

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos**

**PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DE
SACAROSE UTILIZANDO A BACTÉRIA
*SERRATIA PLYMUTHICA***

**Daniela Castilho Orsi
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 de
Título de Doutor em Ciência de Alimentos

**Campinas, São Paulo
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Or8p	Orsi, Daniela Castilho Produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando a bactéria <i>Serratia plymuthica</i> / Daniela Castilho Orsi. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Hélia Harumi Sato Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos 1. Isomaltulose. 2. Glicosiltransferase. 3. <i>Serratia plymuthica</i>. 4. Células livres. 5. Células imobilizadas. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título. (cars/fea)
------	--

Titulo em inglês: Production of isomaltulose from sucrose using the bacteria *Serratia plymuthica*
Palavras-chave em inglês (Keywords): Isomaltulose, Glucosyltransferase, *Serratia plymuthica*,
Free cells, Immobilized cells

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Gabriela Alves Macedo

Luciana Ferracini dos Santos

Haroldo Yukio Kawaguti

Severino Matias de Alencar

Data da defesa: 10/10/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca examinadora

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato (orientadora)

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Prof. Dr. Haroldo Yukio Kawaguti

Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar

Profa. Dra. Ana Lúcia Leite de Moraes

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Para mamãe, papai,
Alessandra, André, Vinicius
e meus seres celestiais
com muito amor e carinho
dedico

AGRADECIMENTOS

A Professora Hélia pela oportunidade e dedicação.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A indústria CP KELCO pela doação da goma gelana KELCOGEL[®] F.

A minha irmã Alessandra pela impressão gráfica profissional das figuras.

A todas as pessoas do Laboratório de Bioquímica, incluindo os colegas de pesquisa, professores e técnicos.

INDÍCE:

ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1: ISOMALTULOSE: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES, MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE QUE CONVERTE SACAROSE EM ISOMALTULOSE.....	1
--	----------

RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
Características e aplicações da isomaltulose.....	4
Microrganismos produtores de glicosiltransferase e características da enzima.....	9
Conversão de sacarose em isomaltulose.....	12
CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA BACTÉRIA <i>SERRATIA</i> <i>PLYMUTHICA</i>.....	33
--	-----------

RESUMO.....	33
INTRODUÇÃO.....	34

MATERIAL E MÉTODOS.....	37
Manutenção do microrganismo.....	37
Planejamento experimental.....	38
Condições de fermentação.....	38
Determinação da atividade de glicosiltransferase.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
Primeiro planejamento experimental.....	40
Segundo planejamento experimental.....	47
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO DA BACTÉRIA <i>SERRATIA PLYMUTHICA</i> PARA PRODUÇÃO DE MASSA CELULAR E BIOSÍNTESE DE GLICOSILTRANSFERASE.....	57
RESUMO.....	57
INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
Experimentos de fermentação.....	60
Determinação da atividade de glicosiltransferase, da concentração de massa celular e do pH do meio de cultura.....	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62

Fermentação do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®)	
pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i> nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C.....	62
Fermentação do meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®)	
pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i> nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C.....	63
CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
 CAPÍTULO 4: ESTUDO DA CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE UTILIZANDO-SE CÉLULAS LIVRES DA BACTÉRIA <i>SERRATIA</i> <i>PLYMUTHICA</i>	72
RESUMO.....	72
INTRODUÇÃO.....	74
MATERIAL E MÉTODOS.....	76
Produção de massa celular da bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	76
Influência da concentração de substrato, da concentração de massa celular, da temperatura e do pH na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres, nos tempos de reação de 10-70 minutos.....	76
Efeito do tempo de incubação das células livres na conversão de sacarose em isomaltulose.....	77
Planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres.....	77

Estabilidade das células livres na conversão de sacarose em isomaltulose no processo de batelada.....	79
Análise de carboidratos.....	79
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
Influência da concentração de substrato sacarose (25-45 %), da concentração de massa celular úmida (8 e 16 %), da temperatura (27-35°C) e do pH (5,0-7,0) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	81
Efeito do tempo de incubação das células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> na conversão de sacarose em isomaltulose.....	88
Influência da temperatura (27-45°C), da concentração de massa celular úmida (10-30 %, p/v) e da concentração de solução de sacarose (15-35 % p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®).....	91
Influência da temperatura (27-45°C), da concentração de massa celular úmida (10-30 %, p/v) e da concentração de solução de sacarose (15-35 % p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).....	96
Estabilidade enzimática das células livres de <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) na conversão de sacarose em isomaltulose no processo de batelada.....	102
CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

CAPÍTULO 5: CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE POR CÉLULAS DA BACTÉRIA <i>SERRATIA PLYMUTHICA</i> IMOBILIZADAS EM ALGINATO.....	108
RESUMO.....	108
INTRODUÇÃO.....	109
MATERIAL E MÉTODOS.....	112
Produção de massa celular da bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	112
Imobilização celular em alginato de cálcio.....	113
Produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando bioreator.....	114
Tratamento das células imobilizadas em alginato Synth® 2% com glutaraldeído.....	115
Análise dos carboidratos.....	115
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leito empacotado contendo células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato Synth® 2% e em alginato Sigma® 1%	116
Estabilidade enzimática nas células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato Synth® 2% e tratadas com glutaraldeído na conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreator.....	119
Estabilidade enzimática nas células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato Synth® 2% e não tratadas com glutaraldeído na conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreator.....	120
CONCLUSÕES.....	123

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
 CAPÍTULO 6: GOMA GELANA: ESTUDO DE UM NOVO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA BACTÉRIA <i>SERRATIA PLYMUTHICA</i>.....	126
 RESUMO.....	126
 INTRODUÇÃO.....	128
 MATERIAL E MÉTODOS.....	130
 Produção de massa celular da bactéria <i>Serratia plymuthica</i>.....	130
Imobilização celular em goma gelana.....	130
Testes preliminares para conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana.....	131
Influência da concentração de substrato e da concentração de goma gelana na conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana e cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).....	131
Produção de isomaltulose a partir de sacarose em bioreatores de leito empacotado contendo células imobilizadas em goma gelana	132
Influência da secagem das células imobilizadas em goma gelana 3% (p/v) e tratadas com glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leito empacotado	132
Análise dos carboidratos.....	133
 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	135

Testes preliminares para conversão de sacarose em isomaltulose por células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana.....	135
Influência da concentração de substrato (15-55 %, p/v) e da concentração de goma gelana (1-5 %, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana.....	138
Conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leito empacotado contendo células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana	140
Influência da secagem das células imobilizadas em goma gelana 3% (p/v) e tratadas com glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leito empacotado.....	142
CONCLUSÕES.....	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Valores decodificados (g/L) utilizados no primeiro planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	40
Tabela 2.2. Primeiro planejamento experimental codificado e resultados dos efeitos das variáveis do meio de cultivo (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	41
Tabela 2.3. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	42
Tabela 2.4. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do primeiro planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	43
Tabela 2.5. Análise de variância do primeiro planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	43
Tabela 2.6. Valores decodificados (g/L) utilizados no segundo planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	47
Tabela 2.7. Segundo planejamento experimental codificado e resultados dos efeitos das variáveis do meio de cultivo (melaço de cana de açúcar e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	48

Tabela 2.8. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do segundo planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.....49

Tabela 2.9. Análise de variância do segundo planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*..... 49

Tabela 3.1. Efeito da temperatura na produção de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação da bactéria *Serratia plymuthica* em meio de cultivo otimizado 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®)59

Tabela 3.2. Efeito da temperatura na produção de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação da bactéria *Serratia plymuthica* em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®)..... 60

Tabela 3.3. Temperatura e tempo de fermentação dos microrganismos para produção de glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose 64

Tabela 4.1. Valores decodificados do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*.....78

Tabela 4.2. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®), utilizando concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e concentração de substrato sacarose 25%, 35% e 45% (p/v), nos tempos de reação de 10-70 minutos a 30°C.....81

Tabela 4.3. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e solução de sacarose 25% (p/v) em água, em tampão citrato-fosfato 0,005 M pH 6,0 e em tampão citrato-fosfato 0,005 M pH 7,0, após 70 minutos de incubação a 27°C.....87

Tabela 4.4. Efeito do tempo de incubação (10 a 120 minutos) na conversão de solução 25% (p/v) de sacarose em isomaltulose e outros açúcares por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*.....88

Tabela 4.5. Resultados do planejamento experimental para estudo dos efeitos da temperatura, da concentração de massa celular e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio do cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)92

Tabela 4.6. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).....93

Tabela 4.7. Análise de variância do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)93

Tabela 4.8. Resultados do planejamento experimental para estudo dos efeitos da temperatura, da concentração de massa celular e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia*

<i>plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)	97
--	----

Tabela 4.9. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)	98
---	----

Tabela 4.10. Análise de variância do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)	98
--	----

Tabela 5.1: Conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares por células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato Synth® 2% e em alginato Sigma® 1%	116
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Conversão de sacarose em isomaltulose pela enzima glicosiltransferase ..	2
Figura 1.2: Conversão de isomaltulose em isomalte por hidrogenação	7
Figura 2.1: Ilustração das colônias da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo composto de 60 g/L de sacarose, 40 g/L de peptona, 4 g/L de extrato de carne e 20 g/L de ágar, por 24 horas, a 30°C	37
Figura 2.2: Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de glicosiltransferase (UA/mL) de <i>Serratia plymuthica</i> em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás® e melaço de cana, referente ao primeiro planejamento.....	45
Figura 2.3: Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de glicosiltransferase (UA/mL) de <i>Serratia plymuthica</i> em função da concentração de extrato de levedura Prodex Lac SD® e melaço de cana, referente ao primeiro planejamento.....	46
Figura 2.4: Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de glicosiltransferase (UA/mL) de <i>Serratia plymuthica</i> em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD®, referente ao segundo planejamento.....	51
Figura 3.1: Ilustração do fermentador de 6,6 L Bioflo IIC	60
Figura 3.2: Efeito da temperatura na produção de glicosiltransferase, concentração de massa celular e alteração do pH do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®) e do meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®), fermentados pela bactéria <i>Serratia plymuthica</i>	65
Figura 4.1. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> : (1) Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para	

obtenção da massa celular, (2) Ensaios com células livres e substrato sacarose em banho-maria com agitação, (3) Análise dos carboidratos em cromatógrafo Dionex [®]	80
Figura 4.2. Efeito da concentração de substrato (25%, 35% e 45%) e do tempo de reação (10 a 70 minutos) na conversão de sacarose em isomaltulose a 30°C, utilizando-se células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás [®]) na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v)	82
Figura 4.3. Influência da concentração de substrato (25%, 35% e 45%) na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e tempo de incubação de 70 minutos a 30°C.....	83
Figura 4.4. Influência da temperatura (27°C, 30°C e 35°C) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e tempo de incubação de 70 minutos	84
Figura 4.5. Influência da concentração de massa celular úmida (8% e 16%) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> após 70 minutos de incubação a 27°C e 30°C.....	85
Figura 4.6. Influência do pH (5,0, 6,0 e 7,0) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e tempo de incubação de 70 minutos a 27°C	86
Figura 4.7. Conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose e outros açúcares, utilizando células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em	

meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®), nos tempos de reação de 10 a 120 minutos a 27°C.....	89
Figura 4.8: Curvas de contorno e superfícies de resposta da conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> produzidas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®), em função: (a) da concentração de massa celular úmida e da temperatura e (b) da concentração de solução sacarose e da temperatura.....	95
Figura 4.9: Curvas de contorno e superfícies de resposta da conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> produzidas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) em função: (a) da concentração de massa celular úmida e da temperatura e (b) da concentração solução de sacarose e da temperatura.....	100
Figura 4.10. Conversão de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose no processo de batelada, utilizando células livres de <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).....	102
Figura 5.1: Composição do alginato: (a) unidade de ácido manurônico (M) e unidade de ácido gulurônico (G) e (b) cadeia do alginato com diferentes seqüências de ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M).....	109
Figura 5.2: Fermentação da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> e centrifugação do meio de cultivo para obtenção de massa celular	112
Figura 5.3: Técnica de imobilização das células de <i>Serratia plymuthica</i> em alginato de cálcio	113
Figura 5.4: Produção contínua de isomaltulose em bioreatores.....	114
Figura 5.5: Produção de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose em bioreatores contendo células de <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato de	

cálcio: (a) células imobilizadas em alginato Synth [®] 2% (p/v) e (b) células imobilizadas em alginato Sigma [®] 1% (p/v).....	117
Figura 5.6: Produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir da sacarose em bioreator 1, contendo células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato Synth [®] 2% e tratadas com glutaraldeído	119
Figura 5.7: Produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir da sacarose em bioreator 2, contendo células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato Synth [®] 2% e não tratadas com glutaraldeído	120
Figura 5.8: Conversão contínua de sacarose em isomaltulose por células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em alginato de cálcio, tratadas e não tratadas com glutaraldeído, em bioreatores	121
Figura 6.1: Composição da goma gelana KELCOGEL [®] F.....	129
Figura 6.2. Conversão de sacarose em isomaltulose por células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana: (1) Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para obtenção da massa celular, (2) Técnica de imobilização celular em goma gelana, (3) Produção contínua de isomaltulose a partir de sacarose em bioreatores.....	134
Figura 6.3: Células de <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana: (a) massa celular obtida com meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás [®]) e (b) massa celular obtida com meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás [®])	135
Figura 6.4: Conversão de sacarose em isomaltulose por células de <i>Serratia plymuthica</i> cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás [®]) e imobilizadas em goma gelana	136

Figura 6.5: Conversão de sacarose em isomaltulose por células de <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana: (a) influência da concentração de substrato (15-55%) na conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana 3%, (b) influência da concentração de goma gelana (1-5%) na imobilização celular e na conversão de solução sacarose 35% em isomaltulose.....	139
Figura 6.6: Conversão de solução sacarose 45% em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 1, contendo células de <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana 3%	140
Figura 6.7: Conversão de solução sacarose 35% em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 2, contendo células de <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana 5%	141
Figura 6.8: Células de <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana 3% e tratadas com glutaraldeído: (a) células frescas, sem tratamento de secagem e (b) células secas por 36 horas, sob refrigeração a 10°C	142
Figura 6.9: Conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 1 mantido a 25°C, utilizando-se células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído e secas por 36 horas, sob refrigeração a 10°C	143
Figura 6.10: Produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose em bioreator 2 mantido a 25°C, utilizando-se células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído e frescas ou sem o tratamento de secagem	144
Figura 6.11: Conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreatores mantidos a 25°C, contendo células da bactéria <i>Serratia plymuthica</i> imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído, secas por 36 horas e frescas ou sem o tratamento de secagem.....	145

RESUMO

A sacarose é o principal açúcar utilizado no processamento de alimentos, contudo, o consumo excessivo e não balanceado de alimentos com alto teor de sacarose contribui para a prevalência de doenças como obesidade e cáries dentárias. Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento do interesse pela produção de novos açúcares como alternativa para substituir a sacarose. A isomaltulose (*O*- α -D-glicopiranosil-1,6-frutofuranosídeo) é um açúcar pouco cariogênico e isômero estrutural da sacarose, encontrada naturalmente no mel em pequenas quantidades. A bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928 produz a enzima glicosiltransferase e catalisa a conversão da sacarose em isomaltulose.

Neste trabalho, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para estudar o efeito dos componentes do meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica* em frascos sob agitação a 200 rpm e 30°C. Foi obtida alta produção de glicosiltransferase (14,26 UA/mL, média dos pontos centrais) utilizando-se o meio de cultivo 1, composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. O meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]), além de render ótima produção de glicosiltransferase (13,54 UA/mL, média dos pontos centrais), teve seu custo reduzido por ser formulado sem a adição do componente peptona bacteriológica da Biobrás[®]. Foi estudado o efeito da temperatura (26°C, 28°C e 30°C) na fermentação da bactéria *Serratia plymuthica* para produção de massa celular e de glicosiltransferase em fermentador de 6,6 L. A maior produção de glicosiltransferase ocorreu após 6 horas de fermentação na temperatura de 26°C, sendo obtida atividade enzimática de 25,97 UA/mL.

As células livres da bactéria *Serratia plymuthica* foram utilizadas para a conversão de sacarose em isomaltulose. Utilizando-se concentração de massa celular úmida de 20%

(p/v) e concentração de solução de sacarose de 25% (p/v) obteve-se alta porcentagem de isomaltulose (84,33%, valor médio dos meios de cultivo 1 e 2) após 2 horas de reação a 27°C, em frascos sob agitação a 180 rpm. As células livres cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) foram reutilizadas por nove bateladas sucessivas e obteve-se eficiente conversão de sacarose em isomaltulose (75,20%, média das bateladas).

Foi estudada a produção de isomaltulose a partir de sacarose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio. A conversão de sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas foi feita em bioreatores de leito empacotado mantidos a temperatura de 25°C. O tratamento das células imobilizadas em alginato Synth® 2% com glutaraldeído aumentou a atividade enzimática, sendo obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 64% por 15 dias.

A goma gelana KELCOGEL® F foi utilizada como suporte para imobilização das células de *Serratia plymuthica*. As células imobilizadas em goma gelana tratadas com glutaraldeído foram secas por 36 horas, sob refrigeração a 10°C. As células imobilizadas foram transferidas para bioreatores mantidos a 25°C e usadas na conversão contínua de sacarose em isomaltulose. Quando as células imobilizadas secas foram utilizadas no processo contínuo, a conversão de sacarose em isomaltulose manteve-se acima de 69% por 15 dias. Esse estudo demonstrou a possibilidade do uso da goma gelana KELCOGEL® F como suporte para imobilização das células de *Serratia plymuthica*. O suporte utilizado combina a simplicidade na técnica de imobilização celular, boa estabilidade operacional e altas taxas de bioconversão.

Palavras-chave: Isomaltulose, Glicosiltransferase, *Serratia plymuthica*, Células livres, Células imobilizadas

ABSTRACT

Sucrose is the main sweetener used in food processing, but, the excessive and imbalanced consumption of high-sucrose foods is a contributory factor in obesity and dental caries. In the last few decades, the production of new sweeteners as alternatives to sucrose has aroused great interest. Isomaltulose (*O*- α -D-glucopyranosyl-1,6-fructofuranose) is a low cariogenic sweetener and a structural isomer of sucrose, naturally present in honey in small quantities. The bacteria *Serratia plymuthica* ATCC 15928 produces the enzyme glucosyltransferase and catalyses the conversion of sucrose into isomaltulose.

In this work, response surface methodology was applied to study the effect of culture medium components in the production of glucosyltransferase by *Serratia plymuthica* in shaken flasks at 200 rpm and 30°C. Higher glucosyltransferase production (14.26 UA/mL, average of the central points) was obtained in culture medium 1, composed of 40 g/L of sugar cane molasses, 15 g/L of Biobrás[®] bacteriological peptone and 20 g/L of Prodex Lac SD[®] yeast extract. Culture medium 2 (40 g/L of sugar cane molasses and 20 g/L of Prodex Lac SD[®] yeast extract, formulated without the component Biobrás[®] bacteriological peptone, resulted in a low cost medium and optimized glucosyltransferase production (13.54 UA/mL, average of the central points). The influence of temperature (26°C, 28°C and 30°C) on the growth of the bacterium *Serratia plymuthica* for cell mass and glucosyltransferase production in a 6.6 L bioreactor, was also studied. The highest production of glucosyltransferase (25.97 UA/mL) was obtained in culture medium 1 after 6 hours at 26°C.

Free *Serratia plymuthica* cells were used for the conversion of sucrose into isomaltulose. A higher isomaltulose production (84.33%, mean value for culture media 1 and 2) was obtained at a temperature of 27°C, 20% (w/v) wet cell mass and 25% (w/v) sucrose solution after 2 hours of reaction in shaken flasks at 180 rpm. The free cells cultivated in the culture medium 2 (without Biobrás[®] bacteriological peptone) were reused

for nine successive batches, with efficient conversion of sucrose into isomaltulose (75.20%, average of the batches).

Furthermore, the conversion of sucrose into isomaltulose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in calcium alginate was also studied. The continuous production of isomaltulose by immobilized cells was accomplished in packed bed bioreactors maintained at 25°C. The treatment of cells immobilized in 2% Synth[®] alginate with glutaraldehyde increased enzyme activity obtaining an isomaltulose production of over 64% for 15 days.

The gellan gum KELCOGEL[®] F was also used as a support in the immobilization of *Serratia plymuthica* cells. The cells immobilized in gellan gum and treated with glutaraldehyde, were dried for approximately 36 hours at 10°C and used for the continuous production of isomaltulose. The immobilized cells were packed into bioreactors maintained at 25°C. When dry immobilized cells were used in the continuous process, the conversion of sucrose into isomaltulose was over 69% for about 15 days. This study demonstrated the feasibility of using KELCOGEL[®] F gellan gum as a support in the immobilization of *Serratia plymuthica* cells. This support used combines the simplicity of the immobilization technique with good operational stability and high levels of bioconversion.

