at 25 °C and the free-cells used for the next batch conversion of sucrose into isomaltulose with fresh substrate. This process was repeated 10 times.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Conversion of sucrose into isomaltulose using a rotatory central composite design

The results obtained for isomaltulose production by free-cells of *Erwinia* sp. D12 are shown in Table 1. The conversion of sucrose into isomaltulose was determined after 15, 25 and 35 min incubation time. However, since the highest conversion was already observed after 15 and 25 min, the statistical analyses were applied to these periods; the data after 35 min not being validated statistically (based on the *F*-test, the model was not predictive, since its calculated *F*-value was lower than the critical *F*-value). The assays at the centre points (three points) were included in the matrix and the statistical analysis was used to identify the effect of each variable on the response. In addition, both the *T*-test and *P*-value statistical parameters were

Table 1  
Coded levels and real values (in brackets) for the two level rotatory central composite design (2<sup>4</sup>-RCCD) and responses for the conversion of sucrose into isomaltulose using free-cells of *Erwinia* sp. D12 and repeated-batch processes

Assay	Level of variable				Yield-isomaltulose (%)		
	T <sup>a</sup>	pH	WCM <sup>b</sup>	SC <sup>c</sup>	15 min	25 min	35 min
1	-1 (30)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	57.22	55.14	48.77
2	1 (40)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	62.90	70.26	58.84
3	-1 (30)	1 (6.9)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	40.91	57.14	49.89
4	1 (40)	1 (6.9)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	63.08	57.22	50.54
5	-1 (30)	-1 (6.1)	1 (12.5)	-1 (27.5)	40.67	64.04	50.33
6	1 (40)	-1 (6.1)	1 (12.5)	-1 (27.5)	66.77	52.33	51.59
7	-1 (30)	1 (6.9)	1 (12.5)	-1 (27.5)	45.42	56.97	46.76
8	1 (40)	1 (6.9)	1 (12.5)	-1 (27.5)	60.45	57.88	58.76
9	-1 (30)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	1 (42.5)	31.83	33.95	37.31
10	1 (40)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	1 (42.5)	40.82	43.29	44.73
11	-1 (30)	1 (6.9)	-1 (7.5)	1 (42.5)	25.56	32.40	43.11
12	1 (40)	1 (6.9)	-1 (7.5)	1 (42.5)	27.67	39.68	46.69
13	-1 (30)	-1 (6.1)	1 (12.5)	1 (42.5)	37.24	41.10	37.77
14	1 (40)	-1 (6.1)	1 (12.5)	1 (42.5)	37.55	50.87	37.76
15	-1 (30)	1 (6.9)	1 (12.5)	1 (42.5)	30.92	48.61	37.50
16	1 (40)	1 (6.9)	1 (12.5)	1 (42.5)	31.87	41.63	36.04
17	-2 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	42.65	44.96	42.19
18	2 (45)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	53.42	63.44	49.85
19	0 (25)	-2 (5.7)	0 (10.0)	0 (35.0)	39.42	43.13	45.71
20	0 (35)	2 (7.3)	0 (10.0)	0 (35.0)	35.92	45.46	45.29
21	0 (35)	0 (6.5)	-2 (5.0)	0 (35.0)	30.74	41.67	46.49
22	0 (35)	0 (6.5)	2 (15.0)	0 (35.0)	49.00	45.80	50.51
23	0 (35)	0 (6.5)	0 (10.0)	-2 (20)	47.62	55.59	56.81
24	0 (35)	0 (6.5)	0 (10.0)	2 (50)	29.03	31.45	41.28
25	0 (35)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	54.93	44.58	42.12
26	0 (35)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	50.29	44.65	47.54
27	0 (35)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	47.51	45.24	41.94

<sup>a</sup> Temperature (°C).

<sup>b</sup> Wet cell mass (%).

<sup>c</sup> Substrate concentration (% sucrose).

Please cite this article in press as: Kawaguti HY, Sato HH. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. Process Biochem (2006), doi:10.1016/j.procbio.2006.09.013

used to confirm the significance of the factors studied. After 15 min, the maximum isomaltulose production observed was 66.77% (assay 6) with a reaction temperature of 40 °C, pH 5.7, 12.5% wet cell mass and 27.5% of sucrose concentration. The lowest yield of isomaltulose obtained was 25.26% (assay 11). An excess of sucrose (50%, w/v) affected the activity of the free-cells, decreasing the conversion of sucrose to 29.03% of isomaltulose (assay 24). As can be seen in assay 23, decreasing the sucrose concentration to 20% and maintaining the same parameters as assay 24, the production of isomaltulose increased to 47.62%. Tate & Lyle [12] also verified the influence of sucrose concentration (12.5–60%) using immobilized cells of *Erwinia raphontici* at 30 °C. The highest isomaltulose production was obtained using a sucrose solution 35%, and high sucrose concentrations about 55% decreased the isomaltulose yield. Cheetham et al. [7] observed that an excess of sucrose in the immobilized cells inhibited the production of isomaltulose from sucrose.

Both the *T*-test and *P*-value ( $P < 0.10$ ) statistical parameters were used to confirm the significance of the parameters studied. The analysis of the effects showed that the substrate concentration (SC) is the most important significant variable (linear parameter value =  $-17.5950$ ) and has a negative effect in the range studied, since an increase in the concentration of this variable from 20 to 50% led to a decrease in isomaltulose yield. The variables pH (linear parameter value =  $-4.6767$  and quadratic parameter value =  $-5.6767$ ) and wet cell mass (quadratic parameter value =  $-4.5767$ ) also showed negative effects on isomaltulose production. The temperature also showed a significant effect on isomaltulose production (linear parameter value =  $8.5733$ ), but its influence was positive, since an increase in temperature in the range studied, led to an increase in isomaltulose yield. The independent and dependent variables were fitted to the second-order model equation. They were examined in terms of their goodness of fit. On the basis of the analysis of variance a second order model (Eq. (1)) was established, describing the isomaltulose production as a function of temperature (*T*), pH, wet cell mass (WCM) and sucrose concentration (SC). The pure error was very low (28.1048), indicating good reproducibility of the experimental data. Based on the *F*-test, the model is predictive, since its calculated *F*-value ( $F_{\text{model}} = 14.66$ ) was higher than the critical *F*-value ( $F_{0.90;7;19} = 2.06$ ). The quadratic regression model demonstrated that the model was significant at a confidence level of 90% ( $P < 0.10$ ), as evidenced by the *F*-test ( $F_{\text{model}}$  exceeded the tabulated value of  $F_{0.90;7;19}$  by 7.2 times). The model presented a high coefficient of determination ( $R^2 = 0.90$ ) explaining 90% of the variability in the response. Based on these results the quadratic model can be used to generate response surfaces and contour curves for the analysis of the effects of the variables on isomaltulose production. The response surface and contour curves were obtained using the following equation:

$$y = 50.91 + 4.29x_1 - 2.34x_2 - 2.84x_2^2 - 2.29x_3^2 - 8.80x_4 - 2.67x_4^2 - 3.54x_1x_3 \quad (1)$$

where *y* is the predicted response for the isomaltulose yield after 15 min incubation time and  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  and  $x_4$  are the coded values for temperature, pH, wet cell mass and sucrose concentration, respectively. The response surfaces and contour curves (Fig. 1) represented the predicted model, indicating the levels of the variables required to optimise the process. Fig. 1a and b show that the highest isomaltulose yields would be obtained using WCM ranging from 7.5 to 12.5% and 10% of WCM would be the optimum concentration. It can be observed that 20–30% is the best range of SC to obtain good results for isomaltulose production, with yields above 50% (Fig. 1b and c). With respect to pH, the isomaltulose yield was high in a wide range of pH, from 5.5 to 7.0. The optimal pH range for conversion of sucrose into isomaltulose would be 6.0–6.5 (Fig. 1b and c). Fig. 1a shows a tendency to obtain higher isomaltulose yields at temperatures above 40 °C (above 50% of isomaltulose), however, high temperatures could inactivate the enzyme. Xyrofin et al. [13] studied the influence of temperature on sucrose production from immobilized cells of *P. rubrum*, *S. plymuthica* and *E. raphontici*. Temperatures ranging from 35 to 45 °C partially inactivated the immobilized cells, decreasing the conversion of sucrose into isomaltulose, and temperatures above 55 °C completely inactivated the cells of *P. rubrum* in 24 h.