Keywords: Isomaltulose, Glucosyltransferase, *Serratia plymuthica*, Free cells, Immobilized cells

CAPÍTULO 1: ISOMALTULOSE: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES, MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE QUE CONVERTE SACAROSE EM ISOMALTULOSE

RESUMO

A sacarose é o principal açúcar utilizado no processamento de alimentos, contudo, o consumo excessivo e não balanceado de alimentos com alto teor de sacarose contribui para a prevalência de doenças como obesidade e cáries dentárias. Nas últimas décadas, tem ocorrido um aumento do interesse pela produção de novos açúcares como alternativa para substituir a sacarose na composição de alimentos e bebidas. A isomaltulose ou palatinose (*O*- α -D-glicopiranosil-1,6-frutofuranosídeo) é um açúcar redutor e isômero estrutural da sacarose, encontrada naturalmente no mel em pequenas quantidades. A isomaltulose é um açúcar pouco cariogênico, com gosto doce e aspecto semelhante à sacarose. A segurança da aplicação de isomaltulose na dieta já foi cuidadosamente estudada, resultando na sua aprovação para uso em alimentos. A isomaltulose é obtida pela conversão enzimática da sacarose. Algumas bactérias como *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia* sp., *Serratia plymuthica* e *Klebsiella* sp. são conhecidas por produzir a enzima α -glicosiltransferase (EC 5.4.99.11) e transformar sacarose em isomaltulose.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a safra de 2006/2007 rendeu 30,7 milhões de toneladas de açúcar (dados obtidos na página oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ²⁵). O preço do açúcar refinado é baixo, devido à ampla oferta no mercado e pouco valor agregado. Sendo uma matéria prima de baixo custo, a sacarose vem despertando grande interesse para síntese de derivados do açúcar (Boscolo ⁵). A isomaltulose (*O*- α -D-glicopiranosil-1,6-frutofuranosídeo) é um açúcar alternativo que pode ser obtido a partir da sacarose por transformação enzimática da ligação glicosil de (1 $\rightarrow$ 2) frutosídeo para (1 $\rightarrow$ 6) frutosídeo (Figura 1.1).

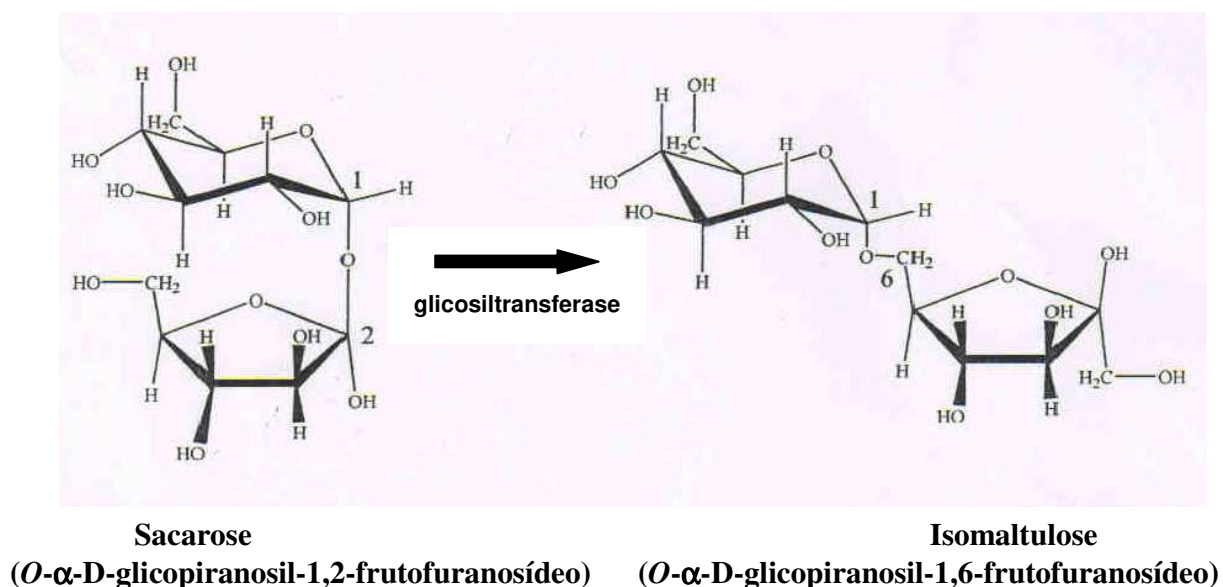


Figura 1.1: Conversão de sacarose em isomaltulose pela enzima glicosiltransferase.

A enzima glicosiltransferase, que converte sacarose em isomaltulose, também é conhecida como sacarose isomerase e isomaltulose sintase. A glicosiltransferase é uma enzima microbiana intracelular e está localizada no espaço periplasmático das células. Não existe glicosiltransferase comercial e os principais microrganismos descritos na literatura

como produtores da enzima são *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia* sp., *Serratia plymuthica* e *Klebsiella* sp.

A isomaltulose, também conhecida como palatinose, é um dissacarídeo redutor que tem propriedades físicas e sensoriais semelhantes as da sacarose, porém apresenta baixo potencial cariogênico, comparado com a sacarose. Essa propriedade tem despertado o interesse para seu uso comercial em alimentos, sendo utilizada no Japão na produção de chocolates, gomas de mascar e biscoitos.

A isomaltulose também é utilizada na produção do açúcar-álcool isomalte (uma mistura equimolar de α -D-glicopiranosil-1,6-manitol e α -D-glicopiranosil-1,6-sorbitol). O isomalte tem sido utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica pela combinação do sabor natural adocicado, conteúdo calórico reduzido e características não cariogênicas. O isomalte é comercializado como Palatinit[®] ou Isomalt[®] e apresenta sabor agradável semelhante ao do algodão doce.

O presente trabalho teve como objetivo revisar os principais aspectos relacionados à isomaltulose, características e aplicações e microrganismos produtores de glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose.

CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DA ISOMALTULOSE

A isomaltulose está naturalmente presente no mel em pequenas quantidades (1%), (Moreira et al. ⁵⁹) e apresenta aproximadamente 50% da doçura da sacarose. A ação adoçante inicial da isomaltulose é percebida mais rapidamente e no final há um sabor residual mais fraco se comparado ao da sacarose. Além disso, a isomaltulose apresenta metade da solubilidade da sacarose, o que facilita a sua separação na etapa de cristalização. A isomaltulose não apresenta aumento de higroscopicidade, nem inversão com a adição de ácido cítrico, como ocorre com a sacarose, indicando que a isomaltulose facilita a manutenção de doçura e sabor em alimentos e bebidas acidificados (Godshall ²¹, Hashimoto et al. ²³, Huang et al. ²⁸). Quando utilizada, em alimentos, como substituto da sacarose na produção de balas e chocolates, não foram observadas diferenças na doçura (Takazoe ⁷⁷).

A isomaltulose é significativamente menos cariogênica do que a sacarose, pois não é fermentada pela maioria das bactérias e leveduras presentes na microbiota oral. A isomaltulose não é fermentada pela bactéria *Streptococcus mutans*, principal bactéria envolvida no aparecimento de cáries dentárias (Linke ⁵⁰). Vários autores (Maki et al. ⁵⁴, Ooshima et al. ⁶⁶, Sasaki et al. ⁷¹, Topitsoglou et al. ⁷⁸, Ziesenitz et al. ⁸⁶) observaram que a produção de ácido e glucana insolúvel por microrganismos dos biofilmes dentários foi menor a partir de isomaltulose do que a partir de sacarose, demonstrando que a isomaltulose pode ser usada como substituto da sacarose por reduzir a incidência de cáries.

Cárie dentária é uma doença multifuncional provocada pela interação de três fatores principais: dentes, bactérias cariogênicas e fermentação de açúcares. Bactérias da placa dentária, principalmente *Streptococcus mutans*, são capazes de metabolizar mono e dissacarídeos transformando-os em ácidos, ocorrendo queda do pH e desmineralização do esmalte dos dentes, levando a formação da cárie. Foi demonstrado que dietas com restrição de sacarose ou uso de substituintes da sacarose não fermentescíveis reduziram a incidência

das cáries. Isômeros da sacarose, como isomaltulose e trealulose, não são fermentados por *Streptococcus* sp. Portanto, o interesse na produção de isômeros da sacarose, isomaltulose $\alpha(1\rightarrow6)$, trealulose $\alpha(1\rightarrow1)$, turanose $\alpha(1\rightarrow3)$, maltulose $\alpha(1\rightarrow4)$ e leucrose $\alpha(1\rightarrow5)$ tem aumentado devido às similaridades sensoriais e menor potencial cariogênico (Hamada²², Moynihan⁶⁰).

A isomaltulose é hidrolisada pela isomaltase do complexo sacarase-isomaltase localizado no intestino delgado e absorvida como glicose e frutose. A isomaltulose possui o mesmo valor calórico da sacarose (4 Kcal/g), porém foi verificado que a digestibilidade e a absorção ocorrem de forma mais lenta. Segundo Kashimura et al.^{33, 34}, a digestibilidade da isomaltulose corresponde a 1/5 da sacarose. A concentração plasmática de insulina após ingestão de isomaltulose foi menor quando comparada com sacarose, oferecendo a possibilidade de aplicação da isomaltulose em produtos esportivos, dietéticos e como excipiente de comprimidos. Como resultado da digestão e absorção mais lentas, doses altas de isomaltulose (acima de 50g) foram bem toleradas, sem sinais de desconforto intestinal. Este dissacarídeo, em estudos feitos com animais, não mostrou efeitos teratogênico, mutagênico ou qualquer tipo de toxicidade, portanto sendo considerado seguro para a utilização em alimentos (Jonker et al.³¹, Kawai et al.³⁸, Lina et al.^{48, 49}).

Em 2006, a isomaltulose foi reconhecida como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (United States Food and Drug Administration). O FDA revisou os estudos sobre a isomaltulose comprovando que o produto é completamente hidrolisado e absorvido no intestino delgado como glicose e frutose. Os estudos toxicológicos e metabólicos, assim como os estudos de tolerância gastrointestinal, foram conclusivos em relação à segurança no uso da isomaltulose em alimentos, sem possíveis efeitos prejudiciais à saúde. A isomaltulose tem sido utilizada como ingrediente de alimentos no Japão desde 1985 e recentemente seu uso foi autorizado como um novo açúcar na Europa. Em Maio de 2008, o FDA reconheceu a isomaltulose como um produto benéfico à saúde, por ser um açúcar de baixo potencial cariogênico que ajuda a evitar cáries dentárias (dados obtidos na página oficial do United States Food and Drug Administration^{26, 27}).

A isomaltulose pode ser empregada na maioria dos alimentos industriais 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 e pasta de dente (Irwin et al.³⁰). A isomaltulose é produzida pela Mitsui Sugar Company (Japão), e Tate & Lyle (Inglaterra), sendo comercializada como Palatinose® e Lylose®, respectivamente. Em 1998 a produção mundial de isomaltulose foi estimada em 35.000 toneladas por ano e seu preço era de aproximadamente US\$ 2/Kg. Em 2001 essa produção aumentou para 50.000 toneladas por ano. Em 2004, a produção mundial foi estimada em 60.000 toneladas por ano (Lichtenhaler^{46, 47}).

Tratando-se a isomaltulose com pH baixo e aquecimento, obtêm-se oligômeros baseados em isomaltulose, que consistem de uma mistura de isomaltulose (50,5%) e seus condensados: tetrassacarídeos (28,4%), hexassacarídeos (12,9%), octassacarídeos (6,2%) e monossacarídeos (2%). Esses produtos podem ser utilizados como agentes pré-bióticos que estimulam seletivamente a proliferação e atividade de certas espécies da microbiota intestinal, as bifidobactérias e os lactobacilos, que proporcionam benefícios para a saúde. Tais oligossacarídeos não são completamente digeridos no intestino delgado e, assim, conseguem atingir o intestino grosso onde funcionam como substrato de fermentação para as bifidobactérias ali presentes. Essa microbiota desejável protege o hospedeiro, antagonizando o crescimento de microrganismos patogênicos, impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, biodisponibilizando minerais como o cálcio e o ferro e auxiliando na digestão (Cummings et al.¹³, Kashimura et al.^{33, 34}, Loo et al.⁵¹).

Recentes avanços na área de enzimologia têm possibilitado a produção em escala industrial de oligossacarídeos funcionais como fruto, malto, galacto, xilo e isomalto oligossacarídeos, além de isomaltulose. Vários tipos de oligossacarídeos são encontrados naturalmente em alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Em 1991, a Legislação Japonesa para Alimentos com uso Específico na Saúde (FOSHU), aprovou o uso de 223 itens como componentes funcionais, dos quais mais de 50% eram oligossacarídeos. A

adição de oligossacarídeos funcionais aumenta o valor agregado de muitos alimentos. Assim, com aumento da preocupação dos consumidores com sua saúde e o reconhecimento dos benefícios dos alimentos funcionais, o futuro de produtos contendo oligossacarídeos é promissor. Atualmente, o mercado desses oligossacarídeos tem a expectativa de superar o rendimento de 20 bilhões de ienes (moeda japonesa) por ano (Nakakumi ⁶³).

A isomaltulose é utilizada na produção do isomalte (uma mistura equimolar de α -D-glicopiranosil-1,6-manitol e α -D-glicopiranosil-1,6-sorbitol). Esse açúcar-álcool é obtido por hidrogenação da isomaltulose em solução aquosa neutra (Figura 1.2).

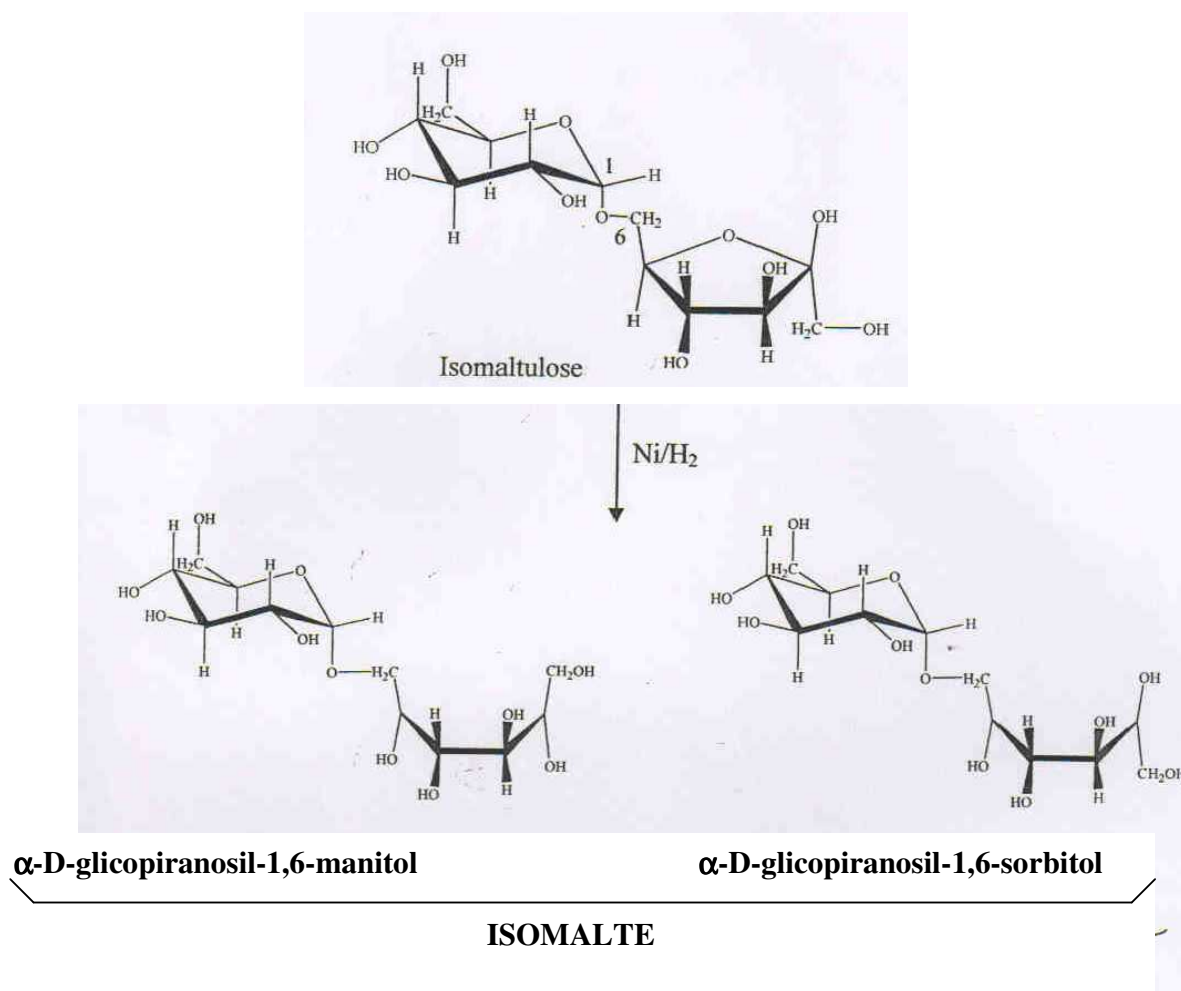


Figura 1.2: Conversão de isomaltulose em isomalte por hidrogenação.

Em relação a outros polióis, o isomalte tem a vantagem de ser muito menos higroscópico e possuir melhores propriedades sensoriais. A maioria dos polióis pode ser consumida por diabéticos sem aumento significativo da glicemia, por serem apenas parcialmente hidrolisados e absorvidos no intestino delgado. O isomalte tem sido utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica pela combinação do sabor doce, conteúdo calórico reduzido e características não cariogênicas (Delgeman et al. ¹⁴, Duflot et al. ¹⁵, Khan ³⁹, Ndindayno et al. ⁶⁴). A produção de isomalte foi estimada em aproximadamente metade da produção de isomaltulose, ou seja, 25.000 a 30.000 toneladas por ano, com preço de US\$ 3/Kg.

O isomalte possui metade do poder adoçante da sacarose e sabor agradável similar. Também não deixa sabor residual e tem sido utilizado como açúcar dietético em produtos de confeitaria, gomas de mascar, bebidas carbonatadas e sobremesas. O isomalte reforça a transferência de sabor aos alimentos e possui efeito sinérgico quando combinado com adoçantes de doçura intensa como aspartame, ciclamato e sacarina, sendo que a adição do isomalte tende a mascarar o sabor amargo e metálico residual desses adoçantes. O mesmo sinergismo é obtido quando é combinado com outros açúcares-álcoois como xilitol, manitol e sorbitol. Além disso, o isomalte não possui efeito refrescante como os outros açúcares-álcoois (Irwin et al. ²⁹, Snodin et al. ⁷⁵)

O aumento do consumo de alimentos doces contendo sacarose e glicose tem levado a ingestão excessiva de açúcar, gordura e energia, implicando no aumento da obesidade e doenças metabólicas associadas à obesidade. O consumo de alimentos doces com menor quantidade de açúcares ou livre de açúcares apresentam-se como alternativa para a redução de calorias. Os polióis como isomalte, sorbitol, manitol, xilitol, maltitol e lactitol têm sido aplicados na produção de doces, chocolates, gomas de mascar e balas em substituição a sacarose, sendo o valor calórico dos polióis de 2,4 Kcal/g e o da sacarose de 4 Kcal/g (Zumbé et al. ⁸⁷).

MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE E CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA

Os principais microrganismos produtores da enzima glicosiltransferase (também conhecida como sacarose isomerase e isomaltulose sintase), que converte sacarose em isomaltulose, são: *Protaminobacter rubrum* (Kakinuma et al. ³², Sarkki et al. ⁷⁰, Tsuyuki et al. ⁷⁹), *Erwinia carotovora* (Lund et al. ⁵²), *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al. ^{8, 9, 10}), *Erwinia* sp. (Kawaguti ^{35, 36, 37}, Moraes ^{57, 58}), *Serratia plymuthica* (Krastanov et al. ⁴¹, McAllister et al. ⁵⁵, Véronèse et al. ⁸¹), *Klebsiella planticola* (Huang et al. ²⁸) e *Klebsiella* sp. (Orsi ⁶⁷, Park et al. ⁶⁹).

Ahn et al. ¹ obtiveram uma linhagem mutante denominada *Erwinia rhapontici* BN 68089, com maior produtividade de glicosiltransferase, a partir da linhagem *Erwinia rhapontici* ATCC 29283. Li et al. ⁴⁵ isolaram do solo e identificaram por seqüenciamento genético uma nova espécie do gênero *Klebsiella*, denominada *Klebsiella singaporensis* sp. nov., que converte sacarose em isomaltulose, sem produzir glicose como subproduto, o que acontece com a maioria dos outros microrganismos produtores de glicosiltransferase. Wu et al. ⁸³ isolaram a bactéria produtora de glicosiltransferase *Pantoea dispersa* UQ68J. Os genes da enzima foram clonados e expressos em *Escherichia coli*, que apresentou eficiente produção de isomaltulose a partir de sacarose. Cho et al. ¹¹ isolaram de comida tradicional coreana um microrganismo produtor de glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose, que por seqüenciamento genético foi identificado como *Enterobacter* sp. FMB1.

A maioria das bactérias produtoras de glicosiltransferase, além de converter sacarose para isomaltulose, também produz trealulose (O- α -D-glicopiranosil-1,1-D-frutose) em menor quantidade e traços de glicose e frutose. As linhagens *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 (Sarkki et al. ⁷⁰), *Erwinia rhapontici* NCPPB 1579 (Cheetham ⁹), *Serratia plymuthica* NCIB 8285 (Fujii et al. ²⁰), *Klebsiella planticola* CCRC 19112 (Huang et al. ²⁸),

produzem principalmente isomaltulose (75-85%), trealulose (14-16%) e pequena quantidade de glicose (2-6%) e frutose (2-3%). No entanto as bactérias *Pseudomonas mesoacidophila* MX 45 (Miyata et al.⁵⁶) e *Agrobacterium radiobacter* MX 232 (Nagai-Miyata et al.⁶²), produzem mais trealulose (90%) do que isomaltulose.

De acordo com Cheetham et al.¹⁰, a significativa adaptação de vários microrganismos para a produção de isomaltulose não é clara, podendo ser um método irreversível de seqüestrar energia e carbono em uma forma menos viável, para a planta hospedeira e para outros microrganismos que poderiam concorrer pela sacarose. A isomaltulose também é um potente inibidor da enzima invertase de leveduras, o que constitui outra estratégia para excluir competidores no uso da sacarose (Börnke⁴).

As bactérias produtoras de glicosiltransferase, geralmente, são de crescimento rápido, em torno de 6 a 24 horas e em faixas de temperatura ótima que variam de 24°C a 30°C (Egerer¹⁷, Heikkila et al.²⁴, Huang et al.²⁸, Kawaguti et al.³⁵, McAllister et al.⁵⁵, Moraes et al.⁵⁷, Orsi⁶⁷, Tsuyki et al.⁷⁹, Uekane⁸⁰, Véronèse et al.⁸¹). Egerer¹⁷ observou que a produção máxima da enzima ocorre na fase exponencial de crescimento bacteriano. O autor sugeriu que durante o crescimento celular ocorre a formação periplasmática da enzima e que nas fases finais de crescimento e envelhecimento celular ocorrem mudanças estruturais nas proteínas, o que explicaria a queda na atividade de glicosiltransferase.

A glicosiltransferase microbiana é uma enzima intracelular e está localizada no espaço periplasmático das células (Huang et al.²⁸). Não existe glicosiltransferase comercial e poucos trabalhos relatam o uso de enzima extraída para produção de isomaltulose. Nos trabalhos com uso de glicosiltransferase microbiana purificada, a enzima apresentou atividade ótima na faixa de pH de 5,0 a 6,5 e temperatura de 30°C a 35°C (McAllister et al.⁵⁵, Park et al.⁶⁹, Véronèse et al.⁸¹).

Os trabalhos de Cheetham et al.^{9, 10} foram feitos visando explicar o mecanismo bioquímico da conversão de sacarose em isomaltulose. De acordo com os autores, a glicosiltransferase foi descrita como sacarose específica, com um mecanismo de transglicosilação intracelular em que ambos resíduos de glicose e frutose estavam associados à enzima. A reação, não sendo seletiva, formou simultaneamente isomaltulose e trealulose. No início da reação, a razão isomaltulose/trealulose foi constante, porém quando toda a sacarose foi consumida, houve queda na concentração de isomaltulose e lento aumento na concentração de trealulose. Tais resultados sugeriram que a conversão de isomaltulose seria reversível e a da trealulose irreversível.

O seqüenciamento genético da glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. LX3 (Zhang et al.^{84, 85}) auxiliou no entendimento do mecanismo molecular da isomerização da sacarose em isomaltulose. As seqüências de bases do gene que codifica a glicosiltransferase e sua estrutura secundária sugeriram que esta enzima pertence à família α -amilase e que provavelmente adota o mesmo mecanismo molecular de reação em duas fases, com hidrólise e formação de ligação glicosídica. O mecanismo da reação ocorre por catálise ácida, onde a ligação glicosídica é protonada por um doador de prótons e o carbono anomérico sofre ataque nucleofílico, levando a formação do complexo intermediário enzima-substrato. Nessa fase da reação, o grupo glicosil pode ser transferido para uma molécula de água no caso de hidrólise e para o grupo frutose no caso da síntese dos isômeros da sacarose. Na fase seguinte de isomerização, a estrutura da frutose determina o balanço entre os dois isômeros da sacarose: isomaltulose e trealulose.

CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE

A conversão de sacarose para isomaltulose pode ser realizada por meio dos sistemas enzima livre, células livres e células imobilizadas. Poucos trabalhos descrevem a conversão da sacarose em isomaltulose com enzimas livres (McAllister et al. ⁵⁵, Park et al. ⁶⁹, Véronèse et al. ⁸¹) ou com células livres (Heikkila ²⁴, Kawaguti et al. ³⁵, Schiweck et al. ⁷²). A maioria dos trabalhos relata a produção de isomaltulose com o uso de células imobilizadas (Anh et al. ¹, Bucke et al. ⁶, Cheetham et al. ^{8, 10}, Hashimoto et al. ²³, Kawaguti ^{35, 36, 37}, Krastanov et al. ^{41, 42, 43}, Lantero ⁴⁴, Moraes ^{57, 58}, Sarkki et al. ⁷⁰, Shimizu et al. ⁷⁴, Tsuyuki ⁷⁹).

McAllister et al. ⁵⁵ descreveram a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando a bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0, a 30°C. A eficiência da conversão da solução de sacarose 40% (p/v), após 3 horas de reação, foi de 87%. Véronèse et al. ⁷⁶ também estudaram a produção de isomaltulose utilizando glicosiltransferase purificada de *Serratia plymuthica* ATCC 15928. Após 5 horas de reação a 30°C, ocorreu conversão total da sacarose (292 mM) em 72,6% de isomaltulose, 6,6% de trealulose, 10,1% de frutose e 10,1% de glicose.

Heikkila et al. ²⁴ estudaram a produção de isomaltulose utilizando células livres da bactéria *Protaminobacter rubrum*. Após a fermentação, o meio (1100 litros) contendo bactérias foi adicionado a uma solução contendo 4800 Kg de melaço de beterraba (60% de sacarose em base seca foi diluída para concentração de 370 g/L de sólidos totais em base seca). Após 25 horas de reação a 30°C, a sacarose do melaço de beterraba foi convertida em 82,0% de isomaltulose, 8,8% de trealulose, 3,3% de frutose, 2,0% de glicose e 3,9% de oligossacarídeos.

Kawaguti ³⁵ estudou a conversão de sacarose em isomaltulose com uso de células livres de *Erwinia* sp. D12, em escala piloto. Após a fermentação, o meio (120 litros) foi

centrifugado para separação da massa celular. Foi obtido cerca de 2,6 kg de massa celular úmida. A produção de isomaltulose foi feita na temperatura de 35°C, utilizando-se concentração de massa celular úmida de 10% (p/v) e concentração de substrato sacarose de 35% (p/v). Foi obtido cerca de 114 litros de xarope, sendo toda a sacarose convertida em 63,4% de isomaltulose, 34,33% de outro açúcar (provavelmente trealulose) e 2,3% de glicose e frutose.

O aprisionamento físico de microrganismos dentro de matriz polimérica é uma das técnicas mais usadas para imobilização celular. O material resultante deve ter porosidade suficiente para transporte do substrato para dentro e do produto para fora da matriz, sem deixar as células escaparem (Scott ⁷³). Entre muitas vantagens, o uso de células imobilizadas pode reduzir o custo do processo, devido à eliminação das etapas de extração e purificação das enzimas, da facilidade para separação das células do produto final e do uso contínuo de biocatalisador (Akin ²).

As células imobilizadas em matriz ficam protegidas das condições ambientais desfavoráveis como pH, temperatura, solventes orgânicos e compostos tóxicos. Processos contínuos podem ser operados com alta densidade celular, sem a perda de células microbianas mesmo em altos valores de diluição, o que resulta em reator de alta produtividade (Park et al. ⁶⁸). A concentração elevada de biomassa dentro das partículas de células imobilizadas pode aumentar as taxas de reação e também permite a redução do volume e versatilidade na escolha dos reatores (Luong et al. ⁵³).

Entre os materiais utilizados para imobilização celular, destacam-se os polissacarídeos alginato e kappa-carragena. Materiais como ágar, agarose, colágeno, gelatina, quitosana e celulose também são utilizados. Materiais sintéticos como poliacrilamida podem ser utilizados, embora em altas concentrações sejam tóxicos para as células imobilizadas (Ertesvag ¹⁸, Kourkoutas ⁴⁰). Cheetham et al. ⁸ testaram várias técnicas de imobilização celular: alginato de cálcio, DEAE-celulose, poliacrilamida, κ-carragena e

ágar. Todas as técnicas foram significativamente menos estáveis do que a do alginato, que se mostrou um método simples e barato.

O alginato é o suporte mais utilizado para imobilização de células microbianas íntegras (Vorlop et al. ⁸²). Alginato é um polissacarídeo extraído de algas marinhas, de estrutura linear composto por ácido manurônico e ácido gulurônico. As unidades de ácido urônico são arranjadas em blocos ao longo da cadeia, com seqüências de ácidos gulurônicos (blocos G), ácidos manurônicos (blocos M) e ácidos manurônicos e gulurônicos alternados (blocos MG) (Chan et al. ⁷, Ertesvag ¹⁸). Esse polímero tem a capacidade de formar gel em baixas concentrações e é termoestável podendo ser esterilizado. O alginato não é tóxico e tem uso aceito como aditivo em alimentos. É utilizado como gelificante, estabilizante e espessante, com ampla aplicação industrial. Todos esses fatores contribuem para a popularidade do uso de alginato na imobilização celular (Coughlan et al. ¹²).

O processo de gelificação do alginato é rápido e simples e as células permanecem viáveis por longo tempo porque o processo pode ser efetuado em condições muito brandas. As esferas de alginato são facilmente produzidas em larga escala, sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Geralmente as células são homogeneizadas com a solução de alginato e depois gotejadas em solução contendo cátions multivalentes tais como cálcio, bário, estrôncio ou alumínio. Por gelatinização, as esferas são instantaneamente formadas, retraindo as células dentro da estrutura tridimensional do gel. O gel é formado pela ligação cruzada dos íons com os resíduos de ácido gulurônico adjacentes ao longo da cadeia do alginato. As esferas são facilmente dissolvidas em condições brandas e as células regeneradas. As poucas limitações do método consistem no uso de substâncias quelantes de cátions, pois provocariam desestabilização do gel. Portanto tampões contendo citrato ou fosfato, que possuem grande afinidade por íons, são de uso limitado (Akin ², Ertesvag ¹⁸, Scott ⁷³).

Alguns aspectos durante a imobilização celular devem ser observados como a resistência mecânica do gel que pode diminuir devido à baixa concentração de alginato ou alta concentração celular. A resistência mecânica da matriz é um fator importante para determinar o tempo de vida operacional do sistema com células imobilizadas. Um sistema mecanicamente estável deve resistir à pressão exercida pelas células em crescimento e formação de gás intrapartículas e também as condições hidrodinâmicas severas como a compactação em leitos empacotados. Também podem ocorrer restrições e limitações difusionais se a concentração de alginato for muito alta (Derwakos et al.¹⁶). O estudo dos parâmetros do processo: método de imobilização, configuração do reator, composição do meio (substratos, precursores ou nutrientes adicionais), temperatura, aeração e pH contribuem para a obtenção de um sistema de células imobilizadas com alta produtividade e estabilidade (Freeman et al.¹⁹).

No trabalho de Ogbonna et al.⁶⁵, foi estudada a influência de vários fatores no processo de imobilização de células de *Sacharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio como: concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, tempo de gelificação e concentração inicial de células. Os autores verificaram a influência da concentração de alginato (0,5% a 4%) na resistência mecânica das esferas de células imobilizadas, observando o número de esferas rompidas após o processo fermentativo. Verificou-se que esferas obtidas com 2% de alginato apresentaram menos rompimento, não ocorrendo diferenças significativas entre 1% e 2% de alginato. As esferas preparadas com alginato 0,5% apresentaram mais rompimentos. Segundo os autores, concentrações elevadas de alginato (4%), causaram problemas de viscosidade e resultaram em esferas com difusão deficiente, além de dificultarem a homogeneização com a suspensão celular, resultando em esferas com diferentes concentrações celulares. No estudo da influência da concentração de cloreto de cálcio (0,05 M a 0,3 M) na resistência mecânica das esferas, também foi determinado o número de esferas rompidas após o processo fermentativo. Notou-se que a quantidade de cálcio necessária para gelatinização das esferas é muito pequena e que a concentração de cloreto de cálcio tem pouca influência nas características de difusão das esferas. Também foi estudada a possibilidade da liberação de cálcio

ocasionar o rompimento das esferas e os autores concluíram que o crescimento das células no interior das esferas e a formação de gás carbônico contribuem muito mais para o rompimento das esferas do que a liberação de cálcio. Os autores também estudaram a influência do tempo de incubação das esferas na solução de cloreto de cálcio. Observou-se que a estabilidade do gel foi maior nas esferas que tiveram maior tempo de gelificação, não ocorrendo diferenças após 22 horas de incubação. No estudo da influência da concentração inicial de células na resistência mecânica das esferas, observou-se que concentrações iniciais de células muito altas resultaram em alta porcentagem de esferas rompidas. Os autores concluíram que provavelmente com o grande número de células acumuladas no centro das esferas, ocorreu maior formação de gás carbônico, prejudicando a difusão do gás através delas, levando ao aumento da pressão interna e conseqüente rompimento das esferas.

Bucke et al.⁶ estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose com células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas em alginato de cálcio. Os autores verificaram a influência da concentração de sacarose (12,5% a 60%) na atividade e estabilidade das células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas em concentração celular de 20% (p/v) em alginato de cálcio 5% (p/v). As células imobilizadas foram empacotadas em colunas (30 x 0,5 cm) e mantidas a 30°C. Nessas condições experimentais os autores verificaram que altas concentrações de sacarose (ao redor de 40%) diminuíram a atividade da célula imobilizada, devido ao efeito inibitório, mas em compensação aumentaram a estabilidade da mesma, o que resultou em aumento da produtividade de isomaltulose. Além disso, altas concentrações de sacarose tendem a inibir a divisão celular, prevenir a contaminação microbiana e tornar mais fácil a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado.

Moraes^{57, 58} avaliou o efeito da temperatura (25°C a 35°C) e da concentração de sacarose (12,5% a 60%) no rendimento de isomaltulose, utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio. As células foram imobilizadas em alginato de

cálcio Sigma[®] 1% (p/v), na concentração celular de 20% (p/v) e empacotadas em colunas (20 x 2,5 cm). A variação de temperatura não teve influência significativa no processo de conversão. No entanto concentrações ao redor de 25% a 35% de sacarose aumentaram a produtividade de isomaltulose e concentrações em excesso de sacarose, ao redor de 40%, afetaram a atividade da célula imobilizada, diminuindo muito a conversão de sacarose em isomaltulose. Após 24 horas, foi obtido rendimento em torno de 50% de isomaltulose, utilizando-se soluções de sacarose entre 20% a 30 % (p/v) a 35°C.

Ahn et al.¹ utilizaram células da linhagem mutante *Erwinia rhapontici* BN 68089 imobilizadas em alginato de cálcio para converter sacarose em isomaltulose. Foram testadas as temperaturas de 27°C, 30°C e 33°C. Para a imobilização das células, uma suspensão celular 40% (p/v) foi misturada com igual volume de solução de alginato 5% (p/v) e gotejada em solução de cloreto de cálcio 2% (p/v). Os grânulos foram empacotados em colunas e estas foram alimentadas com solução de sacarose 55% (p/v) pH 7,0. Nas temperaturas de 27°C, 30°C e 33°C os rendimentos de isomaltulose iniciais (10-20 dias) foram respectivamente, 79%, 89% e 85% e diminuíram para 67%, 79% e 57%, respectivamente, após 60 dias.

Orsi⁶⁷ estudou a influência da concentração de alginato na imobilização de células de *Klebsiella* sp. e na conversão de sacarose em isomaltulose. As células foram imobilizadas em concentração celular de 20% (p/v) em alginato de cálcio Synth[®] (2% a 4%, p/v). As células imobilizadas foram empacotadas em colunas (15 x 3 cm) e alimentadas com solução de sacarose 35% (p/v), a 30°C. Foi obtido melhor resultado de conversão de sacarose em isomaltulose (62,1%) com uso de solução 2% de alginato de cálcio Synth[®], após 24 horas. Utilizando-se células imobilizadas com solução 3% e 4% de alginato, a conversão de sacarose em isomaltulose (após 24 horas) foi menor, sendo obtido respectivamente, 51,1% e 47,4% de isomaltulose.

Mundra et al.⁶¹ avaliaram a influência da concentração de alginato, concentração de massa celular e diâmetro dos grânulos na produção de isomaltulose por células de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 imobilizadas em alginato de cálcio. Os valores ótimos das variáveis testadas foram: concentração de alginato 5% (p/v), concentração de massa celular 15 g/L e diâmetro dos grânulos de células imobilizadas de 2,25 mm, com produção de isomaltulose de 140 mg/mL, após 1 hora de incubação em solução de sacarose 30% (p/v), a 30°C.

Vários autores estudaram o uso de aditivos como glutaraldeído e polietilenoimina para aumentar a estabilidade das células imobilizadas. Supõe-se que a polietilenoimina aumenta a resistência mecânica das células imobilizadas. Já o glutaraldeído pode ser utilizado como agente de reticulação ou ligação do suporte com as células imobilizadas. (Kawaguti³⁵, Krastanov^{42, 43}, Sarkki et al.⁷⁰, Shimizu et al.⁷⁴, Takazoe⁷⁶, Tsuyuki⁷⁹). Alguns autores (Kawaguti³⁵, Shimizu et al.⁷⁴, Tsuyuki⁷⁹) verificaram que a utilização de aditivos diminuiu a atividade das células imobilizadas, mas em compensação aumentou a estabilidade das mesmas. Assim, as células imobilizadas tratadas com aditivos converteram sacarose em isomaltulose por período muito maior do que as células imobilizadas não tratadas com aditivos.

Shimizu et al.⁷⁴ testaram o efeito da concentração de glutaraldeído na estabilidade de células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio. As células foram imobilizadas com concentração celular de 40% (p/v) em alginato de cálcio 2% (p/v). Os grânulos foram deixados por 30 minutos em soluções aquosas de glutaraldeído (0-0,5%). Então, 30 g de células imobilizadas foram misturadas com 100 g de solução sacarose 33% (p/v) e incubadas por 20-23 horas, a 25°C. As células foram reutilizadas por 8 vezes seguidas. Verificou-se que as células imobilizadas sem glutaraldeído apresentaram alta conversão inicial de sacarose em isomaltulose (62,9% na primeira vez) e rápida queda nas reutilizações seguintes, sendo que na terceira vez não houve mais formação de isomaltulose. No entanto, as células imobilizadas tratadas com glutaraldeído 0,1% apresentaram diminuição da conversão de sacarose em isomaltulose (31,0% na primeira

vez), porém a conversão se manteve constante nas reutilizações seguintes (média de 30,3% de isomaltulose).

Kawaguti ³⁵ analisou a influência dos aditivos polietilenoimina (0-0,75%) e glutaraldeído (0-0,13%) na estabilidade de células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, através de Metodologia de Superfície de Resposta. Verificou-se que a polietilenoimina não apresentou efeito significativo na estabilidade das células imobilizadas e que a melhor concentração de glutaraldeído foi de 0,06%. Para o estudo da produção de isomaltulose pelas células imobilizadas tratadas com glutaraldeído, as células foram imobilizadas com concentração celular de 40% (p/v) em alginato de cálcio 2% (p/v). Os grânulos foram deixados por 20 minutos em solução aquosa de glutaraldeído (0,06%). Em seguida, os grânulos foram empacotados em colunas (15 x 3 cm) a 30°C e alimentados com solução de sacarose 35% (p/v). Uma coluna contendo grânulos não tratados com glutaraldeído foi testada como controle. A conversão de sacarose em isomaltulose foi acompanhada por 270 horas. A coluna contendo células imobilizadas tratadas com glutaraldeído mostrou alta estabilidade e foram obtidas taxas de isomaltulose acima de 50% por 270 horas. No entanto a coluna contendo células imobilizadas sem tratamento com glutaraldeído, apresentou rápido declínio da conversão ao longo do tempo, sendo que em 270 horas não houve nenhuma formação de isomaltulose.