The production of isomaltulose from *Erwinia* sp. D12 free-cells was also analysed after 25 min incubation time. Table 1 shows the assays and results for the two level rotatory central composite design ( $2^4$ -RCCD). It can be seen that high values of isomaltulose production from sucrose were obtained after 25 min, the maximum isomaltulose production observed being 70.26% (run two) with a reaction temperature of 40 °C, pH of 6.1, 7.5% wet cell mass and 27.5% of sucrose concentration. An analysis of the effects shows that the SC (linear parameter value =  $-15.6442$ ) is the most important significant variable ( $P < 0.05$ ), since an increase in the concentration of this variable from 20 to 50 g l<sup>-1</sup> could lead to a decrease in the isomaltulose yield after 25 min reaction time. The pH was also shown to be a significant variable (linear parameter value =  $-1.2325$ ) and in the pH range from 5.7 to 7.3 a decrease in isomaltulose production occurred. However, the variables *T* (linear parameter value =  $5.0642$  and quadratic parameter value =  $5.9281$ ) and WCM (linear parameter value =  $2.7175$ ) showed a positive influence on isomaltulose production in the range studied. On the basis of the analysis of variance, a second-order coded model (Eq. (2)) was established, describing the isomaltulose yield as a function of temperature, pH, wet cell mass and sucrose concentration:

$$y = 44.82 + 2.53x_1 - 2.92x_1^2 - 0.62x_2 - 0.49x_2^2 + 1.36x_3 + 0.35x_3^2 + 7.360x_4 - 1.32x_1x_2 - 2.48x_1x_3 + 0.94x_1x_4 + 0.81x_2x_3 + 2.58x_3x_4 \quad (2)$$

The model presented a satisfactory coefficient of determination ( $R^2 = 0.86$ ) explaining 86% of the variability in the response. Based on the *F*-test, the model is predictive, since the calculated  $F_{\text{model}}$  value was 2.9 times higher than

Please cite this article in press as: Kawaguti HY, Sato HH. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. Process Biochem (2006). doi:10.1016/j.procbio.2006.09.013

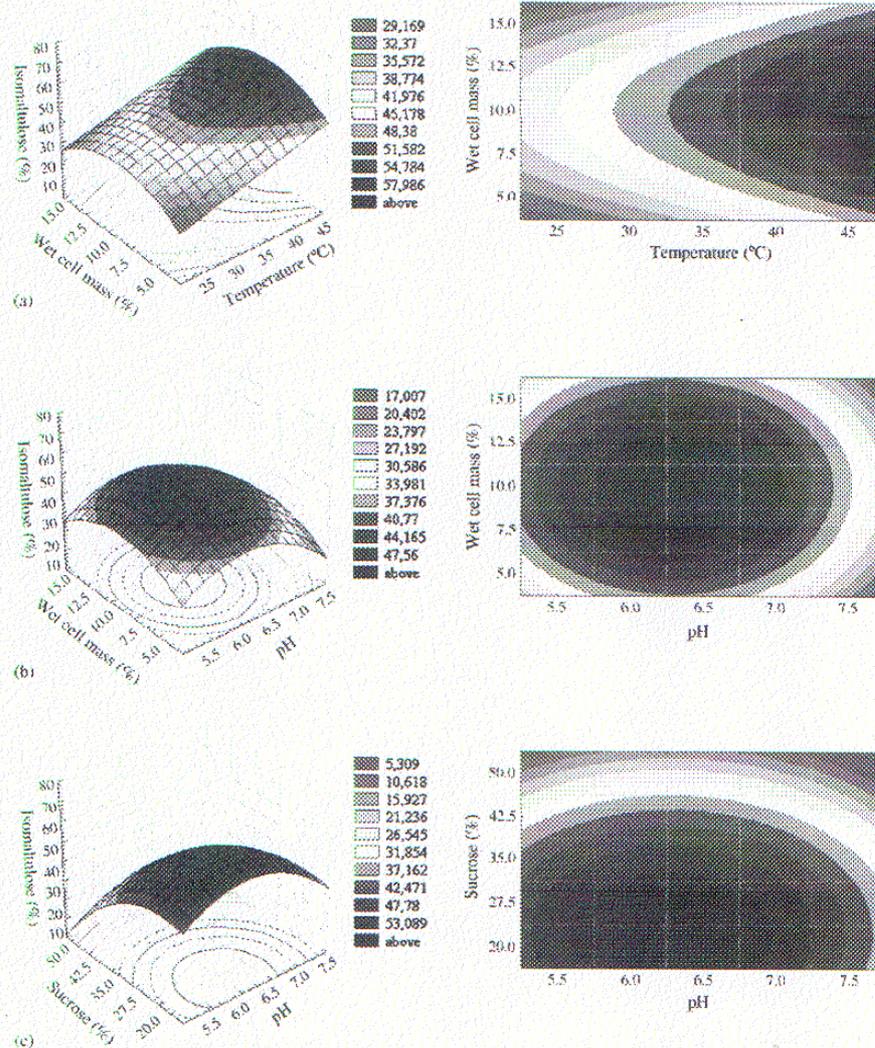


Fig. 1. Response surfaces and contour curves for isomaltulose production by *Erwinia* sp. D12 free-cells using response surface methodology after 15 min of reaction time: (a) isomaltulose yield as a function of temperature and wet cell mass, (b) isomaltulose yield as a function of pH and wet cell mass and (c) isomaltulose yield as a function of pH and sucrose concentration.

the critical  $F$ -value. Based on these results, the response surfaces and contour curves (Fig. 2) were obtained using Eq. (2). The response surface and contour curves showing the effect of  $T$ , pH, WCM and SC are shown in Fig. 2. Fig. 2c shows that the highest isomaltulose yields (above 65%) were obtained using WCM concentrations below 12.5%, and Fig. 2a and b show that sucrose concentrations below 35% led to an increase in isomaltulose production in the range studied (20–50%). A wide range of pH from 5.5 to 7.5 could be used to obtain high isomaltulose yields (Fig. 2b).

The  $2^4$ -RCCD was also used to evaluate the influence of temperature, pH, wet cell mass concentration and substrate concentration on the residual sucrose content. The results obtained for residual sucrose after conversion of sucrose into isomaltulose by free-cells of *Erwinia* sp. D12 after 15, 25 and 35 min incubation time are shown in Table 2. The statistical analysis was evaluated after 15 min since the data obtained after 25 and 35 min were not statistically valid (based on the  $F$ -test, the model was not predictive, since its calculated  $F$ -value was lower than the critical  $F$ -value). Table 2 shows that after 15 min incubation time the highest value for sucrose was



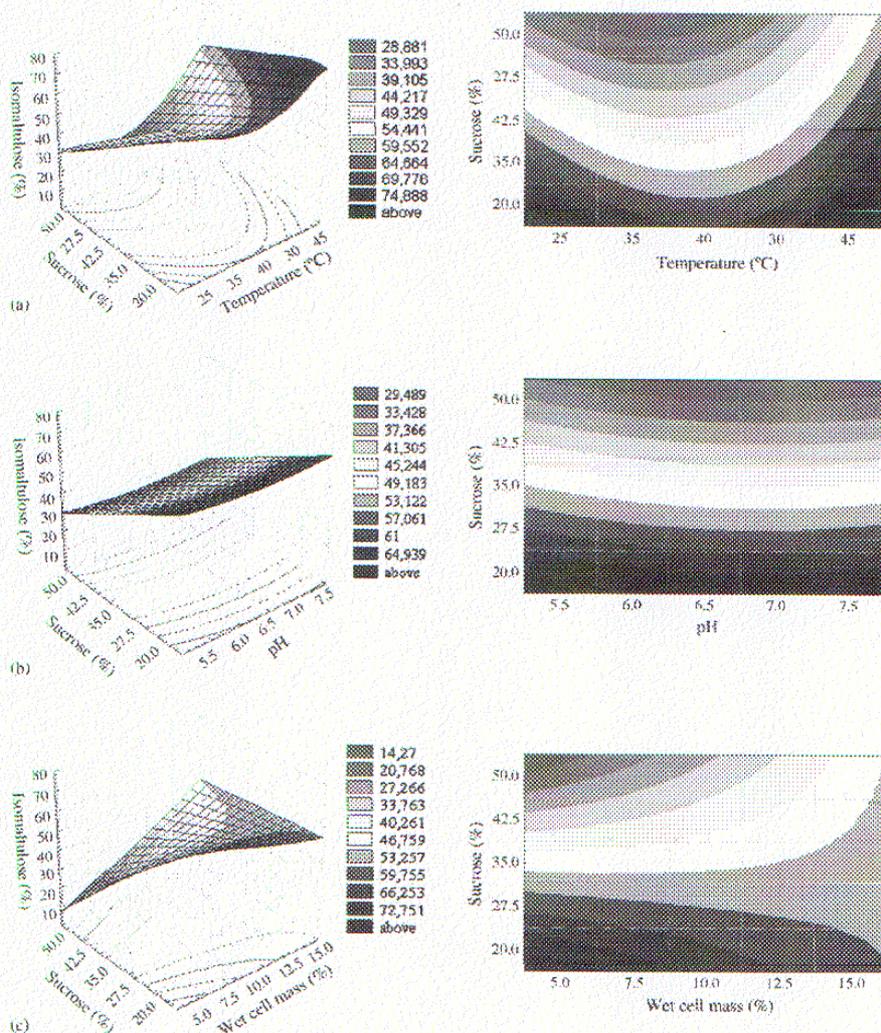


Fig. 2. Response surfaces and contour curves for isomaltulose production by *Erwinia* sp. D12 free-cells using response surface methodology after 25 min of reaction time: (a) isomaltulose yield as a function of temperature and sucrose concentration, (b) isomaltulose yield as a function of pH and sucrose concentration and (c) isomaltulose yield as a function of wet cell mass and sucrose concentration.