Outros suportes também têm sido utilizados para imobilização celular. Sarkki et al.⁷⁰ estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose com células de *Protaminobacter rubrum* imobilizadas em dietilaminoetil celulose (DEAE-celulose) modificada, um material poroso de troca iônica fracamente básico. Para conversão de sacarose em isomaltulose, uma coluna foi empacotada com a DEAE-celulose modificada e as células foram imobilizadas na superfície porosa da matriz. A coluna foi mantida a 30°C e solução de sacarose 25% (p/v) foi bombeada continuamente, em fluxos lentos. A coluna foi mantida em operação por 2 semanas, sendo a sacarose convertida em 79% de isomaltulose, 0,9% de trealulose e 1,3% de glicose e frutose.

Krastanov et al.⁴³ utilizaram quitosana como suporte para imobilização de células de *Serratia plymuthica*. Para a gelificação, a massa celular úmida foi misturada com solução aquosa de acetato de quitosana 2% e 1,5 ml de solução de glutaraldeído 25%. A mistura gelificada foi fragmentada em pequenas partículas. Para aumentar a estabilidade e a resistência mecânica do gel, as partículas foram ativadas com meio de cultivo fresco e depois secas em temperatura ambiente por 36 horas. As partículas foram empacotadas em colunas (35,5 x 1,2 cm) e avaliou-se o efeito da concentração de sacarose (30% a 70%), do tempo de residência do substrato na coluna e da temperatura (30°C a 60°C) no rendimento de isomaltulose. A conversão de sacarose em isomaltulose foi favorecida com uso de solução de sacarose entre 40% e 60%, sendo a maior porcentagem de isomaltulose (94%) obtida com o uso de solução de sacarose 40%. O aumento da concentração de sacarose tornou necessário maior tempo de residência do substrato na coluna, para se obter a máxima taxa de conversão da sacarose. Assim, com uso de solução de sacarose entre 30% e 50% foi necessário tempo de residência na coluna de 1,7-3,0 horas para se obter 98% a 100% de conversão da sacarose. Já com o uso de solução de sacarose entre 60% e 70% foi necessário tempo de residência na coluna de 4-5 horas para se obter a mesma taxa de conversão. Em relação à temperatura, independente da concentração de substrato, a maior produção de isomaltulose ocorreu entre 40°C e 50°C. A estabilidade operacional da coluna foi avaliada durante 180 dias, com uso de solução de sacarose 50%, temperatura de 40°C e tempo de residência do substrato na coluna de 1,7 horas. Nessas condições foram obtidas conversões de isomaltulose acima de 50% por 155 dias.

Krastanov et al.⁴¹ realizaram um estudo da conversão de sacarose em isomaltulose com células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em reator de membrana composto por fibras de polissulfona. Para imobilização celular, o reator foi inoculado com suspensão celular de 250 cm³ (a massa celular da bactéria foi suspensa em tampão fosfato 50 mM na concentração de $1,5 \cdot 10^{15}$ UFC/cm³). O reator foi mantido a 20°C e solução de sacarose 40% (p/v) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 foi bombeada continuamente, no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 1,3 cm³/min. Para se obter conversão completa de sacarose em isomaltulose com fluxo de 1,3 cm³/min, diferentes concentrações de solução

de sacarose (40%, 50% e 60%) foram recirculadas pelo reator de membrana. A conversão de sacarose em isomaltulose alcançou valores superiores a 90% no período de 36-48 horas de recirculação de todas as diferentes concentrações de substrato testadas, sendo a melhor produtividade de isomaltulose (18,1 g/m²) obtida na recirculação de solução de sacarose 60%.

Para explorar o potencial das plantas transgênicas como alternativa para produção de isomaltulose, Börnke et al.³, introduziram o gene *pal* que codifica a sacarose isomerase de *Erwinia rhapontici* em batatas. O crescimento das batatas transgênicas foi igual ao das espécies selvagens, pois o gene *pal* foi expresso somente nos tubérculos, o que levou a conversão significativa de sacarose em isomaltulose, sem afetar o desenvolvimento das plantas. Esses resultados foram melhores que os obtidos anteriormente, com a expressão dos genes *pal* em toda a planta do tabaco, ocorrendo sérios retardos no crescimento, em consequência do acúmulo de isomaltulose e falta de sacarose como fonte de energia.

CONCLUSÕES

A isomaltulose é um dissacarídeo redutor que tem propriedades físicas e sensoriais semelhantes as da sacarose, porém apresenta baixo potencial cariogênico, comparado com a sacarose. Esse açúcar alternativo pode ser empregado na maioria dos alimentos industriais como substituinte da sacarose sem qualquer alteração nos tradicionais processos de manufatura, sendo aplicado na confecção de produtos de panificação, caramelos, frutas enlatadas, gomas de mascar e pasta de dente. A isomaltulose é obtida a partir da sacarose por transformação enzimática da ligação glicosil de (1→2) frutossídeo para (1→6) frutossídeo. A conversão enzimática de sacarose em isomaltulose tem sido realizada utilizando-se células livres e células imobilizadas. A aplicação de células imobilizadas oferece muitas vantagens, como a facilidade de separar as células do produto para reutilização, operação contínua por longos períodos e aumento na produtividade do reator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 5, p. 319-367, 1987.
3. BÖRNKE, F.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Potato tubers as bioreactors for palatinose production. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 119-124, 2002.
4. BÖRNKE, F.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2425-2430, 2001
5. BOSCOLO, M. Sucroquímica: síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos da sacarose. **Química Nova**, v. 26, p. 1-20, 2003.
6. BUCKE, C.; CHEETHAM, P. S. J. **Production of isomaltulose. US Patent 4.670.387**, 1982.
7. CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; SENG, P. W. S. Production of alginates microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 259-262, 2002.
8. CHEETHAM, P. S. J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471-481, 1985.
9. CHEETHAM, P. S. J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. **Biochemistry Journal**, v. 220, p. 213-220, 1984.
10. CHEETHAN, P. S. J.; IMBER, C. E.; ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, v. 299, p. 628-631, 1982.

11. CHO, M. H.; PARK, S. E.; LIM, J. K.; KIM, J. S.; KWON, D. Y.; PARK, C. S. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp FMB1, an isomaltulose producing microorganism isolated from traditional Korean food. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 458-458, 2007.
12. COUGHLAN, M. P.; KIERSTAN, P. J. Preparation and applications of immobilized microorganisms: a survey of recent reports. **Journal of Microbiological Methods**, v. 8, p. 51-90, 1988.
13. CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal Clinical**, v. 73, p. 415S-420S, 2001.
14. DEGELMANN, H.; KOWALCZYK, J.; KUNZ, M.; SCHUTTNHELM, M. **Process for the hydrogenation of sugars. US Patent 6.103.894**, 2000.
15. DUFLLOT, P.; FOUACHE, C. **Method for producing palatinitol. US Patent 6.204.378**, 2001.
16. DERWAKOS, G.; WEBB, C. On the merits of viable cell immobilization. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 559-612, 1991.
17. EREGER, P. Downstream processing of sucrose 6-glucosyltransferase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 36, p. 65-77, 1994.
18. ERTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.
19. FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.
20. FUJII, S.; KISHIIHARA, S.; KOMOTO, M.; SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation of *Serratia plymuthica*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 30, p. 339-344, 1983.

21. GODSHALL, M. A. How carbohydrates influence food flavors. **Food Technology**, v. 51, p. 63-66, 1997.
22. HAMADA, S. Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p. 1293-1300, 2002.
23. HASHIMOTO, H.; YAMADA, K.; YOSHIMURA, J. Glucosylation of methyl β -D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 849-854, 1987
24. 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
25. http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/PRODUCAO/PROD_ACUCAR_BRASIL.PDF (acessado no dia 12 de Agosto de 2008).
26. <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html> (acessado no dia 12 de Agosto de 2008).
27. <http://www.nutraingredients-usa.com/Regulation/FDA-gives-isomaltulose-health-claim-green-light> (acessado no dia 12 de Agosto de 2008).
28. HUANG, J. H.; HSU, L. H.; SU, Y. C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 22-27, 1998.
29. IRWIN, W. E.; STRATER, P. J. Isomaltulose Editors: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative Sweeteners**, p. 299-307, 1991.
30. IRWIN, W. E. Isomalt - a sweet, reduced-calorie bulking agent. **Food Technology**, v. 44, p. 128, 1990.
31. JONKER, D.; LINA, B. A. R. 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose[®]) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1383-1389, 2002.

32. KAKINUMA, H; YUASA, H.; HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of alfa-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydrate Research**, v. 312, p.103-115, 1998.
33. KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; 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 a.
34. KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose, isomalt and isomaltulose-based oligomers feeding and on mineral absorption and retention. **Biological Trace Element Research**, v. 54, p. 239-250, 1996 b.
35. KAWAGUTI, Y. H. **Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2006. 166p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
36. KAWAGUTI, Y. H; 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
37. KAWAGUTI, Y. H. **Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2003. 145p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
38. KAWAI, K.; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. **Endocrinology Japan**, v. 32, p. 933-936, 1985.
39. KHAN, R. Chemical and enzymes transformations of sucrose. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 12-17, 1994.
40. 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.

41. KRASTANOV, A.; BLAZHEVA, D.; STANCHEV, V. Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fibre bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1655-1659, 2007.
42. 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.
43. KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology Enzyme**, v. 30, p. 593-598, 2003.
44. LANTERO, O.J. **Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*. US Patent 82109404.2**, 1983
45. 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. 3131-3136, 2004.
46. LICHTENTHALER, D. W.; PETERS, S. Carbohydrates as a green raw materials for the chemical industry. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 65-90, 2004.
47. LICHTENTHALER, D. W. Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. **Carbohydrate Research**, v. 313, p. 69-89, 1998.
48. LINA, B. A. R.; JONKER, D.; KOZIANOWSKI, G. Isomaltulose (Palatinose®: a review of biological and toxicological studies). **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p. 1375-1381, 2002.
49. LINA, B. A. R.; SMITS-VAN PROOIJJE, A. E.; WAALKENS-BERENDSEN, D. H. Embryotoxicity/ teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, 1997.
50. LINKE, H. A. B. Sweeteners and dental health: the influence of sugar substitutes on oral microorganisms. **Developments in Sweeteners**, v. 3, p. 151-189, 1987.

51. LOO, J. V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, H.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T. V.; HEUVEL, E. V. D. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 121-132, 1999.
52. LUND, B. M.; WYATT, G. M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Journal of General Microbiology**, v. 8, p. 330-336, 1973.
53. LUONG, B. M.; WYATT, G. M. Process and technoeconomics of ethanol production by immobilized cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 207-216, 1984.
54. MAKI, Y.; OTHA, K.; TAKAZOE, I.; MATSUKUBO, Y.; TOPSOGLOU, V.; FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspension human dental plaque. **Caries Research**, v. 17, p. 335-339, 1983.
55. MCALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E.; FOGARTY, W. M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 667-672, 1990.
56. MIYATA, Y.; SUGITANI, T.; TSUYUKI, K.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* producing trehalulose. **Bioscience and Biotechnology and Biochemistry**, v. 54, p. 1680-1681, 1992. .
57. 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, p. 95-102, 2005.
58. MORAES, A. L. L. **Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio.** Campinas, 2002. 95p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

59. MOREIRA, R. F; MARIA, C. A. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, p. 516-525, 2001.
60. MOYNIHAN, P. J. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. **Journal of Dentistry**, v. 26, p. 209-218, 1998.
61. MUNDRA, P.; DESAI, K.; LELE, S. S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2892-2896, 2007.
62. NAGAY-MIYATA, Y.; TSUYUKI, K; SUGITANI, T. Isolation and characterization of a trehalulose producing strain of *Agrobacterium*. **Bioscience and Biotechnology and Biochemistry** , v. 57, p. 2049-2053, 1994.
63. NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1245-1251, 2002.
64. NDINDAYINO, F.; HENRIST, D.; KIEKENS, F.; VERVAET, C.; REMON, J. P. Characterization and evaluation of isomalt performance in direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 189, p. 113 -124, 1999.
65. OGBONNA, J. C.; YOSHIFUMI; NAKAMURA, K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, p. 92-96, 1989.
66. OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N., HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 43-49, 1983.
67. ORSI, D.C. **Produção de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18 e otimização do processo de conversão de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2004. 72p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
68. PARK, Y. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 303-319, 2000.

69. PARK, Y. K.; UEKANE, R. T. ; SATO, H. H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 131-136, 1996.
70. 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.
71. 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. **Sweden Dental Journal**, v. 9, p. 149-155, 1985.
72. 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
73. SCOTT, C. D. Immobilized cells: a review of recent literature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 66-73, 1987.
74. 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.
75. SNODIN, D. J.; DANIEL, J. W. The toxicology and safety evaluation of non-nutritive sweeteners. Editors: GRENBY, T. H. **Developments in Sweeteners**, p.157-179, 1983.
76. TAKAZOE, I. Palatinose: an isomeric alternative to sucrose. Editors: GRENBY, T. H. **Progress in Sweeteners**, p.143-167, 1989.
77. TAKAZOE, I.; OTHA, K.; SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; IWAKURA, T.; NAKAJIMA, Y. **Low-cariogenic sweeteners**. US Patent 4.556.429, 1985.
78. TOPITSOGLOU, V.; SASAKI, N.; FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. **Caries Research**, v. 18, p. 47-51, 1984.

79. TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 483-490, 1992.
80. UEKANE, R. T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1993. 63 p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
81. 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.
82. VORLOP, K. D.; KLEIN, J. New developments in the field of cell immobilization - Formation of biocatalysts by ionotropic gelation. Editors: LAFFERTY, R. M. **Enzyme Technology**, p. 219-235, 1983.
83. WU, L.; BIRCH, R. G. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1581-1590, 2005.
84. ZHANG, D.; LI, N.; SWAMINATHAN, K., L.; ZHANG, L. H. A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase. **FEBS Letters**, v. 534, p. 151-155, 2003.
85. ZHANG, D.; LI, N.; SHEE-MEI, L.; ZHANG, L. H.; SWAMINATHAN, K. Isomaltulose synthase (*Pall*) of *Klebsiella* sp strain LX3: crystal structure and implication of mechanism. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, manuscript 302616200, 2003 b.
86. ZIESENITZ, C.S.; SIBERT, G. The metabolism and utilization of polyois and other bulk sweeteners compared with sugar. Editors: GRENBY, T. H. **Developments in sweeteners**. p. 109-149, 1987.

87 . ZUMBÉ, A.; LEE, A.; STOREY, D. Polyols in confectionery: the sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionary. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. S31-S45, 2001.

CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA BACTÉRIA *SERRATIA PLYMUTHICA*

RESUMO

Neste trabalho foi testado o efeito do melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica* através de Metodologia de Superfície de Resposta. No primeiro planejamento experimental, foram obtidos valores de atividade enzimática de 14,12 a 14,44 UA/mL, utilizando-se o meio de cultivo composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. No segundo planejamento experimental formulou-se um meio de cultivo sem adição do componente de maior custo, a peptona bacteriológica Biobrás[®]. Neste novo meio de cultivo otimizado para produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*, composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®], foi obtida atividade enzimática de 13,42 a 13,64 UA/mL na fermentação realizada em frascos sob agitação a 200 rpm, durante 12 horas a 30°C.

INTRODUÇÃO

A Metodologia de Superfície de Resposta é uma ferramenta que tem sido bastante empregada nos trabalhos de otimização dos processos de fermentação. É uma técnica útil para testar processos com múltiplas variáveis e interações entre essas variáveis, que podem ser identificadas e quantificadas. No que se refere à produção de enzimas, a Metodologia de Superfície de Resposta é freqüentemente utilizada na otimização e verificação dos efeitos dos parâmetros do processo (pH, temperatura, velocidade de agitação, período de incubação) como também dos componentes nutricionais do meio para aumento da atividade enzimática e redução de custos no processo fermentativo (Dey et al.³, Kawaguti et al.^{4, 5}, Moyo et al.⁷, Moraes et al.^{8,9}, Orsi¹¹, Seth et al.¹³).

Em vários estudos para produção de glicosiltransferase por diferentes microrganismos, foram utilizados meios de cultivo contendo sacarose como fonte de carbono e peptona, extrato de levedura e/ou extrato de carne como fonte de nitrogênio, além de sais como Na₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂ (Ahn et al.¹, Sarkki et al.¹², Wu et al.¹⁸). No trabalho de Véronèse et al.¹⁷ o meio de cultivo utilizado para fermentação de *Serratia plymuthica* era composto por sacarose 5% (p/v), extrato de levedura 0,75% (p/v) e sais. No estudo de Krastanov et al.⁶ o meio de cultivo utilizado para fermentação de *Serratia plymuthica* era composto por sacarose 5% (p/v), peptona bacteriológica 1% (p/v), extrato de levedura 0,6% (p/v), extrato de carne 0,25% (p/v) e sais. Tais componentes possuem custo considerável e desta forma encarecem a produção de glicosiltransferase. Assim, alguns trabalhos têm utilizado subprodutos (melaço de cana de açúcar) e resíduos agroindustriais (água de maceração de milho) como componentes do meio de cultivo na tentativa de reduzir os custos da fermentação (Kawaguti et al.^{4, 5}, Orsi.¹¹).

Kawaguti et al.⁴ e Kawaguti⁵ estudaram o efeito dos componentes do meio: melaço de cana de açúcar, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] na

produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12. A otimização do meio de cultivo foi realizada através de Metodologia de Superfície de Resposta. Foi obtida atividade de glicosiltransferase de 6,65 UA/mL utilizando-se o meio de cultivo otimizado composto de 100 g/L de melaço de cana de açúcar, 60 g/L de água de maceração de milho (Corn Products Brasil) e 8 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®], após 8 horas de fermentação pela bactéria a 30°C.

Orsi ¹¹ estudou a otimização do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp. K18 através de Metodologia de Superfície de Resposta, utilizando planejamentos fatoriais compostos centrais 2³ para verificar o efeito interativo dos nutrientes melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. Os valores ótimos das variáveis testadas foram: 80 g/L de melaço de cana de açúcar, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®], sendo obtido atividade de glicosiltransferase de 9,94 UA/mL, após 24 horas de fermentação da bactéria a 30°C. Com a otimização do meio de cultivo a atividade de glicosiltransferase aumentou aproximadamente 60 vezes em relação ao estudo anterior. Uekane ¹⁶ estudou a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp. K18 em meio de cultivo composto de 40 g/L de sacarose Ecibra[®], 10 g/L de peptona Difco[®] e 4 g/L de extrato de carne Difco[®]. A autora obteve atividade de glicosiltransferase de 0,17 UA/mL após 24 horas de fermentação a 30°C.

Nos trabalhos descritos por Kawaguti et al. ⁴, Kawaguti ⁵ e Orsi. ¹¹, a introdução do melaço de cana de açúcar em substituição a sacarose no meio de cultivo otimizado apresentou resultados positivos para produção de glicosiltransferase. De acordo com Curtin², o melaço de cana de açúcar é formado em termos percentuais por 50% de açúcares redutores totais, 20% de água, 8% de substâncias nitrogenadas, 8% de cinzas, 5% de sais minerais e 9% de outros compostos. O melaço de cana também contém vitaminas do complexo B como biotina (0,36 mg/Kg), ácido pantotênico (21 mg/Kg), riboflavina (1,8 mg/Kg) e tiamina (0,9 mg/Kg). Essa composição torna o melaço de cana de açúcar uma

excelente fonte alternativa de carbono no meio de cultivo, que além de diminuir os custos de produção da fermentação, pois tem valor comercial inferior ao da sacarose, também contribui para aumentar a atividade enzimática.

Neste trabalho utilizou-se planejamento experimental e análise de superfície de resposta, conforme metodologia descrita por Neto et al.¹⁰, para o estudo do efeito combinado dos componentes do meio de cultivo de menor custo com objetivo de obter a máxima produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção do microrganismo

A bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928, usada para produção de glicosiltransferase e conversão de sacarose em isomaltulose, foi obtida na Fundação André Tosello. A bactéria foi mantida em tubos inclinados de meio de cultura composto de 60 g/L de sacarose, 40 g/L de peptona, 4 g/L de extrato de carne e 20 g/L de ágar, sob refrigeração (8 –10°C) e com repicagem a cada dois meses.



Figura 2.1: Ilustração das colônias da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo composto de 60 g/L de sacarose, 40 g/L de peptona, 4 g/L de extrato de carne e 20 g/L de ágar, por 24 horas, a 30°C.

Planejamento experimental

Utilizou-se Metodologia de Superfície de Resposta para estudar o efeito combinado dos componentes do meio de cultura e assim otimizar a produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*. No primeiro experimento foi utilizado planejamento fatorial composto central 2^3 , com 8 ensaios referentes ao fatorial completo 2^3 , 6 ensaios referentes aos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, num total de 17 experimentos. No segundo experimento foi utilizado planejamento fatorial composto central 2^2 , com 4 ensaios referentes ao fatorial completo 2^2 , 4 ensaios referentes aos pontos axiais e 4 repetições no ponto central, num total de 12 experimentos. Analisaram-se os efeitos das variáveis independentes melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® na produção de glicosiltransferase (variável dependente). As análises estatísticas dos modelos foram feitas através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional Statistica®, versão 5.0 (Statsoft®, 1995) ¹⁵. Essas análises incluíram o teste Fisher (F-test) e o coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de determinação mede o quanto à variação nas respostas observadas pode ser explicada pelas variáveis experimentais e suas interações. Num modelo bem ajustado, as respostas previstas pelo modelo devem ser próximas das respostas observadas. Quanto mais próximo de 1,0 estiver o valor do coeficiente de determinação, melhor terá sido o ajuste do modelo em relação às respostas observadas. As combinações ótimas do meio de cultivo foram estimadas pelas curvas de contorno e superfícies de resposta.

Condições de fermentação

Para a preparação do pré-inóculo foram utilizados frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo amostras de 50 mL de meio de cultura composto por diferentes concentrações de melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®, de acordo com o planejamento experimental. Em cada frasco foi inoculada uma alçada de cultura jovem do microrganismo *Serratia plymuthica*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 200 rpm,

30°C, por 12 horas. Alíquotas de 5 mL do pré-inóculo foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL dos respectivos meios de cultura. Os frascos foram incubados a 30°C, com agitação de 200 rpm e a produção de glicosiltransferase foi determinada após 12 horas de fermentação. A massa celular foi removida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos e 5°C, lavada com água destilada e suspensa em 20 mL de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0. Para extração da glicosiltransferase intracelular a suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a ultrasonicação no aparelho Labline Ultra-Tip (Labline Instruments, Inc., IL, USA) por 20 segundos a 180 Watts. Após a centrifugação o sobrenadante foi preservado para determinação da atividade de glicosiltransferase.

Determinação da atividade de glicosiltransferase

Para a determinação da atividade de glicosiltransferase uma mistura de 0,45 mL de solução de sacarose 4% (p/v) em tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0 e 0,05 mL de solução enzimática foi incubada em banho-maria a 35°C por 20 minutos, conforme metodologia descrita por Uekane ¹⁶. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson ¹⁴. A leitura de absorbância foi feita em 540 nm, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU 70 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que produziu açúcares redutores correspondendo a 1 µmol de isomaltulose por minuto por mililitro de enzima a partir da sacarose (UA/mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro planejamento experimental

No primeiro planejamento experimental, para otimização do meio de cultura, analisaram-se os efeitos das variáveis independentes (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase produzida pela bactéria *Serratia plymuthica*. Um planejamento fatorial composto central 2^3 foi utilizado. A Tabela 2.1 mostra as variáveis independentes e seus valores decodificados utilizados no primeiro planejamento experimental. As concentrações das variáveis testadas foram de 0-80 g/L de melaço de cana de açúcar, 0-30 g/L de peptona bacteriológica Biobrás® e 0-40 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®.

Tabela 2.1. Valores decodificados (g/L) utilizados no primeiro planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Variável	Valor (g/L)				
	- α	-1	0	+1	+ α
Melaço de cana de açúcar	0	16	40	64	80
Peptona bacteriológica	0	6	15	24	30
Extrato de levedura	0	8	20	32	40

A Tabela 2.2 mostra o planejamento codificado com as combinações experimentais e os resultados observados no estudo do efeito das variáveis do meio de cultivo na produção de glicosiltransferase. Verificou-se que as maiores atividades de glicosiltransferase foram obtidas nos ensaios 11 (17,78 UA/mL) e 13 (17,07 UA/mL) que não continham peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®, respectivamente. O ensaio 9, que não continha melaço de cana de açúcar, apresentou a menor atividade enzimática (1,53 UA/mL). Nos ensaios 15, 16 e 17 (repetições do ponto central) observaram-se valores de atividade enzimática de 14,12, 14,23 e 14,44 UA/mL,

utilizando-se meio de cultivo composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®. A Tabela 2.2 mostra uma correlação satisfatória entre os valores preditos e os valores experimentais, o que justifica a validade do modelo de resposta obtido.

Tabela 2.2. Primeiro planejamento experimental codificado e resultados dos efeitos das variáveis do meio de cultivo (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	Extrato de levedura	Valor experimental (UA/mL)	Valor predito (UA/mL)
1	-1	-1	-1	8,05	9,56
2	+1	-1	-1	14,98	16,86
3	-1	+1	-1	9,27	9,02
4	+1	+1	-1	13,33	14,80
5	-1	-1	+1	9,98	9,58
6	+1	-1	+1	12,19	13,48
7	-1	+1	+1	9,63	9,04
8	+1	+1	+1	11,63	11,42
9	- α	0	0	1,53	2,21
10	+ α	0	0	12,12	10,35
11	0	- α	0	17,78	16,99
12	0	+ α	0	13,28	13,90
13	0	0	- α	17,07	15,74
14	0	0	+ α	11,53	12,90
15	0	0	0	14,12	14,33
16	0	0	0	14,23	14,33
17	0	0	0	14,44	14,33

A Tabela 2.3 apresenta o efeito das variáveis (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) sobre a atividade de glicosiltransferase produzida pela bactéria *Serratia plymuthica*. Analisando os parâmetros lineares, observou-se que o melaço de cana de açúcar apresentou efeito positivo significativo na atividade enzimática, enquanto a peptona bacteriológica Biobrás® e o extrato de levedura Prodex Lac SD® exerceram efeitos negativos significativos. As

interações do melaço de cana de açúcar com a peptona bacteriológica Biobrás® e do melaço de cana de açúcar com o extrato de levedura Prodex Lac SD® apresentaram efeitos negativos estatisticamente significativos. A interação da peptona bacteriológica Biobrás® com o extrato de levedura Prodex Lac SD® não foi considerada estatisticamente significativa. O melaço de cana de açúcar apresentou o maior efeito na produção de glicosiltransferase, sendo que a peptona bacteriológica Biobrás® e o extrato de levedura Prodex Lac SD® exerceram menor influência sobre a resposta.

Tabela 2.3. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Parâmetro	Coefficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média *	14,33	0,09	13,92	14,73
(1) Melaço de cana (L) *	2,42	0,04	2,23	2,61
Melaço de cana (Q) *	-2,85	0,04	-3,06	-2,64
(2) Peptona (L) *	-0,65	0,04	-0,84	-0,46
Peptona (Q) *	0,24	0,04	0,03	0,44
(3) Extrato levedura (L) *	-0,84	0,04	-1,03	-0,65
Extrato levedura (Q)	-0,20	0,04	-0,41	0,01
1LX2L *	-0,38	0,05	-0,63	-0,14
1LX3L *	-0,85	0,05	-1,09	-0,60
2LX3L	-0,06	0,05	-0,31	0,19

***parâmetros estatisticamente significativos (95 % de confiança)
(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático**

A Tabela 2.4 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase produzida por *Serratia plymuthica*. Os coeficientes de regressão foram estimados com ótimo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,91$). A análise estatística do modelo foi obtida por ANOVA e os resultados foram expressos na Tabela 2.5. Em geral, para o modelo ter uma boa correlação entre resultados preditos e experimentais, o valor-F experimental deve ser maior que o valor-F tabelado.

Neste planejamento o valor-F experimental foi 4,1 vezes maior do que o valor F-tabelado, isso mostra que o modelo é estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança ($p < 0,05$).

Tabela 2.4. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do primeiro planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	t (2)	p	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média *	14,33	0,09	152,95	0,0001	13,92	14,73
(1) Melaço de cana (L) *	4,84	0,08	54,93	0,0003	4,45	5,21
Melaço de cana (Q) *	-5,70	0,09	-58,75	0,0002	-6,11	-5,28
(2) Peptona (L) *	-1,30	0,08	-14,81	0,0045	-1,68	-0,92
Peptona (Q) *	0,47	0,09	4,85	0,0399	0,05	0,88
(3) Extrato levedura (L) *	-1,69	0,08	-19,16	0,0027	-2,06	-1,30
Extrato levedura (Q)	-0,40	0,09	-4,13	0,0537	-0,81	0,01
1LX2L *	-0,77	0,11	-6,69	0,0215	-1,26	-0,27
1LX3L *	-1,70	0,11	-14,74	0,0045	-2,18	-1,20
2LX3L	-0,12	0,11	-1,04	0,4061	-0,61	0,37

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 2.5. Análise de variância do primeiro planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	209,29	7	29,90	13,28
Resíduos	20,23	9	2,25	
Falta de ajuste	20,25	7		
Erro puro	0,05	2		
Total	229,52	16		

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,91$, Valor-F tabelado: $F_{0,95;7;9} = 3,29$

Após as análises, foi possível obter a equação 1, que representa o modelo codificado para a atividade de glicosiltransferase e descreve as curvas de contorno e superfícies de resposta das variáveis analisadas.

$$Y = 14,33 + 2,42.X_1 - 0,65.X_2 - 0,84.X_3 - 2,85.X_1^2 + 0,24.X_2^2 - 0,38.X_1.X_2 - 0,85.X_1.X_3$$

(equação 1)

onde Y é a produção de glicosiltransferase, X_1 é a concentração de melaço de cana de açúcar, X_2 é a concentração de peptona bacteriológica Biobrás[®] e X_3 é a concentração de extrato de levedura Prodex Lac SD[®].

As Figuras 2.2 e 2.3 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno com os efeitos de melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] na atividade de glicosiltransferase (UA/mL). Pode-se observar que a atividade enzimática tende a aumentar com a diminuição da concentração de peptona bacteriológica Biobrás[®] ou com a diminuição da concentração de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. Desse modo, as superfícies de resposta e curvas de contorno indicam a possibilidade de formular um meio de cultivo sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®] ou sem adição de extrato de levedura Prodex Lac SD[®] para obter a produção otimizada de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

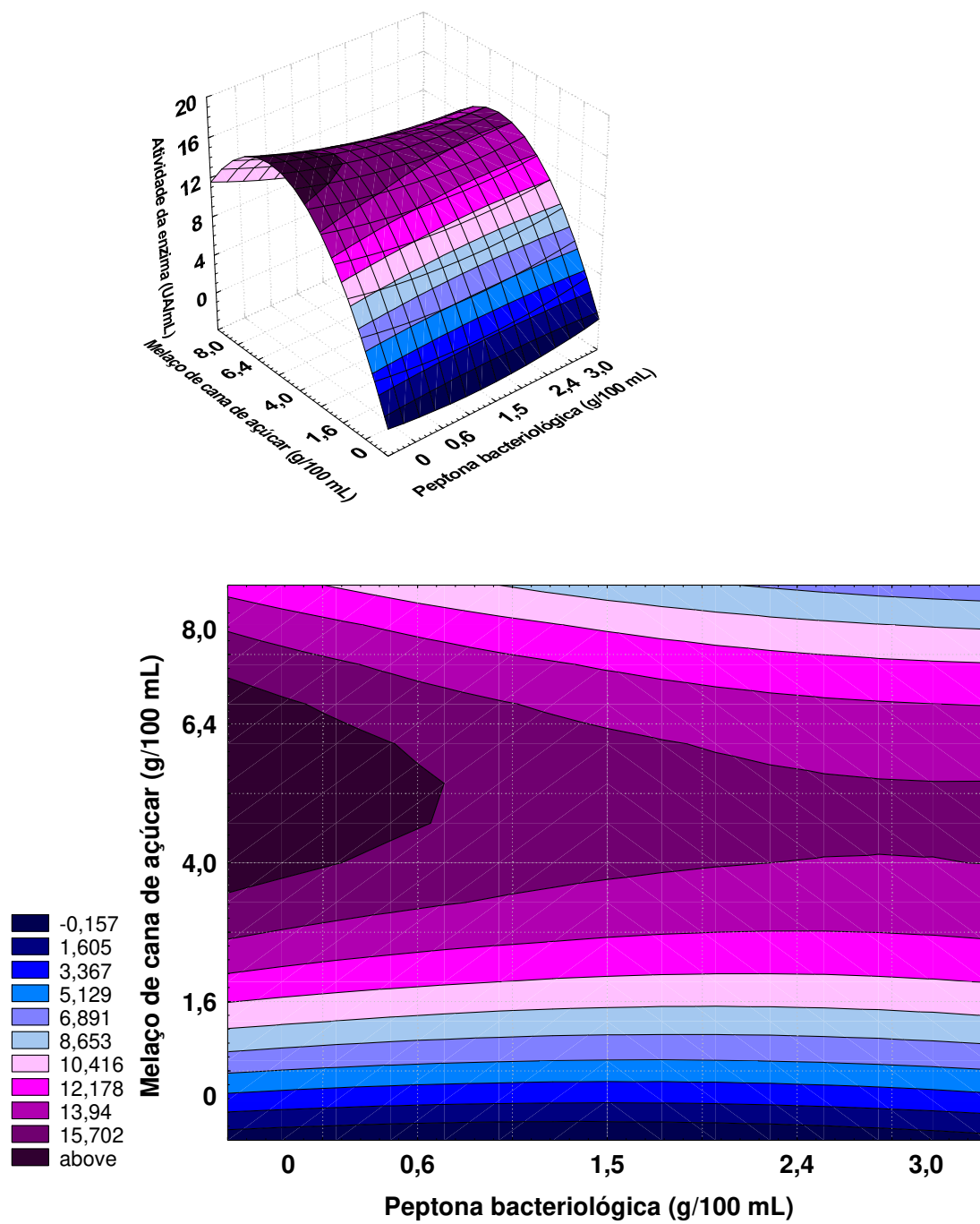


Figura 2.2: Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de glicosiltransferase (UA/mL) de *Serratia plymuthica* em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás® e melão de cana, referente ao primeiro planejamento.

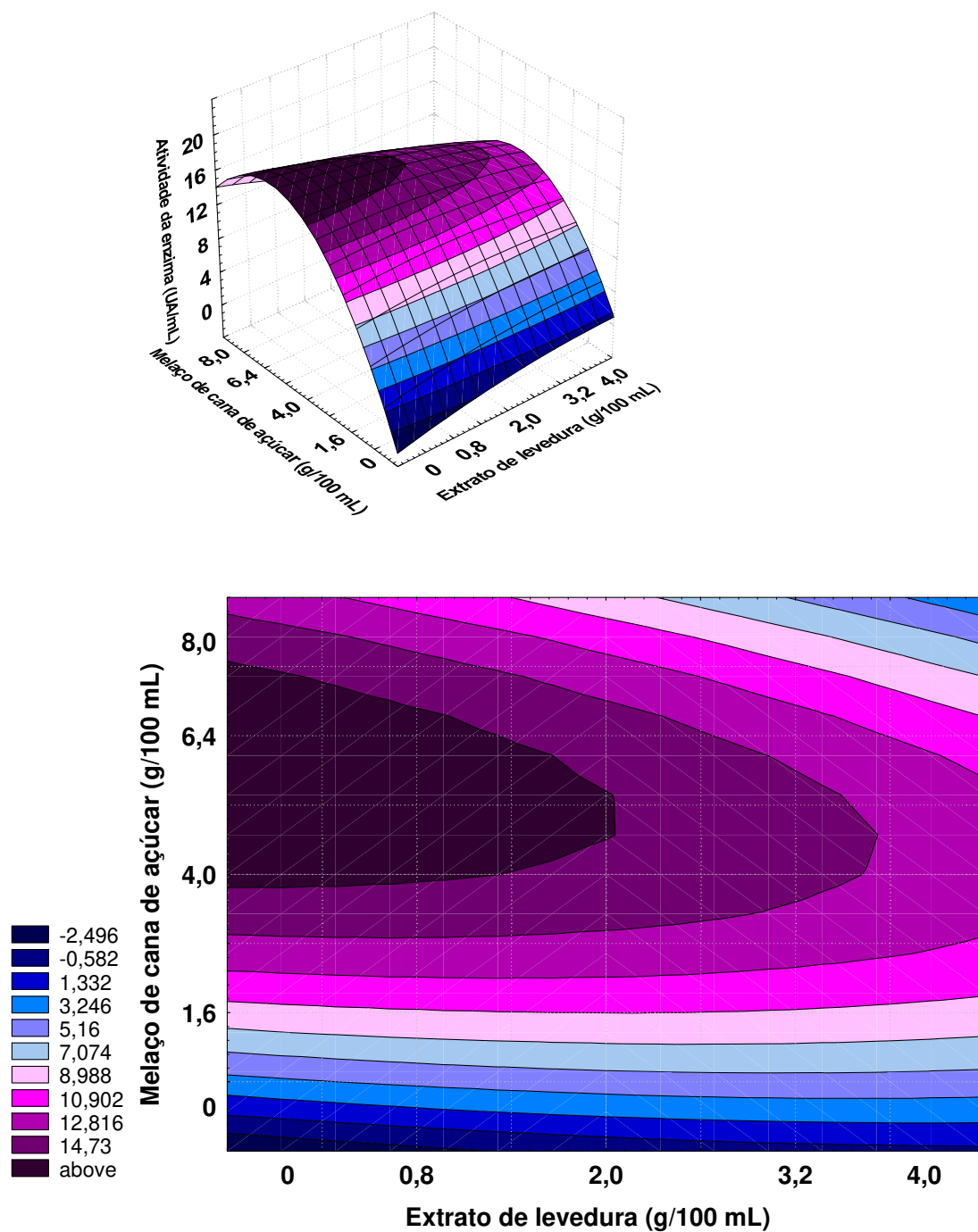


Figura 2.3: Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de glicosiltransferase (UA/mL) de *Serratia plymuthica* em função da concentração de extrato de levedura Prodex Lac SD® e melaço de cana, referente ao primeiro planejamento.

Segundo planejamento experimental

No segundo planejamento experimental, para otimização do meio de cultura, optou-se por formular um meio de cultivo sem adição do componente de maior custo que foi a peptona bacteriológica Biobrás[®]. Foram estudados os efeitos das variáveis independentes (melaço de cana de açúcar e extrato de levedura Prodex Lac SD[®]) do meio de cultivo na atividade de glicosiltransferase produzida por *Serratia plymuthica*, utilizando planejamento fatorial composto central 2². A Tabela 2.6 mostra os valores decodificados das variáveis independentes utilizados no planejamento experimental. As concentrações testadas foram de 0-80 g/L de melaço de cana de açúcar e 0-40 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®].

Tabela 2.6. Valores decodificados (g/L) utilizados no segundo planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Variável	Valor (g/L)				
	$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
Melaço de cana de açúcar	0	16	40	64	80
Extrato de levedura	0	8	20	32	40

A Tabela 2.7 mostra que a maior produção de glicosiltransferase (13,42 a 13,64 UA/mL) foi obtida nos ensaios 9, 10, 11 e 12 (repetições do ponto central) utilizando-se meio de cultivo composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®].

Tabela 2.7. Segundo planejamento experimental codificado e resultados dos efeitos das variáveis do meio de cultivo (melaço de cana de açúcar e extrato de levedura Prodex Lac SD[®]) na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Ensaio	Melaço de cana	Extrato de levedura	Valor experimental (UA/mL)
1	-1	-1	8,34
2	+1	-1	8,04
3	-1	1	6,02
4	+1	1	3,01
5	- α	0	1,20
6	+ α	0	4,50
7	0	- α	2,97
8	0	+ α	3,88
9	0	0	13,42
10	0	0	13,45
11	0	0	13,64
12	0	0	13,63

A Tabela 2.8 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase produzida por *Serratia plymuthica*. Os coeficientes de regressão foram estimados com satisfatório coeficiente de determinação ($R^2 = 0,85$). A análise estatística do modelo foi obtida por ANOVA e os resultados foram expressos na Tabela 2.9. Neste planejamento o valor-F experimental foi 1,58 vezes maior do que o valor F-tabelado, isso mostra que o modelo é estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança ($p < 0,05$).