obtained in assay 23 with a reaction temperature of 35 °C, pH of 6.5, 5.0% wet cell mass and 27.5% of sucrose concentration. Total sucrose conversion could be seen in assays 5, 7 and 18. After 25 min many assays presented total sucrose conversion (assays from 2 to 8 and 18). However, assays 21 and 24 presented sucrose concentrations above 30% after 25 min incubation time. The analysis of the effects ( $P < 0.10$ ) showed that the variable SC presented a positive significant effect (linear parameter value = 7.7675 and quadratic parameter value = 6.7985) since an increase in the sucrose concentration from 20 to 50 g/l led to an increase in sucrose conversion. However, the variables pH (quadratic parameter value =

-2.8858), WCM (quadratic parameter value = -11.5258) and  $T$  (linear parameter value = -2.7642 and quadratic parameter value = -14.9365) showed negative significant effects in the range studied. The quadratic regression model demonstrated that the model was significant at a confidence level of 90% ( $p < 0.10$ ), as evidenced by the  $F$ -test ( $F_{\text{model}} = 2.20$  was higher than the tabulated value of  $F_{0.95;4;12} = 2.03$ ). The adequacy of the model was checked by the coefficient of determination ( $R^2$ ), whose value was 0.80. The pure error was very low (2.0781), indicating satisfactory reproducibility of the data obtained. Based on these results the model can be utilized to generate response surfaces and contour

Please cite this article in press as: Kawaguti HY, Sato HH. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. Process Biochem (2006). doi:10.1016/j.procbio.2006.09.013



Table 2

Coded levels and real values (in brackets) for the two level rotatory central composite design (2<sup>4</sup>-RCCD) and response for residual sucrose from the conversion of sucrose into isomaltulose using free-cells of *Erwinia* sp. D12 and repeated-batch processes, after 15 min incubation time

Assay	Variable level				Residual sucrose (%)		
	T <sup>a</sup>	pH	WCM <sup>b</sup>	SC <sup>c</sup>	15 min	25 min	35 min
1	-1 (30)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	8.68	2.02	0.00
2	1 (40)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	6.78	0.00	0.00
3	-1 (30)	1 (6.9)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	7.88	0.00	0.00
4	1 (40)	1 (6.9)	-1 (7.5)	-1 (27.5)	8.45	0.00	0.00
5	-1 (30)	-1 (6.1)	1 (12.5)	-1 (27.5)	0.00	0.00	0.00
6	1 (40)	-1 (6.1)	1 (12.5)	-1 (27.5)	4.16	0.00	0.00
7	-1 (30)	1 (6.9)	1 (12.5)	-1 (27.5)	0.00	0.00	0.00
8	1 (40)	1 (6.9)	1 (12.5)	-1 (27.5)	2.35	0.00	0.00
9	-1 (30)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	1 (42.5)	26.17	12.64	4.86
10	1 (40)	-1 (6.1)	-1 (7.5)	1 (42.5)	18.75	5.28	1.86
11	-1 (30)	1 (6.9)	-1 (7.5)	1 (42.5)	32.17	19.69	13.06
12	1 (40)	1 (6.9)	-1 (7.5)	1 (42.5)	18.95	8.07	3.41
13	-1 (30)	-1 (6.1)	1 (12.5)	1 (42.5)	13.35	3.63	0.00
14	1 (40)	-1 (6.1)	1 (12.5)	1 (42.5)	10.31	2.67	0.00
15	-1 (30)	1 (6.9)	1 (12.5)	1 (42.5)	9.64	2.74	0.00
16	1 (40)	1 (6.9)	1 (12.5)	1 (42.5)	6.07	1.46	0.00
17	-2 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	5.55	1.56	0.00
18	2 (45)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	0.00	0.00	0.00
19	0 (25)	-2 (5.7)	0 (10.0)	0 (35.0)	38.73	18.56	6.44
20	0 (25)	2 (7.3)	0 (10.0)	0 (35.0)	22.76	6.53	1.99
21	0 (25)	0 (6.5)	-2 (5.0)	0 (35.0)	46.34	31.10	18.22
22	0 (25)	0 (6.5)	2 (15.0)	0 (35.0)	18.16	3.34	0.00
23	0 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	-2 (20)	47.22	22.31	7.30
24	0 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	2 (50)	45.27	30.92	24.96
25	0 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	20.48	4.89	0.00
26	0 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	22.38	4.05	0.00
27	0 (25)	0 (6.5)	0 (10.0)	0 (35.0)	20.79	4.57	0.00

<sup>a</sup> Temperature (°C).

<sup>b</sup> Wet cell mass (%).

<sup>c</sup> Substrate concentration (% sucrose).

curves for the analysis of the variable effects on sucrose conversion. The response surface and contour curves were obtained using Eq. (3):

$$y = 44.82 + 2.53x_1 - 2.92x_1^2 - 0.62x_2 - 0.49x_2^2 + 1.36x_3 + 0.35x_3^2 + 7.360x_4 - 1.32x_1x_2 - 2.48x_1x_3 + 0.94x_1x_4 + 0.81x_2x_3 + 2.58x_3x_4 \quad (3)$$

where y was the predicted response for residual sucrose and x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>, x<sub>4</sub> were the coded values for temperature, pH, wet cell mass and substrate concentration, respectively. From the coded model both the response surface and contour curve were then plotted (Fig. 3). It can be observed that the best wet cell mass concentration would be 10% in the range investigated (Fig. 3c). Fig. 3a–c indicated that sucrose concentrations ranging from 20 to 40% presented high conversion of sucrose into isomaltulose and the optimum concentration would be 35%. Fig. 3b shows that the variable pH at values above 6.5 led to an increase in sucrose conversion to isomaltulose, in the range investigated. Temperatures above 35 °C presented the best results for sucrose conversion into isomaltulose (Fig. 3a).

### 3.2. Production of isomaltulose using repeated-batch fermentation

Duplicate assays were carried out to verify the best conditions for isomaltulose production in repeated-batch processes. The parameters used were obtained from assays corresponding to the central point (named assay A—temperature 35 °C, pH 6.5, wet cell mass 10% and sucrose concentration 35%), number four (named assay B—temperature 40 °C, pH 6.9, wet cell mass 7.5% and sucrose concentration 27.5%) and number six (named assay C—temperature 40 °C, pH 6.1, wet cell mass 12.5% and sucrose concentration 27.5%) from the 2<sup>4</sup>-RCCD (Table 1). The data obtained for 10 cycles of the repeated-batch operation indicated that the free-cells were active and could be reused. Similar conversion rates were obtained using free-cells in the initial batches of a repeated-batch process. The isomaltulose production in assays B and C was a little higher than those in assay A in the first six batches. Assay B produced an isomaltulose yield from 74.99% ± 6.66 (third batch) to 12.56% ± 8.95 (batch number 10). The isomaltulose yield decreased from 77.00% ± 14.58 (second batch) to 2.00% ± 0.12 (batch number 10) using the conditions of assay C. In the first six batches high isomaltulose yields were obtained using assays A and B. However, after this

Please cite this article in press as: Kawaguti HY, Sato HH. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. Process Biochem (2006). doi:10.1016/j.procbio.2006.09.013