Tabela 2.8. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do segundo planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média *	13,54	0,06	13,36	13,73
(1) Melaço de cana (L) *	0,17	0,05	0,04	0,30
Melaço de cana (Q) *	-4,53	0,04	-4,67	-4,38
(2) Extrato levedura (L) *	-0,75	0,04	-0,88	-0,62
Extrato levedura (Q) *	-4,24	0,04	-4,39	-4,10
1L x 2L *	-0,68	0,06	-0,86	-0,49

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 2.9. Análise de variância do segundo planejamento experimental para otimização do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	213,92	5	42,78	6,92
Resíduos	37,09	6	6,18	
Falta de ajuste	37,05	3		
Erro puro	0,04	3		
Total	251,02	11		

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,85$, Valor-F tabelado: $F_{0,95;5;6} = 4,39$

A equação 2 representa o modelo codificado para a atividade de glicosiltransferase e descreve as curvas de contorno e superfícies de resposta das variáveis analisadas.

$$Y = 13,54 + 0,17 \cdot X_1 - 0,75 \cdot X_2 - 4,53 \cdot X_1^2 - 4,24 \cdot X_2^2 - 0,68 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{equação 2})$$

onde Y é a produção de glicosiltransferase, X_1 é a concentração de melaço de cana de açúcar e X_2 é a concentração de extrato de levedura Prodex Lac SD[®].

A Figura 2.4 ilustra a superfície de resposta e curva de contorno com os efeitos de melaço de cana de açúcar e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica*. Foi obtida maior produção de glicosiltransferase (13,54 UA/mL, média dos pontos centrais) utilizando-se o meio de cultivo composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®].

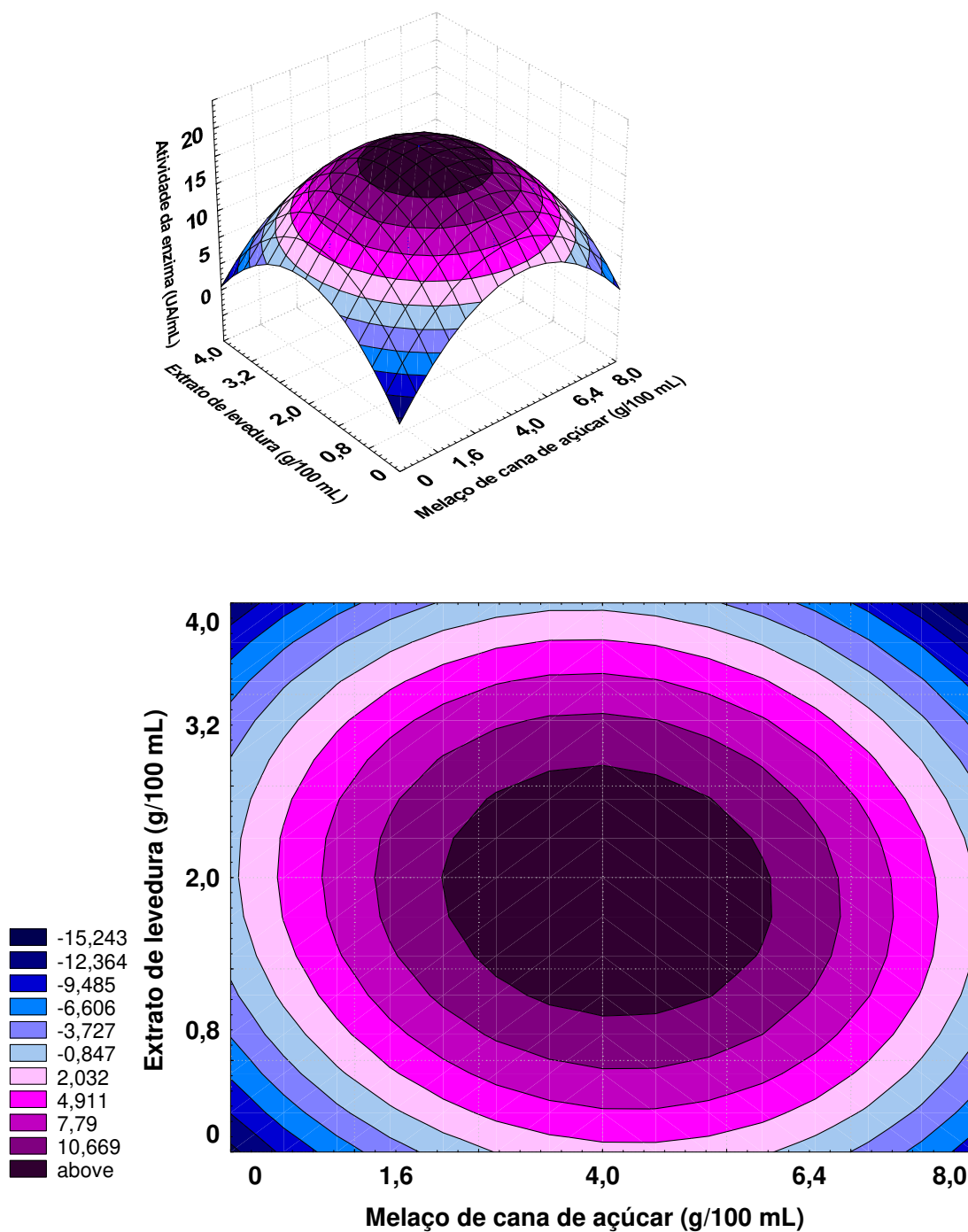


Figura 2.4: Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de glicosiltransferase (UA/mL) de *Serratia plymuthica* em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD®, referente ao segundo planejamento.

Moraes⁹ verificou o efeito de concentrações variadas de sacarose ou melaço de cana de açúcar (0-200 g/L) e de peptona bacteriológica da Difco[®] (0-100 g/L) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12. A autora obteve maior atividade de glicosiltransferase (12,80 UA/mL) no meio de cultivo composto de 120 g/L de melaço de cana de açúcar, 40 g/L de peptona bacteriológica da Difco[®] e 4 g/L de extrato de carne da Biobrás[®], após 15 horas de fermentação do microrganismo a 30°C.

Kawaguti et al.⁴ e Kawaguti⁵ também estudaram o efeito dos componentes do meio de cultivo: melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12. Na fermentação a 30°C o autor obteve atividade de glicosiltransferase de 7,47 UA/mL no meio de cultivo otimizado composto de 160 g/L de melaço de cana de açúcar, 20 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 15 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®], após 15 horas. Kawaguti⁵ relatou que o custo do meio de cultivo proposto por Moraes⁹ no estudo anterior foi estimado em R\$ 15,62/ litro, enquanto que o meio de cultivo deste trabalho proposto teve custo reduzido para R\$ 7,06/ litro.

CONCLUSÕES

A estratégia de otimizar os componentes do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica* foi aplicada com sucesso. No primeiro planejamento experimental foi obtida atividade enzimática de 14,26 UA/mL (média dos pontos centrais) no meio de cultivo 1, composto de 40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. No segundo planejamento experimental o meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]), além de render ótima produção de glicosiltransferase (13,54 UA/mL, média dos pontos centrais), teve seu custo reduzido por ser formulado sem a adição do componente peptona bacteriológica da Biobrás[®].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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
2. CURTIN, L. V. Molasses: general considerations In: **Molasses in animal nutrition**. West Des Moines, Iowa: National Feed Ingredients Association. 1983.11p.
3. DEY, G.; MITRA, A.; BANERJEE, R.; MAITI, B. R. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 227-231, 2001.
4. KAWAGUTI, Y. H.; MANRICH, E.; FLEURI, F. L.; 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.
5. KAWAGUTI, Y. H. **Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2003. 145p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
6. 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.
7. MOYO S.; GASHE B. A.; COLLISON, E. K.; MPUCHANE, S. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 87-100, 2003.
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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 95-102, 2005.

9. MORAES, A. L. L. **Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio**. Campinas, 2002. 95p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

10. NETO, B. D. B. SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos**. 3.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.

11. ORSI, D. C. **Produção de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18 e otimização do processo de conversão de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2004. 72p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

12. 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.

13. SETH, M.; CHAND, S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* – optimization of process parameters. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 39-44, 2000.

14. SOMOGY-NELSON, M.; A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 1062-1063, 1960.

15. **Statistica®** 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74104, USA).

16. UEKANE, R. T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1993. 63 p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

17. 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.
18. WU, L.; BIRCH, R. G. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1581-1590, 2005.

CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO DA BACTÉRIA *SERRATIA PLYMUTHICA* PARA PRODUÇÃO DE MASSA CELULAR E BIOSÍNTESE DE GLICOSILTRANSFERASE

RESUMO

Foi estudado o efeito da temperatura na fermentação da bactéria *Serratia plymuthica* para produção de massa celular e de glicosiltransferase. O estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, biossíntese de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo foi feito em fermentador de 6,6 L nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C. Foram utilizados o meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®) e o meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®). Na fermentação da bactéria em meio de cultivo 1, as produções máximas de glicosiltransferase (25,97 UA/mL e 26,65 UA/mL) foram observadas após 6 horas de cultivo nas temperaturas de 26°C e 28°C, respectivamente, enquanto que na fermentação da bactéria em meio de cultivo 2, as maiores produções de glicosiltransferase (22,75 UA/mL e 23,30 UA/mL) ocorreram após 12 horas de cultivo nas temperaturas de 26°C e 28°C, respectivamente. Na temperatura de 30°C houve diminuição da produção de glicosiltransferase nos meios de cultivo 1 e 2, sendo obtidos valores de 16,08 UA/mL e 16,72 UA/mL, respectivamente. A pequena variação do pH do meio de cultivo (6,2-5,7) sugeriu baixa produção de compostos ácidos como subproduto. A atividade de glicosiltransferase aumentou rapidamente enquanto as células estavam em fase de crescimento exponencial (6-12 horas), indicando que a produção de glicosiltransferase por *Serratia plymuthica* é um produto de metabolismo primário.

INTRODUÇÃO

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam o crescimento de microrganismos e a biossíntese de metabólitos. Sendo assim, em muitos trabalhos estudou-se o efeito da temperatura no processo de fermentação visando determinar as condições ótimas para obtenção de rendimento máximo dos produtos de interesse (Converti et al. ¹, Kawaguti ⁵, Kawaguti et al. ⁶, Moraes et al. ¹⁰, Moraes ¹¹, Orsi ¹², Zheng et al. ¹⁸).

Orsi ¹² estudou a influência da temperatura (26°C-35°C) na fermentação da linhagem *Klebsiella* sp. K18 para produção de glicosiltransferase. Os experimentos foram feitos em fermentador de 5 L, utilizando meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana de açúcar (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás[®] (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (20 g/L), com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm. A maior produção de glicosiltransferase ocorreu após 8 horas de fermentação nas temperaturas de 28°C e 30°C, sendo obtidos valores de atividade enzimática de 21,78 UA/mL e 21,53 UA/mL, respectivamente. Na temperatura de 35°C a produção de glicosiltransferase não foi favorecida sendo obtido baixa atividade enzimática (4,37 UA/mL).

Moraes et al. ¹⁰ e Moraes ¹¹ estudaram o cultivo da linhagem *Erwinia* sp. D12 em fermentador de 3L, utilizando meio otimizado composto de melaço de cana de açúcar (120 g/L), peptona bacteriológica Difco[®] (40 g/L) e extrato de carne Biobrás[®] (4 g/L), com variação de temperatura de 28°C a 32°C. Foi obtida maior atividade de glicosiltransferase (15,61 UA/mL) após 8 horas de fermentação do microrganismo a 30°C. Em temperaturas acima (32°C) ou abaixo (28°C) ocorreu diminuição da atividade de glicosiltransferase, sendo a queda mais pronunciada na temperatura de 32°C (5,62 UA/mL).

Em vários trabalhos para produção de glicosiltransferase, com diferentes tipos de microrganismos, os autores utilizaram temperatura de 30°C e tempo de fermentação de 16 a 24 horas. McAllister et al. ⁹ descreveram que a produção máxima de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928 ocorreu após 16 horas de fermentação a 30°C.

No trabalho de Huang et al.⁴ a máxima produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella planticola* CCRC 19112 foi obtida após 16-18 horas de fermentação na temperatura de 30°C. Schiweck et al.¹³ usaram os microrganismos *Protaminobacter rubrum* e *Serratia plymuthica* para produzir glicosiltransferase nas temperaturas de 20°C a 30°C, por 24 horas. No trabalho de Véronèse et al.¹⁷ a bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928 foi incubada por 20 horas na temperatura de 30°C.

Neste trabalho estudou-se o efeito da temperatura (26°C, 28°C e 30°C) na produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica* em fermentador de 6,6 L Bioflow IIC, visando obter massa celular com alta atividade de glicosiltransferase para conversão de sacarose em isomaltulose.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos de fermentação

Os experimentos de fermentação da bactéria *Serratia plymuthica* foram realizados em fermentador de 6,6 L Bioflow IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C (Figura 3.1). Foram utilizados o meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®) e o meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®). Para a preparação do inóculo a bactéria foi cultivada em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo, incubados com agitação de 200 rpm, a 30°C, por 12 horas. Uma alíquota de 300 mL de inóculo cultivado foi adicionada assepticamente ao fermentador contendo 2700 mL de meio de cultivo previamente esterilizado. A agitação e a aeração foram mantidas constantes em 200 rpm e 1 vvm (volume/volume/minuto). Alíquotas de meio de cultivo foram removidas assepticamente do fermentador em diferentes intervalos de tempo e centrifugadas a 7,850 x g, durante 15 minutos, a 5°C. O pH do meio de cultivo foi medido no sobrenadante e a massa celular obtida foi usada para determinação da atividade de glicosiltransferase e da concentração de biomassa.



Figura 3.1: Ilustração do fermentador de 6,6 L Bioflow IIC.

Determinação da atividade de glicosiltransferase, da concentração de massa celular e do pH do meio de cultura

Para determinar a atividade da glicosiltransferase, a massa celular foi lavada com água destilada e suspendida em 20 mL de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0. A suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a ultrasonicação no aparelho Labline Ultra-Tip (Labline Instruments, Inc., IL, USA) por 20 segundos a 180 Watts. A atividade de glicosiltransferase foi determinada pela concentração de açúcares redutores no sobrenadante, utilizando-se o método de Somogyi-Nelson ¹⁴, conforme metodologia descrita por Uekane ¹⁶. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que produziu açúcares redutores correspondendo a 1 µmol de isomaltulose por minuto por mililitro de enzima a partir da sacarose (UA/mL). Para determinar a concentração de biomassa a massa celular foi lavada com água destilada e suspendida em 20 mL de água destilada. A concentração de massa celular foi estimada pela medida da absorbância da suspensão celular em 660 nm, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU 70 (Beckman Couter, Inc., Fullerton, CA), baseado no método descrito por Mallette ⁸. O pH do meio de cultivo foi determinado utilizando-se potenciômetro MARTE[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fermentação do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®) pela bactéria *Serratia plymuthica* nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C

A Tabela 3.1 mostra a relação entre o tempo, alteração do pH, concentração de massa celular e produção de glicosiltransferase na fermentação do meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®) pela bactéria *Serratia plymuthica*, em diferentes temperaturas. Nos experimentos a 26°C e 28°C alcançou-se atividade máxima da enzima de 25,97 UA/mL e 26,65 UA/mL após 6 horas de fermentação, sendo que após 24 horas de fermentação a atividade enzimática diminuiu, respectivamente, para 22,98 UA/mL e 10,98 UA/mL. Na temperatura de 30°C houve queda na produção de glicosiltransferase, sendo obtido 16,72 UA/mL após 6 horas de fermentação. Observou-se pequena variação do pH do meio de cultivo, sendo que o pH inicial era de 6,2 e após 24 horas de fermentação diminuiu para 5,7-6,0.

Tabela 3.1. Efeito da temperatura na produção de glicosiltransferase, concentração de massa celular e alteração do pH do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®), fermentado pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Tempo (horas)	26°C			28°C			30°C		
	Atividade (UA/mL)	Massa Celular (abs 660 nm)	pH	Atividade (UA/mL)	Massa Celular (abs 660 nm)	pH	Atividade (UA/mL)	Massa Celular (abs 660 nm)	pH
2	7,30	1,65	6,2	7,40	2,02	6,2	4,41	2,72	6,2
4	13,17	3,30	6,2	26,10	3,38	6,2	7,70	4,02	6,2
6	25,97	4,12	6,2	26,65	4,32	6,3	16,72	5,20	6,2
8	24,68	4,80	6,2	25,58	5,04	6,0	16,02	5,36	6,0
10	24,28	5,31	6,1	19,43	5,50	5,9	14,49	5,51	5,9
12	23,03	5,64	6,0	17,25	6,33	5,8	14,19	6,02	5,7
24	22,98	7,83	6,0	10,98	8,95	5,7	11,24	6,26	5,7

Fermentação do meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®) pela bactéria *Serratia plymuthica* nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C

A Tabela 3.2 mostra a relação entre o tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultivo, concentração de massa celular e produção de glicosiltransferase pela bactéria *Serratia plymuthica* em meio de cultivo 2, composto de melaço de cana de açúcar (40 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L), nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C. A maior produção de glicosiltransferase ocorreu após 12 horas de cultivo nas temperaturas de 26°C e 28°C, sendo obtidos 22,75 UA/mL e 23,30 UA/mL, respectivamente. Após 24 horas de fermentação a atividade enzimática diminuiu para 20,53 UA/mL a 26°C e 16,85 UA/mL a 28°C. Na temperatura de 30°C houve diminuição da produção de glicosiltransferase, sendo obtido atividade enzimática máxima de 16,08 UA/mL após 10 horas de fermentação. Observou-se pequena alteração do pH do meio de cultivo, sendo que o pH inicial era de 6,2 e após 24 horas de fermentação diminuiu para 5,6-5,7.

Tabela 3.2. Efeito da temperatura na produção de glicosiltransferase, concentração de massa celular e alteração do pH do meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®), fermentado pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Tempo (horas)	26°C			28°C			30°C		
	Atividade (UA/mL)	Massa Celular (abs 660 nm)	pH	Atividade (UA/mL)	Massa Celular (abs 660 nm)	pH	Atividade (UA/mL)	Massa Celular (abs 660 nm)	pH
2	3,80	1,25	6,2	3,73	1,25	6,2	2,45	1,31	6,2
4	7,21	2,23	6,1	6,95	2,25	6,2	5,63	2,25	6,0
6	16,10	3,62	6,1	15,70	3,10	6,2	9,45	3,17	6,0
8	21,40	4,25	6,0	17,48	3,84	6,0	15,63	4,33	5,9
10	22,08	4,73	5,9	20,56	4,36	6,0	16,08	4,60	5,7
12	22,75	5,12	5,7	23,30	4,48	5,9	13,25	4,85	5,6
14	22,60	5,56	5,7	22,47	5,15	5,8	11,21	4,85	5,6
24	20,53	6,40	5,6	16,85	6,02	5,7	10,50	4,86	5,6

A Figura 3.2 ilustra os resultados dos experimentos de fermentação do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]) e do meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]) pela bactéria *Serratia plymuthica* a 26°C, 28°C e 30°C, em relação à biossíntese de glicosiltransferase, produção de massa celular e alteração do pH do meio de cultivo. Foi observado aumento gradativo da concentração de biomassa, sendo que após 24 horas de cultivo a quantidade de massa celular produzida foi maior utilizando-se o meio de cultivo 1 do que o meio de cultivo 2. Pode-se observar também que houve pequena alteração do pH do meio de cultivo durante as fermentações, sugerindo baixa produção de compostos ácidos.

A maior produção de glicosiltransferase, para ambos meios de cultivo, ocorreu nas temperaturas de 26°C e 28°C. Utilizando-se o em meio de cultivo 1 a produção máxima de glicosiltransferase (25,97 UA/mL e 26,65 UA/mL) foi obtida após 6 horas de fermentação a 26°C e 28°C, respectivamente. Enquanto que na fermentação da bactéria em meio de cultivo 2, as maiores produções de glicosiltransferase (22,75 UA/mL e 23,30 UA/mL) ocorreram após 12 horas de cultivo a 26°C e 28°C, respectivamente. Após 24 horas de fermentação os valores médios de atividade de glicosiltransferase diminuíram para 21,75 UA/mL a 26°C e 13,91 UA/mL a 28°C. Observou-se que houve uma queda menor da atividade após 24 horas de fermentação a 26°C do que a 28°C. Então, a temperatura escolhida para continuidade dos estudos com a bactéria *Serratia plymuthica* foi a de 26°C, na qual se obteve alta atividade de glicosiltransferase e uma maior estabilidade enzimática no decorrer do tempo.