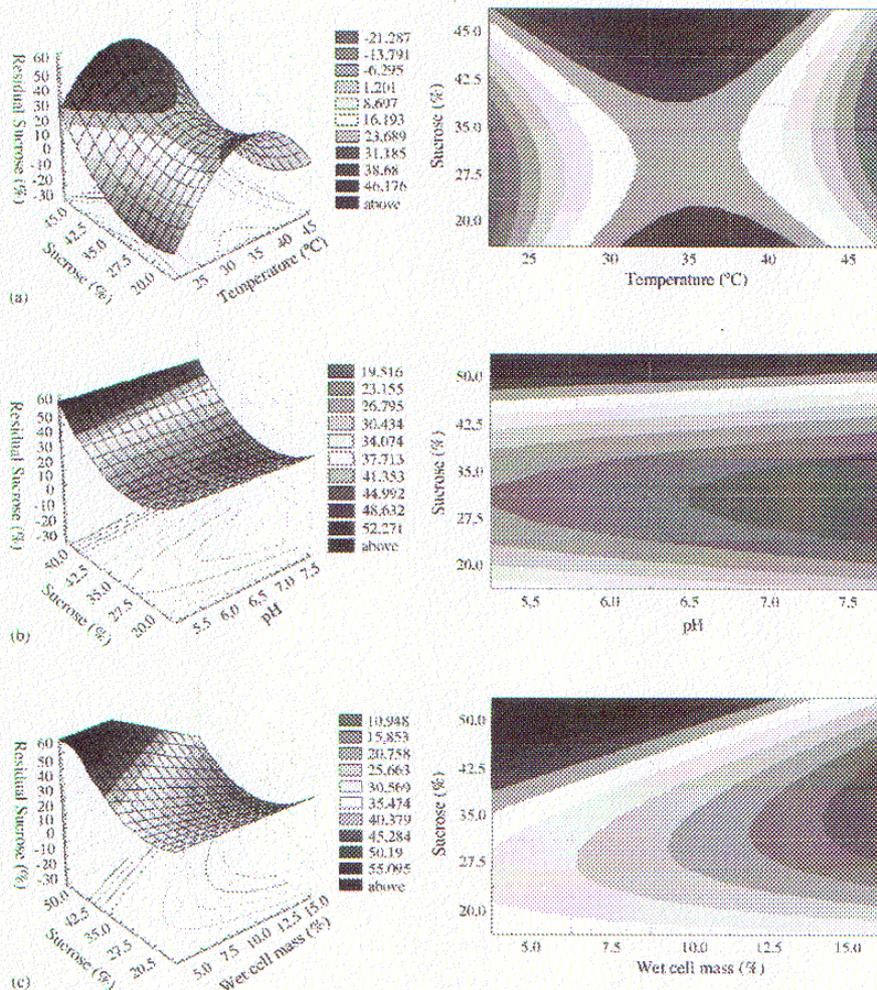


Fig. 3. Response surfaces and contour curves for sucrose conversion by *Erwinia* sp. D12 free-cells using response surface methodology after 25 min of reaction time: (a) isomaltulose yield as a function of temperature and sucrose concentration, (b) isomaltulose yield as a function of pH and sucrose concentration and (c) isomaltulose yield as a function of wet cell mass and sucrose concentration.

cycle the conversion of sucrose into isomaltulose decreased quickly due to enzyme inactivation by the temperature. Using the free-cells and the assay A conditions, the cells remained viable for more cycles with high isomaltulose yields. The highest conversion of sucrose into isomaltulose of  $73.23\% \pm 8.43$  was obtained in batch number 1 and after the first batch the efficiency of isomaltulose production decreased slightly, reaching  $56.44\% \pm 0.51$  in batch number 10. Some studies have reported the conversion of sucrose into isomaltulose using microorganisms, but no reports of the use of repeated-batch process for isomaltulose production were found. Huang et al. [1] obtained 76% of isomaltulose from sucrose using whole cells of *K. planticola* CCRC 10112. Using a purified enzyme from the strain *K. planticola* MX-10, 63.9% of isomaltulose was obtained from

sucrose [14]. Véronèse and Perlot [15] obtained 72.6% isomaltulose using a purified glucosyltransferase from *S. plymuthica* ATCC 15928. The isomaltulose yields obtained from immobilized cells of *Erwinia* sp. [16] and *Klebsiella* sp. LX3 [17] in calcium alginate were 50 and 87%, respectively. The isomaltulose yield using immobilized cells of *S. plymuthica* in chitosan was 80% [3]. The free *Erwinia* sp. D12 cells supported high production levels in repeated-batch operations and the results showed potential for repeated reuse of free-cells.

#### 4. Conclusions

A two level rotatory central composite design and response surface methodology were applied to verify the influence of the

Please cite this article in press as: Kawaguti HY, Sato HH, Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology, Process Biochem (2006), doi:10.1016/j.procbio.2006.09.013



parameters temperature, pH, wet cell mass concentration and substrate concentration on isomaltulose production. Using repeated-batch processes it was shown that the optimal parameters for isomaltulose production were temperature 35 °C, pH 6.5, 10% wet cell mass and 35% sucrose concentration. The results showed the potential for the repeated reuse of the cell mass of *Erwinia* sp. D12 for the conversion of sucrose into isomaltulose.

#### Acknowledgments

The financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos em Pesquisa (FINEP) and GETEC Guanabara Química Industrial S.A. We thank the Prodesa Produtos Especiais para Alimentos S/A for the supply of the yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> and Corn Products Brazil for the supply of the corn steep liquor Milhocina<sup>®</sup>.

#### References

- [1] Huang JH, Hsu LH, Su YC. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;21:22–7.
- [2] Takazoe I, Frostell G, Ohta K, Topitsoglou V, Sasaki N. Palatinose-a sucrose substitute. *Swed Dent J* 1985;9:81–7.
- [3] Krastanov A, Yoshida A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003;30:593–8.
- [4] Lina BAR, Smits-van prooije AE, Waalkens-berendsen DH. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. *Food Chem Toxicol* 1997;35:309–14.
- [5] Lina BAR, Jonker D, Kozianowski G. Isomaltulose (Isomaltulose<sup>®</sup>): a review of biological and toxicological studies. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1375–81.
- [6] Weidenhagen R, Lorenz S. Isomaltulose [6(α-glucopyranoside)-fructofuranose], ein neues bakterielles umwandlungsprodukt der saccharose. *Zuckerindustrie* 1957;7:533–4.
- [7] Cheetham PSJ, Garrett C, Clark J. Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotechnol Bioeng* 1984;27:471–81.
- [8] Mcallister M, Kelly CT, Doyle E, Fogarty WM. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. *Biotechnol Lett* 1990;12:667–72.
- [9] Wu L, Birch RG. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *J Appl Microbiol* 2004;97:93–103.
- [10] Kawaguti HY, Manrich E, Fleuri LF, Sato HH. Production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. using experimental design and response surface methodology. *Braz J Microbiol* 2005;36:227–34.
- [11] Kawaguti HY, Buzzato MF, Orsi DC, Suzuki GT, Sato HH. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. *Process Biochem* 2006;41:2035–40.
- [12] Tate & Lyle, Bucke C, Cheetham PSJ. Production of isomaltulose. UK Patent 2,063,268A.03.06.81.
- [13] Xyrofin OY, Marja-leena S, Heikki H, Tapio V. Processos para a isomerização de sacarose em isomaltulose para a produção de isomalte a partir de sacarose e veículo adaptado para uso em um processo microbiano para a isomerização de sacarose em isomaltulose. BR PI 9709100-6A. 2000.
- [14] Tsuyuki K, Sugitani Y, Miyata Y, Ebashi T, Nakajima Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. *J Gen Appl Microbiol* 1992;38:483–90.
- [15] Véronèse T, Perlot P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. *Enzyme Microb Technol* 1999;24:263–9.
- [16] Moraes ALL, Steckelberg C, Sato HH, Pinheiro A. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp. D12 imobilizada com alginato de cálcio. *Ciênc Tecnol Aliment* 2005;25:95–102.
- [17] Li X, Zhao C, Na Q, Zhang D. Substrate induction isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX 3. *J Appl Microbiol* 2003;95:2131–6.

## Isomaltulose production using free cells: optimisation of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes

Haroldo Y. Kawaguti · Michele F. Buzzato ·  
Hélia H. Sato

Received: 22 June 2006 / Accepted: 15 November 2006  
© Society for Industrial Microbiology 2006

**Abstract** The enzyme glucosyltransferase is an industrially important enzyme since it produces non-cariogenic isomaltulose (6- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-6-D-fructofuranose) from sucrose by intramolecular transglucosylation. The experimental designs and response surface methodology (RSM) were applied for the optimisation of the nutrient concentrations in the culture medium for the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. D12 in shaken flasks at 200 rpm and 30°C. A statistical analysis of the results showed that, in the range studied, the factors had a significant effect ( $P < 0.05$ ) on glucosyltransferase production and the highest enzyme activity (10.84 U/ml) was observed in culture medium containing sugar cane molasses (150 g l<sup>-1</sup>), corn steep liquor (20 g l<sup>-1</sup>), yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> (15 g l<sup>-1</sup>) and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g l<sup>-1</sup>) after 8 h at 30°C. The production of cell biomass by the strain of *Erwinia* sp. D12 was carried out in a 6.6-l fermenter with a mixing rate of 200 rpm and an aeration rate of 1 vvm. Fermentation time, cellular growth, medium pH and glucosyltransferase production were observed. The greatest glucosyltransferase activity was 22.49 U/ml, obtained after 8 h of fermentation. The isomaltulose production from sucrose was performed using free *Erwinia* sp. D12 cells in a batch process using an orbital shaker. The influence of the parameters sucrose concentration, temperature, pH, and cell

concentration on the conversion of sucrose into isomaltulose was studied. The free cells showed a high conversion rate of sucrose into isomaltulose using batch fermentation, obtaining an isomaltulose yield of 72.11% from sucrose solution 35% at 35°C.