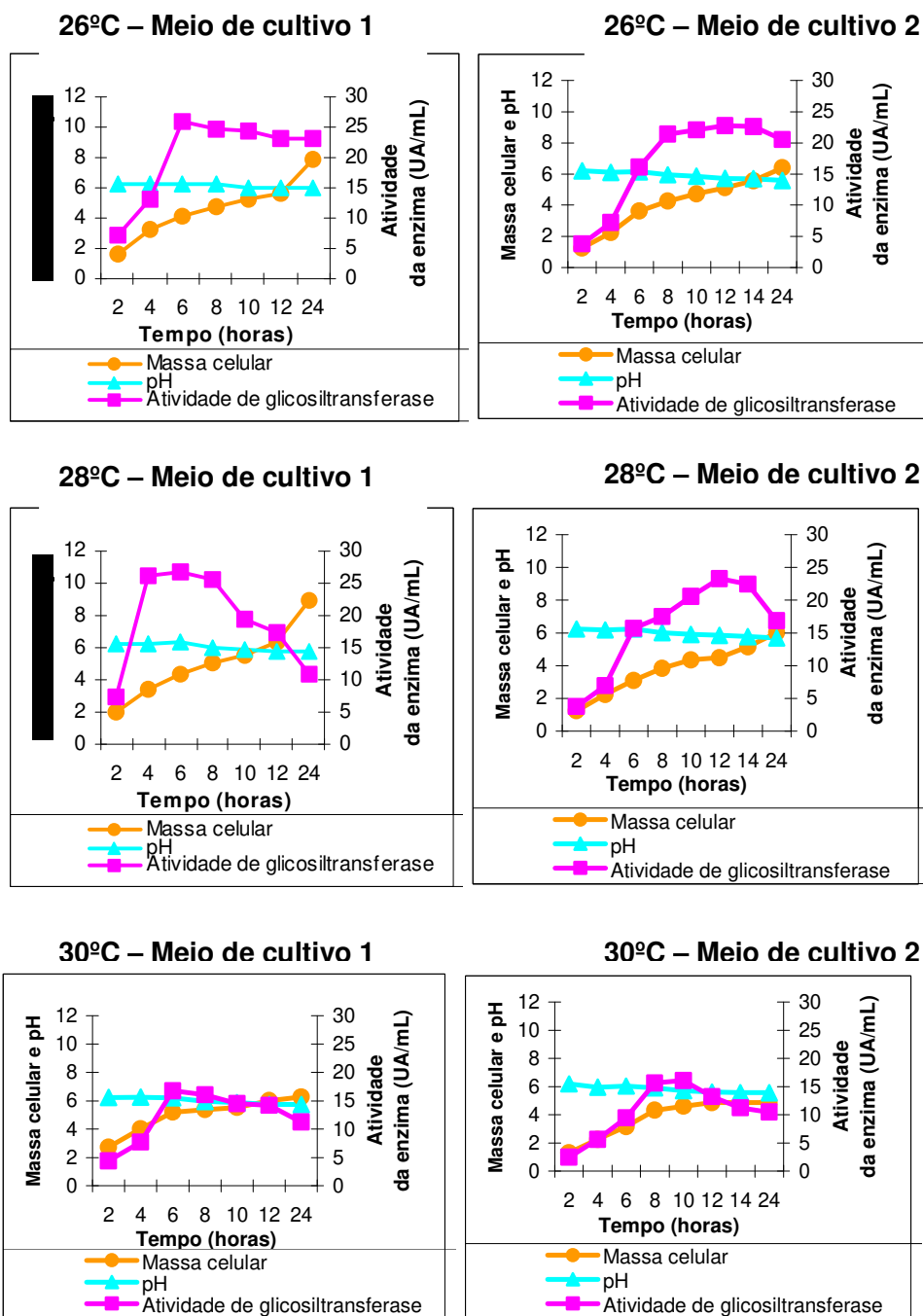


Figura 3.2. Efeito da temperatura na produção de glicosiltransferase, concentração de massa celular e alteração do pH do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®) e do meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®), fermentados pela bactéria *Serratia plymuthica*.

Kawaguti et al.⁶ e Kawaguti⁷ estudaram o crescimento da linhagem *Erwinia* sp. D12 em fermentador de 6,6 L, utilizando meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana de açúcar (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás[®] (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (15 g/L), com variação de temperatura de 24°C a 28°C. Foi obtida maior atividade de glicosiltransferase após 10 horas de fermentação nas temperaturas de 24°C (14,0 UA/mL) e 26°C (14,6 UA/mL). Na temperatura de 28°C ocorreu queda na atividade de glicosiltransferase (12,2 UA/mL).

Kawaguti⁵ também estudou a influência da temperatura (25°C-30°C) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12, utilizando meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana de açúcar (150 g/L), água de maceração de milho (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (15 g/L). A maior produção de glicosiltransferase ocorreu após 8-9 horas de fermentação nas temperaturas de 25°C e 27°C, sendo obtidos valores de atividade enzimática de 21,59 UA/mL e 22,49 UA/mL, respectivamente. Na temperatura de 30°C houve queda na produção de glicosiltransferase (17,05 UA/mL) com rápido declínio da atividade enzimática ao longo do tempo, devido ao fato da enzima glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 ser termossensível.

De acordo com a literatura (Tabela 3.3) os microrganismos produtores de glicosiltransferase, geralmente, são de crescimento rápido, em torno de 6 a 24 horas e em faixas de temperatura ótima que variam de 24°C a 30°C (Egerer², Heikkila et al.³, Huang et al.⁴, Kawaguti et al.⁶, McAllister et al.⁸, Moraes et al.¹⁰, Orsi¹², Tsuyki et al.¹⁵, Uekane¹⁶, Véronèse et al.¹⁷). Egerer² observou que a produção máxima da enzima ocorre na fase exponencial de crescimento bacteriano e sugeriu que durante o crescimento celular ocorre a biossíntese da enzima periplasmática, sendo que nas fases finais de crescimento e envelhecimento celular ocorrem mudanças estruturais nas proteínas, o que explicaria a queda na atividade de glicosiltransferase.

Tabela 3.3. Temperatura e tempo de fermentação para produção de glicosiltransferase.

Trabalho (autoria e data)	<i>Microorganismo</i>	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Tempo</i> (horas)
McAllister et al. (1990)	<i>Serratia plymuthica</i>	30°C	24 horas
Tsuyki et al. (1992)	<i>Klebsiella planticola</i>	30°C	16,5 horas
Uekane (1993)	<i>Klebsiella sp.</i>	30°C	24 horas
Egerer (1994)	<i>Protaminobacter rubrum</i>	30°C	8 horas
Huang et al (1998)	<i>Klebsiella planticola</i>	30°C	16-18 horas
Véronèse/ Perlot (1999)	<i>Serratia plymuthica</i>	30°C	20 horas
Heikkila et al. (2000)	<i>Protaminobacter rubrum</i>	30°C	24 horas
Orsi (2004)	<i>Klebsiella sp.</i>	28-30°C	8 horas
Moraes et al. (2005)	<i>Erwinia sp.</i>	30°C	8 horas
Kawaguti et al. (2006)	<i>Erwinia sp.</i>	24-26°C	10 horas

CONCLUSÕES

Neste estudo foi obtida maior atividade de glicosiltransferase na fermentação pela bactéria *Serratia plymuthica* nas temperaturas de 26°C e 28°C do que na temperatura de 30°C. Também foi observada maior atividade de glicosiltransferase utilizando-se o meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®) do que o meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®). Após 6 horas de fermentação do meio de cultivo 1 nas temperaturas de 26°C, 28°C e 30°C foram obtidos, respectivamente, 25,97 UA/mL, 26,65 UA/mL e 16,72 UA/mL. Na fermentação do meio de cultivo 2, após 12 horas de cultivo a 26°C, 28°C e 30°C, foram obtidos 22,75 UA/mL, 23,30 UA/mL e 16,08 UA/mL. Após 24 horas de fermentação observou-se queda menos acentuada da atividade enzimática na temperatura de 26°C do que na temperatura de 28°C. A temperatura ótima da fermentação pela bactéria *Serratia plymuthica* foi de 26°C, na qual foi obtida atividade de glicosiltransferase média de 24,36 UA/mL no período de 6-12 horas e maior estabilidade enzimática no decorrer da fermentação (valor médio de 21,75 UA/mL após 24 horas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SILVA, S. S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 339-345, 2001.
2. EREGER, P. Downstream processing of sucrose 6-glucosylmutase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 36, p. 65-77, 1994.
3. 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.
4. 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.
5. KAWAGUTI, Y. H. **Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2006. 166p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
6. KAWAGUTI, Y. H; 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.
7. KAWAGUTI, Y. H. **Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2003. 145p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
8. MALLETE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. **Methods in Microbiology**, v. 1, p. 522-566, 1969.

9. MCALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E.; FOGARTY, W. M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 667-672, 1990.
10. 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, p. 95-102, 2005.
11. MORAES, A. L. L. **Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp. D12 imobilizada com alginato de cálcio**. Campinas, 2002. 95p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
12. ORSI, D. C. **Produção de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. 18 e otimização do processo de conversão de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2004. 72p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
13. SCHIWECK, H., STEINLE, G., MULLER, L., GAU, W., MUNIR, M. **Glucopyranosideo-1,6-mannitol, a process for producing the same and its use as a sugar substitute**, US Patent 4,233.439, 1980.
14. SOMOGY-NELSON, M.; A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 1062-1063, 1960.
15. TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T. e NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 483-490, 1992.
16. UEKANE, R. T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1993. 63 p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

17. 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.
18. ZHENG, M.; DU, G.; GUO, W.; CHEN, J. A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochemistry*, v.36, p.525-532, 2001.

CAPÍTULO 4: ESTUDO DA CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE UTILIZANDO-SE CÉLULAS LIVRES DA BACTÉRIA *SERRATIA PLYMUTHICA*

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®) e em meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®).

Num estudo preliminar foram testados os efeitos da concentração de substrato sacarose (25-45%, p/v), da temperatura (27-35°C), da concentração de massa celular úmida (8 e 16%, p/v) e do pH (5,0-7,0) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Serratia plymuthica* nos tempos de reação de 10-70 minutos. A maior conversão de sacarose em isomaltulose (média de 72,10%) ocorreu após 70 minutos de reação, utilizando-se concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e concentração de substrato sacarose de 25% (p/v), nas temperaturas de 27°C e 30°C.

No estudo do efeito do tempo de incubação (10-120 minutos) na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando-se células livres cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) na concentração de 16% (p/v) e concentração de substrato sacarose de 25% (p/v), toda a sacarose foi convertida sendo obtido 76,41% de isomaltulose, 11,21% de trealulose e 12,38% de frutose após 120 minutos de reação a 27°C.

A influência da temperatura (27-45°C), da concentração de massa celular úmida (10-30%, p/v) e da concentração de substrato (15-35% p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* foi avaliada através de planejamento experimental e análise de superfície de resposta. Utilizando-se concentração de massa celular úmida de 20% (p/v) e concentração de solução de sacarose de 25% (p/v) foi obtida alta conversão de sacarose em isomaltulose (média de 84,33%) após 2 horas de reação a 27°C.

No estudo da estabilidade enzimática das células livres de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®), verificou-se que a conversão de sacarose em isomaltulose manteve-se alta (em torno de 79,77%) até a quinta reciclagem das células, sendo que na nona batelada foi obtida conversão de 55,60% de isomaltulose.

INTRODUÇÃO

A conversão enzimática de substrato para produto pode ser feita através do uso de enzima livre, célula livre e célula imobilizada. Poucos trabalhos relatam o uso de células livres para produção de isomaltulose (Schiweck et al. ¹⁵, Heikkila et al. ⁶, Kawaguti ⁸). Na maioria dos trabalhos os autores relatam a conversão de sacarose em isomaltulose com o uso de células imobilizadas (Bucke et al. ¹, Cheetham et al. ², Cheetham ³, Hashimoto et al. ⁵, Kawaguti et al. ⁹, Lantero ¹¹, Moraes et al. ¹², Sarkki et al. ¹⁴, Shimizu et al. ¹⁶, Tsuyuki ¹⁸).

Schiweck et al. ¹⁵ utilizaram células livres de *Protaminobacter rubrum* e *Serratia plymuthica* para produzir isomaltulose a partir de sacarose. O meio de cultivo fermentado (2 litros) contendo as bactérias foi adicionado em solução composta por 4 Kg de sacarose e 16 Kg de água. Após 12 horas de reação foram obtidos valores de isomaltulose acima de 90%. A massa celular foi reutilizada por aproximadamente seis vezes e foi obtido rendimento final de 900 g de isomaltulose.

Heikkila et al. ⁶ descreveram a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres da bactéria *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77. Foram feitos dois experimentos para a conversão de sacarose em isomaltulose, sendo que, no primeiro experimento o substrato utilizado foi melão de beterraba e no segundo experimento o substrato utilizado foi solução de sacarose pura. O meio de cultivo fermentado (2,6 litros) contendo as células de *Protaminobacter rubrum* foi adicionado em 7 litros de solução de melão de beterraba (200 g/L de sacarose). O mesmo experimento foi realizado com solução de sacarose (350 g/L de sacarose). Após 13 horas de reação, e conversão total da sacarose, foram obtidos 81,9% de isomaltulose no experimento com substrato melão de beterraba e 85,9% de isomaltulose no experimento com substrato sacarose. Nesse mesmo trabalho Heikkila et al. ⁶ estudaram a produção de isomaltulose a partir de sacarose, utilizando células livres da bactéria *Protaminobacter rubrum*, em escala maior. Após a fermentação, o meio (1100 litros) contendo bactérias foi adicionado em solução contendo

4800 Kg de melaço de beterraba (60% de sacarose em base seca diluída para uma concentração de 370 g/L de sólidos totais em base seca). Após 25 horas de reação a 30°C, a sacarose do melaço de beterraba foi convertida em 82,0% de isomaltulose, 8,8% de trealulose, 3,3% de frutose, 2,0% de glicose e 3,9% de oligossacarídeos.

Kawaguti ⁸ estudou a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres de *Erwinia* sp. D12 em escala piloto. Após a fermentação, 120 litros de meio de cultivo foram centrifugados para separação da massa celular. Foram obtidos cerca de 2,6 kg de massa celular úmida. A produção de isomaltulose foi realizada na temperatura de 35°C, utilizando-se concentração de massa celular úmida de 10% (p/v) e concentração de substrato sacarose de 35% (p/v). Foram obtidos cerca de 114 litros de xarope, sendo toda a sacarose convertida em 63,4% de isomaltulose, 34,33% de outro açúcar (provavelmente trealulose) e 2,3% de glicose e frutose.

Neste trabalho foi estudado o uso de células livres da bactéria *Serratia plymuthica* para produção de isomaltulose a partir de sacarose como método alternativo ao uso de células imobilizadas. Os parâmetros do processo foram otimizados através de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. Também foi testada a estabilidade das células livres na conversão de sacarose em isomaltulose no processo de batelada.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de massa celular da bactéria *Serratia plymuthica*

A fermentação com bactéria *Serratia plymuthica*, para obtenção de massa celular, foi feita em fermentador de 6,6 L Bioflow IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) contendo 3L de meio de cultivo. Foram utilizados o meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]) e o meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura). A fermentação foi feita a 26°C, durante 6 horas para o meio de cultivo 1 e durante 12 horas para o meio de cultivo 2, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm. A massa celular foi removida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C e lavada com água destilada.

Influência da concentração de substrato, da concentração de massa celular, da temperatura e do pH na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres, nos tempos de reação de 10-70 minutos

Verificou-se a influência da concentração de substrato sacarose (25-45%, p/v), da concentração de massa celular úmida (8 e 16%, p/v), da temperatura (27-35°C) e do pH da solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,005 M (pH 5,0 a 7,0) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*. Para se obter concentração de massa celular úmida de 16% (p/v), uma amostra de 4 g de massa celular úmida foi suspensa em 25 mL de solução sacarose e para se obter concentração de massa celular úmida de 8% (p/v), uma amostra de 2 g de massa celular úmida foi suspensa em 25 mL de solução sacarose. Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL incubados em banho-maria com agitação de 180 rpm. Alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada 10 minutos, nos tempos de reação de 10 a 70 minutos. As amostras foram centrifugadas para separação da massa celular e posteriormente os carboidratos no sobrenadante foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Efeito do tempo de incubação das células livres na conversão de sacarose em isomaltulose

O efeito do tempo de incubação (10 a 120 minutos) das células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na conversão de sacarose em isomaltulose foi testado utilizando-se massa celular obtida na fermentação do meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás[®]), temperatura de 27°C, concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e concentração de substrato sacarose de 25% (p/v). O ensaio foi feito em frasco Erlenmeyer de 250 mL incubado em banho-maria com agitação de 180 rpm. Para se obter concentração de massa celular úmida de 16% (p/v), uma amostra de 4 g de massa celular úmida foi suspensa em 25 mL de solução de sacarose 25%. Alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada 10 minutos, nos tempos de reação de 10 a 120 minutos. As amostras foram centrifugadas para separação da massa celular e posteriormente os carboidratos no sobrenadante foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres

Foi realizado um planejamento fatorial composto central 2^3 para o estudo dos efeitos da temperatura, da concentração de massa celular e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica*. A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional Statística[®], versão 5.0 (Statsoft[®], 1995)¹⁷. Essa análise incluiu o teste Fisher (F-test) e o coeficiente de determinação (R^2). As combinações ótimas do processo foram estimadas pelas curvas de contorno e superfícies de resposta.

A Tabela 4.1 mostra as variáveis independentes e os valores decodificados do planejamento experimental para otimização da produção de isomaltulose por células livres de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás[®]) e em meio de cultivo 2 (sem adição de

peptona bacteriológica da Biobrás®). Os valores das variáveis testadas foram: temperatura (27-45°C), massa celular úmida (10-30%, p/v) e solução de sacarose (15-35% p/v).

Tabela 4.1. Valores decodificados do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*.

Variável	Valor				
	$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
Temperatura (°C)	27	30	35	40	45
Massa celular (%)	10	15	20	25	30
Solução sacarose (%)	15	20	25	30	35

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL incubados em banho-maria com agitação de 180 rpm. Para se obter concentração de massa celular úmida de 10% (p/v), uma amostra de 2 g de massa celular úmida foi suspensa em 20 mL de solução sacarose e para se obter concentração de massa celular úmida de 30% (p/v), uma amostra de 6 g de massa celular úmida foi suspensa em 20 mL de solução de sacarose. Alíquotas de 1 mL foram coletadas após 2 horas de reação. As amostras foram centrifugadas para separação da massa celular e posteriormente os carboidratos no sobrenadante foram analisados em cromatógrafo Dionex®.

Estabilidade das células livres na conversão de sacarose em isomaltulose no processo de batelada

A produção de isomaltulose a partir de sacarose com reutilização das células livres no processo de batelada foi realizada na temperatura de 27°C, utilizando-se massa celular obtida pela fermentação do meio de cultivo otimizado 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás), concentração de massa celular úmida de 20% (p/v) e concentração de substrato sacarose de 25% (p/v). Os ensaios foram feitos em frascos Erlenmeyers de 250 mL incubados em banho-maria com agitação de 180 rpm. Após 2 horas de reação a massa celular foi separada da solução de sacarose por centrifugação e as células foram novamente misturadas com solução sacarose 25% (p/v). As células foram reutilizadas várias vezes, sendo realizado 9 ciclos de reciclagem durante o processo. Posteriormente, a isomaltulose e os demais açúcares formados pela conversão enzimática da sacarose foram quantificados em cromatógrafo Dionex[®].

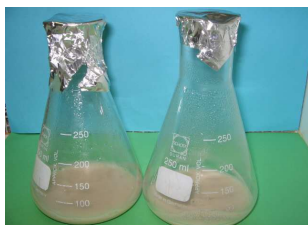
Análise de carboidratos

A análise dos carboidratos foi realizada em cromatógrafo Dionex[®] DX 600 equipado com bomba isocrática IP25, coluna de guarda carbo Pac PA1TM (4 mm X 500 mm), coluna carbo Pac PA1TM (4 mm X 270 mm) e detector eletroquímico ED50. A fase móvel utilizada foi solução de hidróxido de sódio 250 mM, com fluxo de 1 mL/minuto a 20°C. As amostras foram analisadas por comparação do tempo de retenção dos padrões de sacarose, isomaltulose, glicose e frutose.

A Figura 4.1 ilustra os passos da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*.



(1) Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para obtenção de massa celular



(2) Ensaio com células livres e substrato sacarose em banho-maria com agitação



(3) Análise dos carboidratos em cromatógrafo Dionex®

Figura 4.1. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *Serratia plymuthica*: (1) Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para obtenção da massa celular, (2) Ensaio com células livres e substrato sacarose em banho-maria com agitação, (3) Análise dos carboidratos em cromatógrafo Dionex®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da concentração de substrato sacarose (25-45%), da concentração de massa celular úmida (8 e 16%), da temperatura (27-35°C) e do pH (5,0-7,0) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*

A Tabela 4.2 e a Figura 4.2 ilustram a conversão de sacarose em isomaltulose a 30°C pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®), utilizando-se concentração de massa celular úmida 16% (p/v) e concentrações de solução de sacarose 25%, 35% e 45% (p/v), no período de 10 a 70 minutos. Observou-se maior conversão de sacarose em isomaltulose quanto maior o tempo de incubação, sendo obtido 56,69%, 52,79% e 52,74% de isomaltulose nas concentrações de 25%, 35% e 45% de solução de sacarose, respectivamente, após 70 minutos de reação.