**Keywords** Free cells · Isomaltulose · Repeated-batch process · Response surface methodology

### Introduction

Isomaltulose is a sucrose isomer obtained commercially by the enzymatic conversion of sucrose catalysed by microbial glucosyltransferase and can be found naturally in honey and sugar cane extracts in very small quantities. It has been suggested as a non-cariogenic alternative to sucrose, and as such is currently in wide use as a sugar substitute in foods. It can also be converted into a sugar-alcohol mixture known as Isomalt<sup>®</sup>, that has low caloric value and non-cariogenic properties. In experimental studies with rats [15, 17] and in human studies [24], the production of insoluble glucan and acids from isomaltulose by strains of *Streptococcus mutans* was very low when compared to sucrose. Isomaltulose is perceived to be about 50% as sweet as sucrose [3, 4, 6, 15, 17, 20, 22, 23, 24] and shows very similar physical and organoleptic properties [2, 6]. In the organism, isomaltulose is hydrolysed by isomaltase and absorbed as glucose and fructose [23]. Unlike sucrose, the ingestion of isomaltulose has only a minor effect on glycemia, indicating its potential as a parenteral nutrient acceptable to both diabetics and non-diabetics [7, 8]. Teratogenic or mutagenic effects and toxicity are not associated with the consumption of

H. Y. Kawaguti (✉) · M. F. Buzzato · H. H. Sato  
Laboratory of Food Biochemistry,  
Department of Food Science,  
Faculty of Food Engineering,  
State University of Campinas (UNICAMP),  
Rua Monteiro Lobato 80, CEP 13083-862,  
C.P.6121 Campinas, Brazil  
e-mail: kawaguti@fea.unicamp.br

isomaltulose by rats, it thus being safe for use in foods [11].

The conversion of sucrose into isomaltulose can be carried out using free cells [5, 19] or immobilized cells [1, 2, 4, 10, 18, 20, 25]. Response surface methodology was used to evaluate the effect of the culture medium components on glucosyltransferase activity, with the purpose of producing a low cost culture media. A two level fractional factorial design ( $2^{5-1}$ -FFD) was used to select the significant factors, and a two level rotatory central composite design ( $2^3$ -RCCD) used to optimise the culture medium. This paper reports the production of isomaltulose from sucrose using free *Erwinia* sp. D12 cells in repeated-batch processes.

## Materials and methods

### Microorganism and maintenance

*Erwinia* sp. D12, a producer of glucosyltransferase, was obtained from the Laboratory of Biochemistry (Faculty of Food Engineering/UNICAMP). The microorganism was maintained in a culture medium containing the following ingredients per litre of sterile water: 6 g sucrose, 4 g peptone, 0.4 g beef extract and 2 g agar. The cultures were kept at 5°C.

Optimisation of a culture medium containing agricultural wastes, using response surface methodology.

The in vitro study for the optimisation of the culture medium (in shaken flasks) was carried out using an experimental design and response surface methodology (RSM). All data were treated with the aid of STATISTICA® 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA).

### Cultivation and enzyme production

The seed medium had the same composition as the production medium as shown in Tables 1, 2, 3 and 4. A loop full of cells was inoculated into 50 ml of seed medium contained in 250 ml Erlenmeyer flasks and incubated in an orbital shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) at 30°C and 200 rpm for 15 h. This seed culture was inoculated into the production medium at a rate of 10% (v/v). After 8 h of fermentation, the culture was centrifuged at 10,070×g for 15 min and the glucosyltransferase activity determined.

### Glucosyltransferase assay

The glucosyltransferase activity was determined from the increase in reducing power of a solution containing

**Table 1** Two level fractional factorial design ( $2^{5-1}$ -FFD) and the response for glucosyltransferase activity from *Erwinia* sp. D12

Assay	Variable levels <sup>a</sup>					Response Enzyme activity (U/ml)
	SCM <sup>b</sup>	CSL <sup>c</sup>	YEP <sup>d</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH	
1	-1	-1	-1	-1	1	2.27
2	1	-1	-1	-1	-1	1.11
3	-1	1	-1	-1	-1	4.11
4	1	1	-1	-1	1	12.44
5	-1	-1	1	-1	-1	3.59
6	1	-1	1	-1	1	14.68
7	-1	1	1	-1	1	5.56
8	1	1	1	-1	-1	0.20
9	-1	-1	-1	1	-1	2.40
10	1	-1	-1	1	1	5.89
11	-1	1	-1	1	1	5.77
12	1	1	-1	1	-1	0.20
13	-1	-1	1	1	1	5.12
14	1	-1	1	1	-1	0.68
15	-1	1	1	1	-1	4.82
16	1	1	1	1	1	11.92
17	0	0	0	0	0	11.29
18	0	0	0	0	0	12.28
19	0	0	0	0	0	11.30

<sup>a</sup> Coded variables <sup>b</sup>Sugar cane molasses <sup>c</sup>Corn steep liquor-Milhocina® <sup>d</sup>Yeast extract Prodex®

**Table 2** The variables and their levels for the two level fractional factorial design ( $2^{5-1}$ -FFD)

Variable	Coded variable levels		
	-1	0	+1
Sugar cane molasses (g l <sup>-1</sup> )	20.0	100.0	180.0
Corn steep liquor (g l <sup>-1</sup> )	5.0	20.0	35.0
Yeast extract Prodex® (g l <sup>-1</sup> )	5.0	10.0	15.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g l <sup>-1</sup> )	0.5	1.0	1.5
pH	5.0	7.0	9.0

sucrose as described by Park et al. [16], with modifications. For the extraction of the intracellular enzyme, the cell mass was washed twice with distilled water and then suspended in 50 ml 0.05 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0. The cell suspension was cooled to 5°C and disrupted by ultrasonic vibration (180 W for 20 s). After cell wall disruption, the samples were centrifuged at 12,300×g for 15 min at 5°C.

The enzyme activity of the supernatant was then determined. A mixture of 450 µl of a 4.0% (w/v) sucrose solution in 0.05 M citrate-phosphate buffer pH 6.0, and 50 µl of enzyme solution, were incubated for 20 min at 35°C. Reducing sugars were measured by Somogyi's method [21] using glucose as the standard. One unit of glucosyltransferase activity (U) was defined as the amount of enzyme that liberates 1 µmol of reducing sugar (isomaltulose)/minute from the sucrose solution, under standard assay conditions.

**Table 3** Two level rotatory central composite design (2<sup>3</sup>-RCCD) and response for *Erwinia* sp. D12 glucosyltransferase

Assay	Levels of the variables <sup>a</sup>			Response Enzyme activity (U/ml)
	SCM <sup>b</sup>	YEP <sup>c</sup>	pH	
1	-1	-1	-1	7.88
2	+1	-1	-1	7.53
3	-1	+1	-1	10.21
4	+1	+1	-1	7.77
5	-1	-1	+1	5.56
6	+1	-1	+1	7.37
7	-1	+1	+1	7.83
8	+1	+1	+1	7.71
9	-1.68	0	0	4.96
10	+1.68	0	0	6.35
11	0	-1.68	0	6.71
12	0	+1.68	0	8.23
13	0	0	-1.68	0.70
14	0	0	+1.68	8.26
15	0	0	0	10.84
16	0	0	0	10.64
17	0	0	0	10.72

Corn steep liquor-Milhocina<sup>®</sup> fixed at 20 g l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> fixed at 0.5 g l<sup>-1</sup>

<sup>a</sup> Coded variables

<sup>b</sup> Sugar cane molasses <sup>c</sup>Yeast extract Prodex<sup>®</sup>

**Table 4** Variables and their levels for the two level rotatory central composite design (2<sup>3</sup>-RCCD)

Variable	Coded variable levels				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Sugar cane molasses (g l <sup>-1</sup> )	30.0	78.6	150.0	221.4	270.0
Yeast extract Prodex <sup>®</sup> (g l <sup>-1</sup> )	2.0	7.3	15.0	22.7	28.0
pH	6.0	7.6	8.5	9.4	10.0

Evaluation of the effect of the variables on glucosyltransferase activity

A two level fractional factorial design (2<sup>5-1</sup>-FFD) was employed to evaluate the variables that significantly affected glucosyltransferase activity. Table 1 shows the 2<sup>5-1</sup>-FFD matrix covering the five variables, to evaluate their effect on glucosyltransferase activity. The variables considered for the design were sugar cane molasses (x<sub>1</sub>/SCM), corn steep liquor (x<sub>2</sub>/CSL), yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> (x<sub>3</sub>/YEP), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (x<sub>4</sub>) and pH (x<sub>5</sub>). These factors and their levels are listed in Table 2. The sugar cane molasses, corn steep liquor (Milhocina<sup>®</sup>) and yeast extract Prodex Lac SD<sup>®</sup> were obtained from the Companhia Energética Santa Elisa; Corn Products Brazil and Prodesa Produtos Especiais para Alimentos Ltda, respectively.

Each independent variable was investigated at a high (+1) and a low (-1) level. Centre point runs (three points) were included in the matrix and a statistical analysis was used to identify the effect of each variable on the response. The significance was determined by applying the Student's *t* test, *P* value and significance levels.

Optimisation using rotatory central composite design and response surface methodology

Response surface methodology was used to optimise the levels of the significant variables as identified by the two level fractional factorial design. A two level rotatory central composite design (2<sup>3</sup>-RCCD) with six axial points (α) and three replicates at the central point, giving a total of 17 assays per experiment as per Table 3, was used to optimise the components for glucosyltransferase production by the strain *Erwinia* sp. D12, to obtain maximum enzymatic activity and reduce costs in the fermentation process.

Growth determination and glucosyltransferase production in the optimal culture medium in a 6.6-l fermenter

Bacterial growth and glucosyltransferase activity were determined in the following optimal culture medium: sugar cane molasses (150 g l<sup>-1</sup>), yeast extract Prodex<sup>®</sup> (15 g l<sup>-1</sup>), corn steep liquor-Milhocina<sup>®</sup> (20 g l<sup>-1</sup>) and pH 7.5 in a New Brunswick Bioflo IIc bioreactor 6.6-l fermenter (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). A loop full of culture were inoculated into each of six 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of optimised culture medium and incubated in an orbital shaker at 200 rpm and 30°C for 15 h. A 300 ml aliquot of inoculum was transferred into 2,700 ml of optimised culture medium contained in a 6.6-l fermenter, and incubated under the following conditions: temperature 27°C, initial pH 7.5, aeration rate 1 vvm and agitation speed of 200 rpm. Samples were collected at time-defined intervals and submitted to analysis.

Growth of the microorganism, glucosyltransferase activity and variation of the culture medium pH

Aliquots (20 ml) of the culture broth were centrifuged at 12,300×g for 15 min at 5°C. The cell mass was washed twice with 20 ml of distilled water and re-suspended into 20 ml of distilled water. A Beckman DU 70 spectrophotometer (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) was used to monitor cell growth by

measuring the optical density at 660 nm ( $OD_{660}$ ). Glucosyltransferase activity was estimated as described previously. The pH of the culture medium was measured with an Orion model 710A potentiometer (Orion Research Inc, Boston, MA, USA).

**Influence of temperature, pH and substrate and cell concentrations on the conversion of sucrose into isomaltulose**

The experiments were conducted in a batch mode using an orbital shaker at 200 rpm. The assays to evaluate the influence of temperature (30, 35 and 38°C), pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0), sucrose concentration (35, 37, 40, 42 and 45% w/v) and cell mass concentration (10, 15 and 20% w/v) on the conversion of sucrose into isomaltulose, were carried out in Erlenmeyer flasks containing the reaction medium. Aliquots of the reaction medium were collected after different incubation times (5, 15, 25, 35, 45 and 60 min). The carbohydrate analyses were carried out using a Dionex DX-600 High Performance Liquid Chromatograph.

#### HPLC-PAD analysis

The sugar analyses were performed using an HPLC system consisting of a DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way, Sunnyvale, CA, USA) chromatograph equipped with an Electrochemical Detector ED50, a CarboPac™ PA 1 column (4 × 270 mm) and a CarboPac™ PA 1 guard column (4 × 500 mm), with a mobile phase of 200 mM NaOH at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup> and a temperature of 20°C. The carbohydrates were identified from their retention times as compared to those of the fructose, glucose, sucrose and isomaltulose standards (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

#### Performance of the repeated batch operations using free cells

After studying the influence of temperature, pH and substrate and cell concentrations on the conversion of sucrose into isomaltulose, repeated-batch conversion runs were carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of 35% (w/v) sucrose solution and 10% free cells of *Erwinia* sp. D12 (w of wet cell/v) at pH 6.5. The flasks were maintained in an orbital shaker at 150 rpm and 35°C for 15 min. At the end of each batch, samples were collected and submitted

to analysis. The reaction medium was then centrifuged at 10,070×g for 20 min at 25°C and the free cells used for the next batch conversion of sucrose into isomaltulose with fresh substrate. This process was repeated several times. The carbohydrate analyses were carried out using the Dionex DX-600 High Performance Liquid Chromatograph as described previously.

## Results and discussion

### Evaluation of the effect of the significant variables on glucosyltransferase activity

The experimental design with 19 experiments and 5 factors or independent variables and their corresponding glucosyltransferase activity are indicated in Table 1. The variables listed contained different concentrations of medium components, as shown in Table 2:  $x_1$ , sugar cane molasses (SCM) at a low concentration of 20 g l<sup>-1</sup> and a high concentration of 180 g l<sup>-1</sup>;  $x_2$ , corn steep liquor (Milhocina®-CSL) at a low concentration of 5 g l<sup>-1</sup> and a high concentration of 35 g l<sup>-1</sup>;  $x_3$ , yeast extract Prodex® at a low concentration of 5 g l<sup>-1</sup> and a high concentration of 15 g l<sup>-1</sup>;  $x_4$ , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at a low concentration of 0.5 g l<sup>-1</sup> and a high concentration of 1.5 g l<sup>-1</sup>; and  $x_5$ , pH at a low value of 5.0 and a high value of 9.0. The responses obtained were evaluated statistically and those variables with a confidence level of 95% were regarded as having a significant effect on glucosyltransferase activity. The estimates of the main effects are shown in Table 5.

It is possible to observe that variations in SCM, YEP and pH significantly ( $P < 0.05$ ) affected glucosyltransferase activity and that the main effects were positive, suggesting that the increase in their values or ranges in the medium resulted in the promotion of enzyme production. The estimated effect of CSL was positive, suggesting that an increase in its concentration could improve the enzyme activity, however the effect was not significant ( $P > 0.05$ ) so its concentration was fixed at 20 g l<sup>-1</sup>. The main effect of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was negative, however the variations in concentration of this medium component did not significantly ( $P > 0.05$ ) affect glucosyltransferase activity, suggesting that its lower (-1) concentration was plentiful. Thus, using the two level fractional factorial designs the variables that could significantly affect glucosyltransferase activity were identified.

**Table 5** Main effects and an analysis of the interactions for glucosyltransferase activity from the two level fractional factorial design ( $2^{5-1}$ -FFD)

Factor	Effect	SE	T value	P value
SCM <sup>a</sup>	1.6844	0.2843	5.246	0.273*
CSL <sup>b</sup>	1.1621	0.2843	4.874	0.550
YEP <sup>c</sup>	1.5451	0.2843	5.344	0.0322*
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-0.8963	0.843	-3.526	0.0876
pH	5.8192	0.843	20.675	0.0024*

<sup>a</sup> Sugar cane molasses<sup>b</sup> Corn steep liquor-Milhocina<sup>®</sup><sup>c</sup> Yeast extract Prodex<sup>®</sup>\*Significant factors ( $P < 0.05$ )

#### Optimisation using a rotatory central composite design and response surface methodology

The variables sugar cane molasses (SCM), yeast extract Prodex<sup>®</sup> (YEP) and pH were the most effective factors promoting glucosyltransferase activity, and their values were further optimised using a two level rotatory central composite design ( $2^3$ -RCCD). The experimental results for glucosyltransferase activity using the complete  $2^3$ -RCCD with four replicates of the central points, six assays corresponding to the axial points and eight assays corresponding to the factorial points, are shown in Table 3. The levels studied with the decoded values are shown in Table 4.

The correlation measurements used in the estimation of the regression equation were the multiple correlation coefficients ( $R$ ) and the determination coefficient ( $R^2$ ). The closer the value of  $R$  was to 1, the better the correlation between the observed and predicted values. Table 6 shows the analysis of variance (ANOVA/ $F$  test) for this experiment and the coefficient of determination ( $R^2$ ). The goodness of fit of the model was checked using the coefficient of determination, which was shown to be 0.97, indicating that only 3% of the total variation was not explained by the model. This indicated that the accuracy and general ability of the quadratic model was good, and the analysis of the response trends using the model was considered to be reasonable. The value for  $R$  was 0.98, showing excellent correlation between the predicted and experimental values. The  $F$  value of 38.33 for glucosyltransferase activity implied that the model was statistically significant ( $F_{\text{model}}$  exceeded the tabulated value of  $F_{0.95,7,9}$  by 11.7 times). The lack of fit test compares the residual error to the pure error from replicates central points. The lack of fit  $F$  value of 22.31 implied that the lack of this factor was significant. There is only a 0.05% chance that a lack of fit  $F$  value

this large could occur due to noise. Thus the estimated model adequately fitted the experimental data.

The regression coefficients and the corresponding  $P$  values for the model of glucosyltransferase activity are presented in Table 7. The  $P$  values were used as a tool to check the significance of each coefficient, and also indicated the strength of the interaction between each independent variable. The larger the magnitude of the  $T$  value and the smaller the value of  $P$ , the more significant is the corresponding coefficient. It can be seen that almost the whole regression was significant except for one linear coefficient (SCM) and one interaction coefficient (YEP and pH). These results were good enough indicators for a model representing the real relationship between glucosyltransferase activity and the independent variables. Using the  $2^3$ -RCCD, the polynomial model (Eq. 1) for glucosyltransferase activity was regressed by only considering the significant terms, as shown below:

$$y = 10.76 - 1.74 x_1^2 + 0.57 x_3 - 1.10 x_3^2 - 0.70 x_5 - 0.33 x_5^2 - 0.50 x_1 x_3 + 0.56 x_3 \text{ pH} \quad (1)$$

where  $y$  was the predicted response for glucosyltransferase activity and  $x_1$ ,  $x_3$  and  $x_5$  were the coded values for SCM, YEP and pH, respectively. The response surfaces and contour curves (Figs. 1, 2) representing the predicted model indicated the levels of the variables necessary for an optimal process. The components SCM, YEP and pH affected the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. D12.

The experimental design and response surface methodology indicated that the following amounts of SCM ( $150 \text{ g l}^{-1}$ ), YEP ( $15 \text{ g l}^{-1}$ ), CSL ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ) and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ) and a pH of 7.5, increased the glucosyltransferase activity, obtaining a maximum glucosyltransferase activity of 10.84 U/ml. The glucosyltransferase activity obtained using agricultural wastes (corn steep liquor and sugar cane molasses) was 3.7 times higher than that produced by the strain *Klebsiella* sp., when 2.95 U/ml was obtained using cells incubated in a culture medium composed of beef extract and sucrose [16]. The glucosyltransferase purified from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, isolated by Nagai et al. [14], presented 13.89 U/mg protein. However, the authors used a media composed of beef extract, peptone, NaCl and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> to obtain the cells. Huang et al. [6] obtained glucosyltransferase activity of 5.2–11.08 U/ml from the strain *Klebsiella planticola* CCRC 19112 in the early stationary phase, using a variety of carbon sources

**Table 6** ANOVA for the two-level rotatory central composite design (2<sup>3</sup>- RCCD)

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F ratio (model significance)
Regression	53.66	07	7.67	38.33 <sup>a</sup>
Residual	1.80	09	0.20	
Lack of fit	1.76	06	0.29	22.31 <sup>b</sup>
Pure error	0.04	03	0.013	
Total	55.46	16		

Coefficient of determination  $R^2 = 0.97$ ,  $F_{0.95,7,9} = 3.29$ ,  $F_{0.95,6,3} = 8.90$

<sup>a</sup> F ratio (regression/residual)

<sup>b</sup> F ratio (lack of fit/pure error)

(sucrose and fructose were the most effective), inorganic salts (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and supplemental nitrogen sources (bacto-tryptone was the most effective). The strain *Klebsiella planticola* MX-10 showed maximum glucosyltransferase activity of 4.3 U/ml [25]. Using a fermentation medium composed of peptone (4%) and yeast extract (0.4%); and the strain *Klebsiella* sp. LX3, 15.12 U/ml of enzyme activity was obtained [12]. In this study, sugar cane molasses, corn steep liquor Milhocina<sup>®</sup> (agricultural wastes) and commercial yeast extract (Prodex Lac SD<sup>®</sup>) were used with the purpose of producing a low cost culture medium. The results were satisfactory and the components sugar cane molasses and corn steep liquor were, respectively, very useful carbon and nitrogen sources for enzyme production.

**Table 7** Regression coefficients and significant factors for the two-level rotatory central composite design (2<sup>3</sup>- RCCD) used to obtain a polynomial model for predicting glucosyltransferase activity

	Regression coefficient	Standard deviation	t value	P value
Mean*	10.7563	0.0584	184.2307	3.5265E-07
SCM <sup>a</sup> (L)	0.0895	0.0316	2.8284	6.6277E-02
SCM (Q)*	-1.7367	0.0337	-51.5419	1.6084E-05
YEP <sup>b</sup> (L)*	0.5667	0.0316	17.9065	3.7982E-04
YEP (Q)*	-1.0954	0.0337	-32.5098	6.3966E-05
pH <sup>c</sup> (L)*	-0.6972	0.0391	-17.8304	3.8467E-04
pH (Q)*	-0.3292	0.0419	-7.8659	4.2808E-03
1l × 2l*	-0.5025	0.0413	-12.1575	1.1980E-03
1l × 3l*	0.5611	0.0413	13.5749	8.6465E-04
2l × 3l	0.0041	0.0413	0.0988	9.2750E-01

<sup>a</sup> sugar cane molasses

<sup>b</sup> yeast extract Prodex<sup>®</sup>

<sup>c</sup> pH

L linear factor, Q quadratic factor,\*Significant factors (P < 0.05)

Growth determination and glucosyltransferase production using the optimised culture medium in a 6.6-l fermenter

Glucosyltransferase production and the growth characteristics of *Erwinia* sp. D12 using the optimised culture medium are illustrated in Fig. 3. The highest enzyme activity was obtained after 8 h of fermentation (22.49 U/ml), then decreasing to 16.75 U/ml after 10 h and remaining constant, between 14 and 17.5 U/ml, up to 26 h of fermentation time. The pH of the culture medium was between 5.9 and 6.1 during fermentation, suggesting little production of acid as a by-product. Moraes et al. [13] obtained 15.6 U/ml of glucosyltransferase activity from *Erwinia* sp. cells incubated in a 3.0-l fermenter containing culture medium composed of sugar cane molasses, bacteriological peptone and beef extract, at 30°C, 200 rpm and 1 vvm. The cell mass obtained from the bioreactor fermentation at 27°C was used in further studies to verify the conversion of sucrose to isomaltulose from free cells in repeated-batch processes.

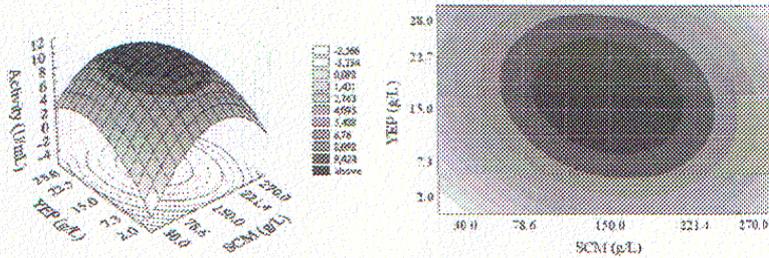
Influence of temperature, pH and substrate and cell concentrations on the conversion of sucrose to isomaltulose

The influences of temperature, pH and substrate and cell concentrations on the conversion of sucrose into isomaltulose were evaluated using an orbital shaker, and the time courses for isomaltulose formation by free cells are shown in Figs. 4 and 5. Figure 4a, b and c illustrates the conversion of sucrose into isomaltulose at 30, 35 and 38°C, respectively. The maximum isomaltulose yield (63.33%) at 38°C was obtained at pH 5.0 after 35 min reaction. At 30°C the highest conversion (63.83%) was obtained at pH 6.5 after 60 min reaction. However, at 35° the highest isomaltulose yields were obtained: 64.16 and 64.94% after 35 and 45 min, respectively.

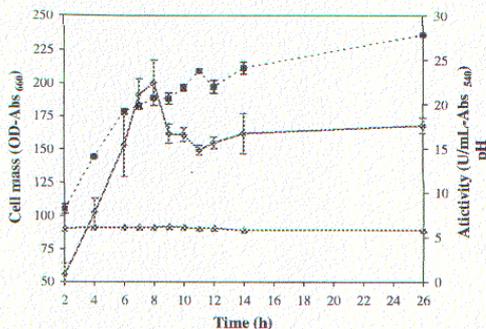
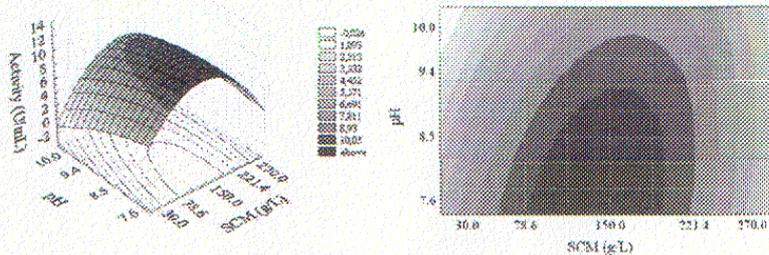
Figure 5a, b and c illustrate the effect of wet cell mass and sucrose concentration on sucrose conversion into isomaltulose. The highest isomaltulose yields were verified using 10% wet cell mass with a 35% sucrose solution (Fig. 5d) and 15% wet cell mass with a 37% sucrose solution (Fig. 5e), obtaining, respectively, 69.45% of isomaltulose after 15 min, and 69.53% after 25 min. The productivity using the 10% wet cell mass and 35% sucrose solution (0.0463 g isomaltulose/g sucrose/min) was higher than with the 15% wet cell mass and 37% sucrose solution (0.0278 g isomaltulose/g sucrose/min).



**Fig. 1** Response surface and contour curve for the glucosyltransferase activity as a function of SCM and YEP concentrations, according to the two level rotatory central composite design ( $2^3$ -RCCD)



**Fig. 2** Response surface and contour curve for the glucosyltransferase activity as a function of SCM concentrations and pH, according to the two level rotatory central composite design ( $2^3$ -RCCD)



**Fig. 3** Study of the growth of the microorganism and production of glucosyltransferase at 27°C. Filled square cell mass, filled diamond activity, filled triangle pH

Performance of repeated batch operations using free cells

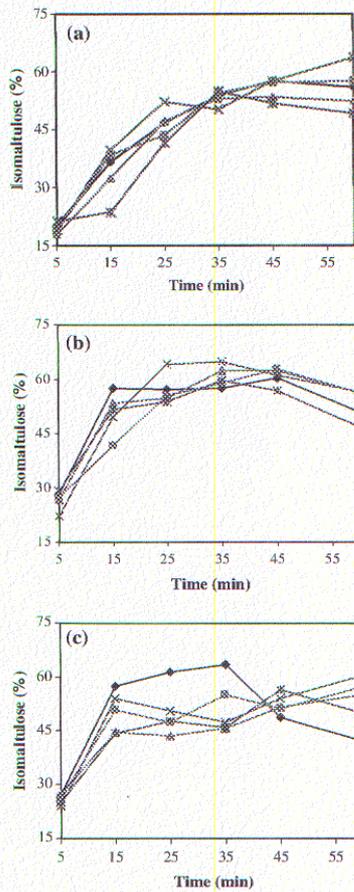
The stability of the glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 during the conversion of sucrose into isomaltulose was evaluated by using the free cells repeatedly during 16 batch operations (Fig. 6). The conversion of sucrose into isomaltulose after eight batches was higher than 60% and the highest conversion of sucrose into isomaltulose (72.11%) was verified in batch number one. In the first batch, traces of

sucrose, glucose and fructose were detected and the conversion rate was 97%. After eight batches, the cells were centrifuged at 10.070×g for 20 min and washed once with distilled water. The cell mass was incubated with a fresh culture medium overnight to observe the effect on the viability of the microorganism. However, it was verified that the cells had no effect on the isomaltulose yield after the treatment with fresh culture medium, and the conversion rate decreased to 34.78% of isomaltulose in batch number 16. The conversion of sucrose into isomaltulose using whole cells of *Klebsiella planticola* CCRC 10112 was 76% [6] and using the purified enzyme from the strain *Klebsiella planticola* MX-10, it was 63.9%(18). Véronèse and Perlot [26] obtained 72.6% isomaltulose using a purified glucosyltransferase from *Serratia plymuthica* ATCC 15928. The isomaltulose yields obtained from *Erwinia* sp. [13] and *Klebsiella* sp. LX3 [12] cells immobilized in calcium alginate were 50 and 87%, respectively. The isomaltulose yield using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan was 80% [9].

Conclusions

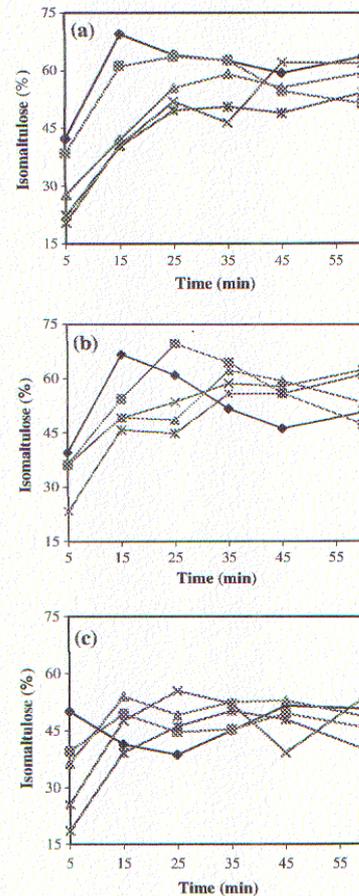
Using response surface methodology (RSM), statistically optimal values for the independent variables are acquired from the central points of the contour along





**Fig. 4** Time course for isomaltulose production from sucrose by *Erwinia* sp. D12 free cells varying temperature and pH: **a** 30°C × pH; **b** 35°C × pH; **c** 38°C × pH. Filled diamond pH 5.0, filled square pH 5.5, asterisk pH 6.0, cross pH 6.5, filled triangle pH 7.0

the major and minor axes. Using RSM, the optimal concentrations for the sugar cane molasses (SCM), corn steep liquor (Milhocina<sup>®</sup>-CSL), yeast extract (Prodex Lac SD<sup>®</sup>-YEP) and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. D12 were found to be 150, 20, 15 and 0.5 g l<sup>-1</sup>, respectively, and the optimal pH was 7.5. After 8 h of fermentation in this media at 30°C, 10.84 U/ml of glucosyltransferase were obtained. When *Erwinia* sp. D12 was grown aerobically in a 6.6-l fermenter, the greatest production of glucosyltransferase (22.49 U/ml) was obtained after 8 h of fermentation. The free cells of *Erwinia* sp. D12

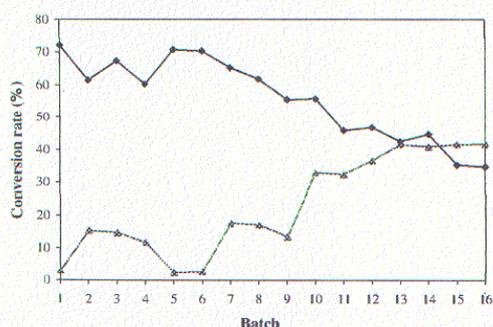


**Fig. 5** Time course for isomaltulose production from sucrose by *Erwinia* sp. D12 free cells varying wet cell mass and sucrose concentration: **a** 10% wet cell × sucrose; **b** 15% wet cell × sucrose; **c** 20% wet cell × sucrose. Filled diamond 35% sucrose, filled square 37% sucrose, asterisk 40% sucrose, cross 42% sucrose, filled triangle 45% sucrose

converted a 35% sucrose solution into isomaltulose in a batch process, obtaining 72.11% isomaltulose after 15 min at 35°C. High reaction speeds and yields were obtained using *Erwinia* sp D12 cells in a batch process. New investigations are necessary to optimise the conversion of sucrose into isomaltulose.

**Acknowledgments** We are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and GETEC Guanabara Química Industrial S/A, for their financial support.





**Fig. 6** Repeated batch fermentation with recycled cells of *Erwinia* sp. D12 for the production of isomaltulose from sucrose. Filled diamond isomaltulose, filled triangle sucrose

## References

- Bucke C, Cheetham PSJ (1982) Production of isomaltulose. US patent 201,462
- Cheetham PSJ, Imber CE, Isherwood J (1982) The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapsodica*. Nature 299:628–631
- Godshall MA (1997) How carbohydrates influence food flavors. Food Technol 51:63–66
- Hashimoto H, Yamada K, Yoshimura J (1987) Glucosylation of methyl  $\beta$ -D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. Biotechnol Lett 9:849–854
- Heikkilä H, Sarkki M, Lindroos M, Ojala P, Ravanko V, Tylli M (2000) Process of the production of isomaltulose and other products. US patent 082555
- Huang JH, Hsu LH, Su YC (1998) Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. J Ind Microbiol Biotechnol 21:22–27
- Kawai K, Okuda Y, Yamashita K (1985) Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. Endocrinol Jpn 32:933–936
- Kawai K, Yoshikawa H, Murayama Y, Okuda Y, Yamashita K (1989) Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. Horm Metab Res 21:338–340
- Krastanov A, Yoshida A (2003) Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. J Ind Microbiol Biotechnol 30:593–598
- Lantero OJ (1983) Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*. E. patent 82109404.2
- Lina BAR, Smits-van prooije AE, Waalkens-berendsen DH (1997) Embryotoxicity/ teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. Food Chem Toxicol 35:309–314
- LiX, Zhao C, Na Q, Zhang D (2003) Substrate induction isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX 3. J Appl Microbiol 95:2131–2136
- Moraes ALL, Steckelberg C, Sato HH, Pinheiro A (2005) Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio. Ciênc Tecnol Aliment 25:95–102
- Nagai Y, Sugitani T, Tsuyuki KI (1994) Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. Biosci Biotechnol Biochem 58:1789–1793
- Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, Okahashi N, Hamada S (1983) Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. Infect Immun 39:43–49
- Park YK, Uekane RT, Sato HH (1996) Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. Rev Microbiol 27:131–136
- Sasaki N, Topitsoglou V, Takazoe I, Frostell G (1985) Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E-49. Swed Dent J 9:149–155
- Sarkki M, Heikkilä H, Viljava T (1999) Immobilization of microorganisms on weakly basic anion exchange substance for producing isomaltulose. US patent 857808
- Schiweck H, Steinle G, Müller L, Gau W, Munir M (1980) Glucopyranosido-1,6-mannitol, a process for producing the same and its use as a sugar substitute. US patent 21,252
- Shimizu J, Suzuki K, Nakajima Y (1982) Method of producing an immobilized alpha-glucosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. UK patent 8124779
- Somogyi M (1945) A new reagent for the determination of sugars. J Biol Chem 160:61–68
- Takazoe I (1985) New trends on sweeteners in Japan. Int Dent J 35:58–65
- Takazoe I, Frostell G, Ohta K, Topitsoglou V, Sasaki N (1985) Palatinose—a sucrose substitute. Swed Dent J 9:81–87
- Topitsoglou V, Sasaki N, Frostell G (1984) Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. Caries Res 18:47–51
- Tsuyuki K, Sugitani Y, Miyata Y, Ebashi T, Nakajima Y (1992) Isolation and characterization of trealulose-producing bacteria from Thailand soil. J Gen Appl Microbiol 38:483–490
- Véronèse T, Perlot P (1999) Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. Enzyme Microb Technol 24:263–269