Tabela 4.2. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®), utilizando concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e concentração de substrato sacarose 25%, 35% e 45% (p/v), nos tempos de reação de 10-70 minutos a 30°C.

Tempo (min.)	Sacarose 25%			Sacarose 35%			Sacarose 45%		
	Glicose e frutose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)	Glicose e frutose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)	Glicose e frutose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
10	12,62	66,72	20,66	0	81,59	18,40	9,56	71,16	19,28
20	15,13	54,05	30,82	0	69,82	30,18	13,17	57,63	29,20
30	19,78	40,35	39,87	16,05	48,17	35,78	15,90	47,50	36,60
50	24,08	24,47	51,45	21,51	32,84	45,65	21,15	32,60	46,25
60	27,47	17,48	55,05	24,69	26,11	49,20	23,38	25,52	51,10
70	28,43	14,88	56,69	26,67	20,54	52,79	24,67	22,59	52,74

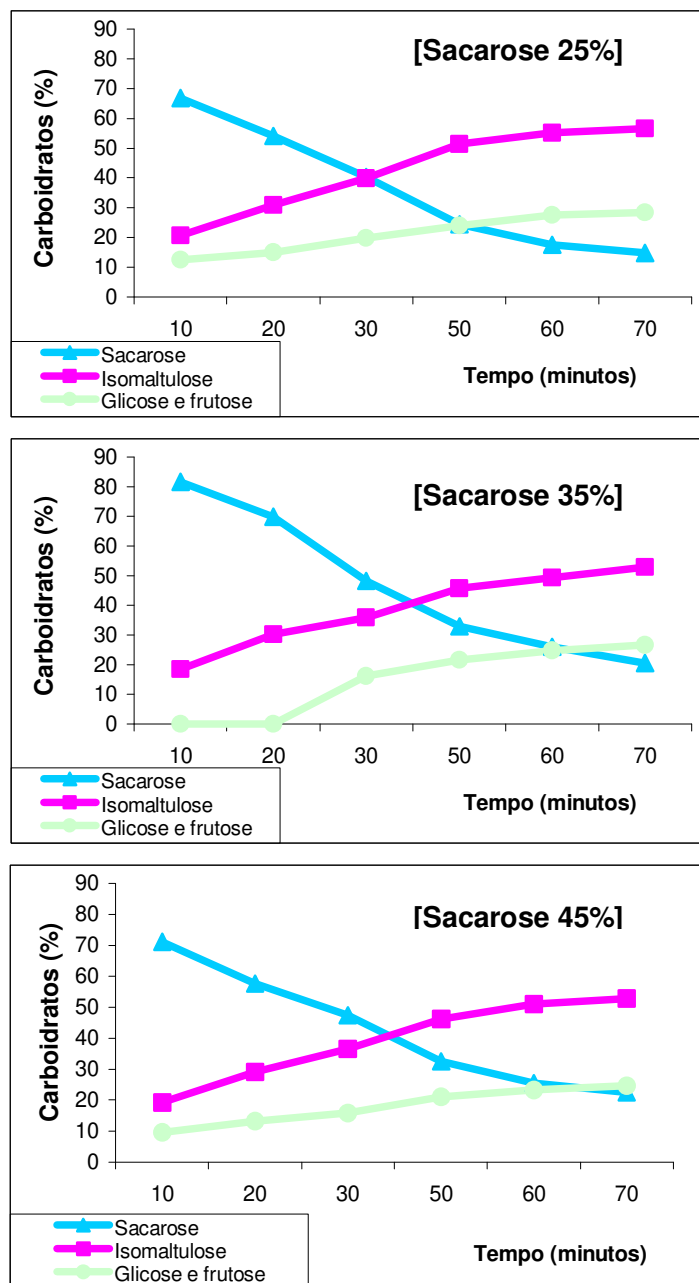
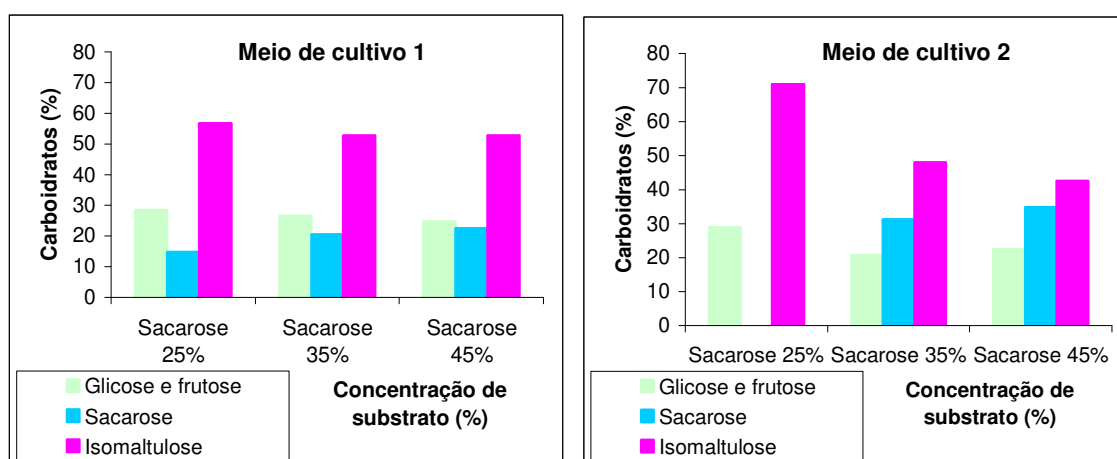


Figura 4.2. Efeito da concentração de substrato (25%, 35% e 45%) e do tempo de reação (10 a 70 minutos) na conversão de sacarose em isomaltulose a 30°C, utilizando-se células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®) na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v).

A Figura 4.3 ilustra a influência da concentração de substrato (25%, 35% e 45%, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) e em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®), após 70 minutos de reação a 30°C. O maior rendimento de isomaltulose, 71,03%, foi obtido utilizando-se concentração de solução de sacarose 25% e massa celular cultivada em meio de cultivo 2. Utilizando-se sacarose nas concentrações de 35% e 45% foram obtidos, respectivamente, 48,01% e 42,63% de isomaltulose. Nos ensaios em que se utilizou massa celular produzida em meio de cultivo 1 e concentrações 25%, 35% e 45% de sacarose a conversão de isomaltulose foi, respectivamente, de 56,69%, 52,79% e 52,74%.

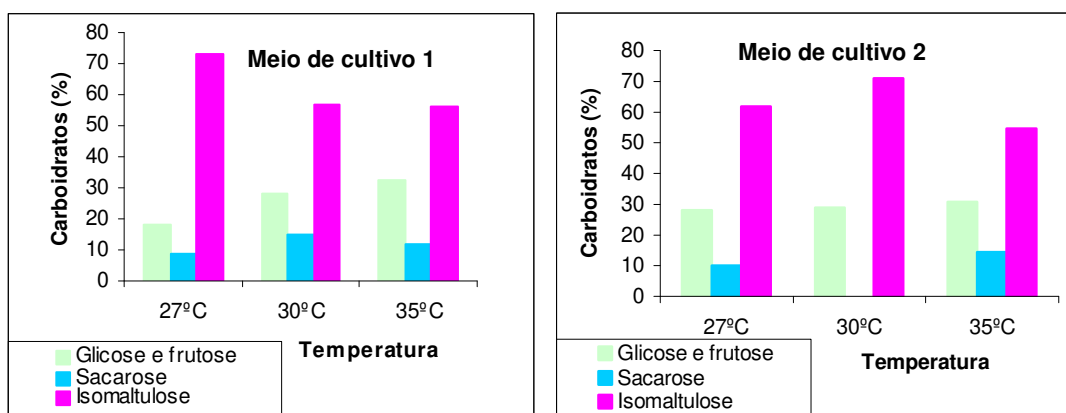


Meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®)

Meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®)

Figura 4.3. Influência da concentração de substrato (25%, 35% e 45%) na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e tempo de incubação de 70 minutos a 30°C.

A Figura 4.4 ilustra a influência da temperatura (27°C, 30°C e 35°C) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) e em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®) após 70 minutos de reação. Observou-se menor hidrólise da sacarose em glicose e frutose a 27°C do que a 30°C e 35°C. No ensaio realizado com massa celular cultivada em meio de cultivo 1 foi obtido 18,00% de glicose e frutose, enquanto nas incubações a 30°C e 35°C foram obtidos, respectivamente, 28,43% e 32,68% de glicose e frutose. A maior conversão de sacarose em isomaltulose (73,16%) foi obtida na temperatura de 27°C, utilizando-se células cultivadas em meio de cultivo 1. Nas temperaturas de 30°C e 35°C foram obtidos 56,69% e 49,67% de isomaltulose. Nos ensaios em que se utilizou massa celular cultivada em meio de cultivo 2 e temperaturas de 27°C, 30°C e 35°C a conversão de sacarose em isomaltulose foi, respectivamente, de 61,87%, 71,03% e 54,67%.

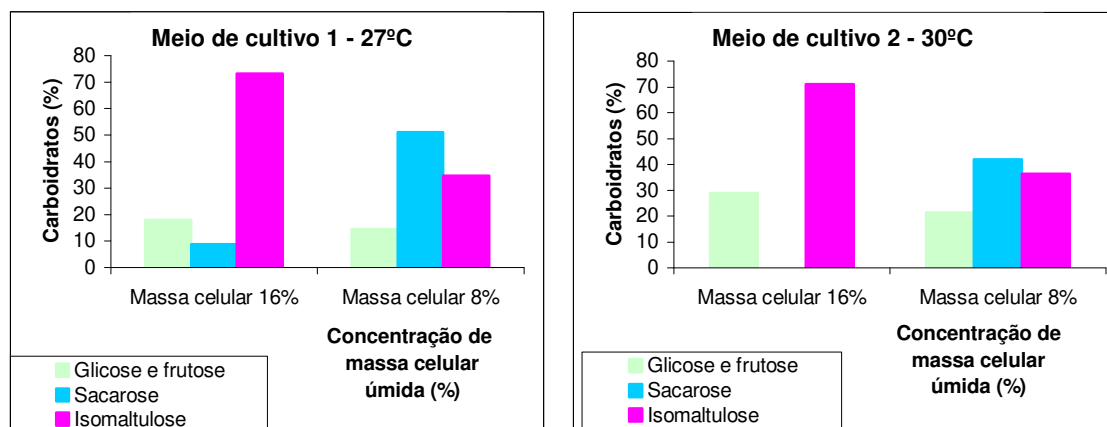


Meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®)

Meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®)

Figura 4.4. Influência da temperatura (27°C, 30°C e 35°C) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e tempo de incubação de 70 minutos.

A Figura 4.5 ilustra a influência da concentração de massa celular úmida (16% e 8%, p/v) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás[®]) e em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]), após 70 minutos de reação a 27°C e 30°C. Foi obtida maior conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se concentração de massa celular 16% do que concentração de massa celular 8%. Nos ensaios realizados com células livres cultivadas em meio de cultivo 1 foi obtida conversão de 73,16% de isomaltulose na concentração de massa celular 16%, enquanto na concentração de massa celular 8% foi obtida conversão de 34,78% de isomaltulose. Utilizando-se células livres cultivadas em meio de cultivo 2 foi obtida conversão de 71,16% de isomaltulose na concentração celular de 16% e 38,49% de isomaltulose na concentração celular de 8%.

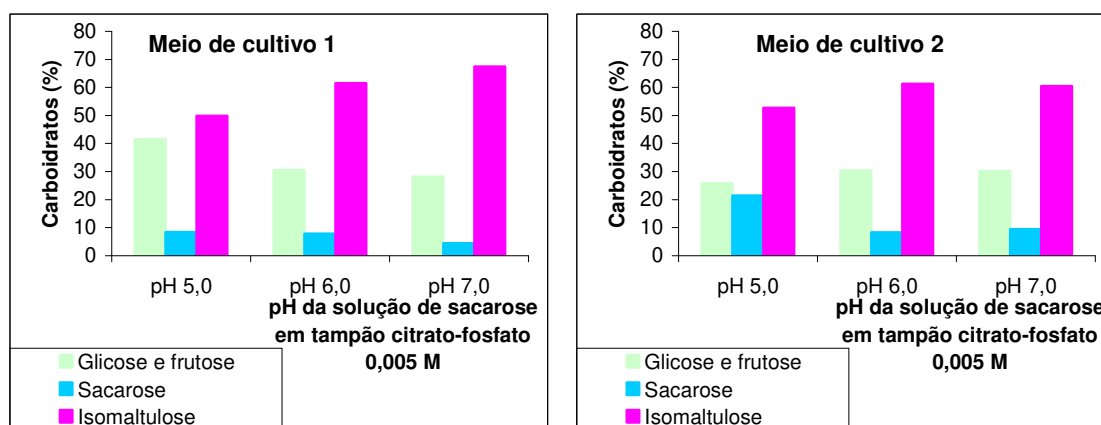


Meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®])

Meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®])

Figura 4.5. Influência da concentração de massa celular úmida (8% e 16%) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* após 70 minutos de incubação a 27°C e 30°C.

A Figura 4.6 ilustra a influência do pH na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* produzidas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás[®]) e em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]), após 70 minutos de reação a 27°C. Verificou-se que a faixa de pH ótimo da glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* para conversão de sacarose em isomaltulose situou-se entre 6,0 e 7,0. Nos ensaios realizados com massa celular obtida com o meio de cultivo 1 a maior conversão de sacarose em isomaltulose, 67,43%, ocorreu em pH 7,0. Nos experimentos em que se utilizou massa celular produzida com o meio de cultivo 2 a maior conversão de sacarose em isomaltulose, 61,37%, ocorreu em pH 6,0.



Meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®])

Meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®])

Figura 4.6. Influência do pH (5,0, 6,0 e 7,0) na conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose, utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e tempo de incubação de 70 minutos a 27°C.

A Tabela 4.3 apresenta a conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* utilizando-se solução 25% (p/v) de sacarose em água, em tampão citrato-fosfato 0,005 M pH 6,0 e 7,0 e concentração de massa celular úmida de 16% (p/v), após 70 minutos de reação a 27°C. Foi obtida maior conversão de sacarose em isomaltulose (73,16%) com massa celular cultivada em meio de cultivo 1 e solução aquosa de sacarose do que com solução de sacarose em tampão citrato-fosfato pH 6,0 ou 7,0.

Tabela 4.3. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v) e solução de sacarose 25% (p/v) em água, em tampão citrato-fosfato 0,005 M pH 6,0 e em tampão citrato-fosfato 0,005 M pH 7,0, após 70 minutos de incubação a 27°C.

Meio de cultivo	Solução de sacarose em água			Solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,005 M, pH 6,0			Solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,005 M, pH 7,0		
	Glicose e frutose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)	Glicose e frutose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)	Glicose e frutose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
1	18,00	8,84	73,16	30,52	7,88	61,60	28,18	4,39	67,43
2	28,01	10,12	61,87	30,31	8,32	61,37	30,16	9,44	60,40

Meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®)
Meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás®)

Véronèse et al.¹⁹ estudaram a produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando glicosiltransferase purificada de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 e verificaram que a enzima apresentou atividade ótima em pH 6,2. A produção máxima de isomaltulose foi verificada a 30°C. O aumento da temperatura de 15°C para 30°C resultou em maior produção de glicose e frutose, sendo que a produção máxima desses açúcares ocorreu na temperatura de 45°C.

Efeito do tempo de incubação das células livres da bactéria *Serratia plymuthica* na conversão de sacarose em isomaltulose

A Tabela 4.4 e a Figura 4.7 ilustram a influência do tempo de incubação (10-120 minutos) das células livres da bactéria *Serratia plymuthica* para a conversão de solução 25% (p/v) de sacarose em isomaltulose, utilizando células cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) na concentração de massa celular úmida de 16% (p/v), a 27°C.

Tabela 4.4. Efeito do tempo de incubação (10 a 120 minutos) na conversão de solução 25% (p/v) de sacarose em isomaltulose e outros açúcares por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*.

Tempo (minutos)	Glicose (%)	Frutose (%)	Trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
10	5,56	4,72	0,68	61,61	27,43
20	7,71	6,73	0,70	49,53	35,33
30	8,63	7,45	0,98	36,72	46,22
50	9,95	8,85	1,83	20,73	58,64
60	9,23	9,68	2,00	14,64	64,45
70	4,24	11,65	2,10	8,84	73,16
80	6,20	10,87	9,91	2,02	71,00
90	5,36	10,92	10,60	0	73,12
100	0	11,61	11,40	0	76,99
110	0	11,66	11,56	0	76,78
120	0	12,38	11,21	0	76,41

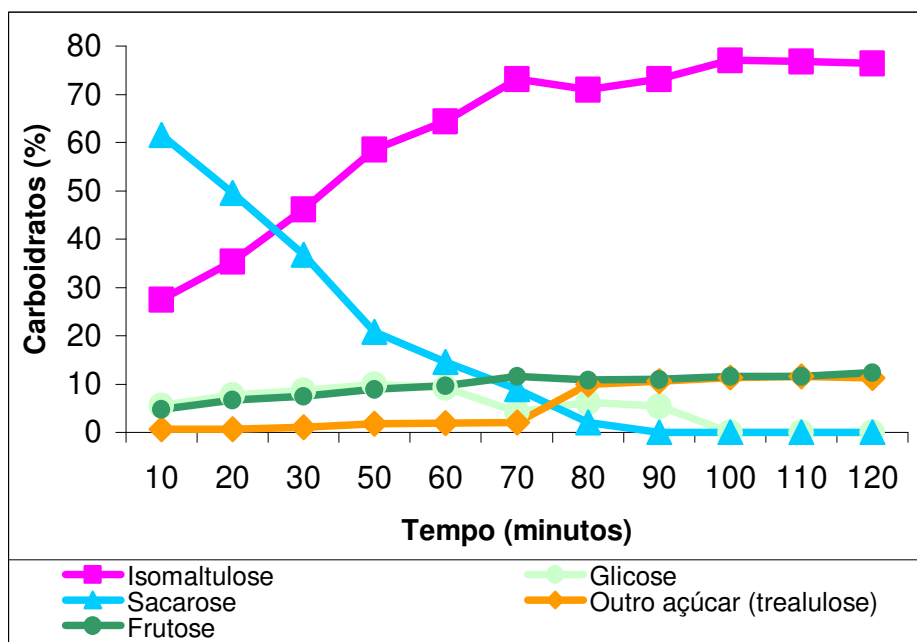


Figura 4.7. Conversão de solução de sacarose 25% (p/v) em isomaltulose e outros açúcares, utilizando células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®), nos tempos de reação de 10 a 120 minutos a 27°C.

Após 90 minutos de reação a sacarose foi totalmente convertida em 73,12% de isomaltulose, 5,36% de glicose, 10,92% de frutose e 10,60% de um açúcar não identificado (provavelmente trealulose). Observou-se que até 70 minutos de reação a concentração de trealulose foi menor que 2,10% e após 80 minutos essa concentração aumentou para 9,91%. Foi obtida maior conversão de sacarose em isomaltulose (76,99%) após 100 minutos de reação, e também houve formação de 11,61% de frutose e 11,40% de trealulose, não sendo detectada a presença de glicose e sacarose. Após 120 minutos de reação foram obtidos 76,41% de isomaltulose, 12,38% de frutose e 11,21% de trealulose.

A trealulose padrão não está disponível comercialmente. De acordo com a literatura, a maioria dos microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem sacarose em isomaltulose, também produz trealulose (*O*- α -D-glicopiranosil-1,1-D-frutose)

em menor quantidade e traços de glicose e frutose. As linhagens *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 (Sarkki et al. ¹⁴), *Erwinia rhapontici* NCPPB 1579 (Cheetham ³), *Serratia plymuthica* NCIB 8285 (Fujii et al. ⁴), *Klebsiella planticola* CCRC 19112 (Huang et al. ⁷) produzem principalmente isomaltulose (75-85%), trealulose (14-16%) e pequena quantidade de glicose (2-6%) e frutose (2-3%).

Véronèse et al. ¹⁹ obtiveram conversão total de solução de sacarose 292 mM em 72,6% de isomaltulose, 6,6% de trealulose, 10,1% de frutose e 10,1% de glicose, utilizando glicosiltransferase purificada de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, após 5 horas de reação a 30°C. No trabalho de Krastanov et al. ¹⁰ 1 g de células úmidas de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 foi misturada com uma amostra de 10 mL de solução de sacarose 40% em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 37°C. Após 2 horas de reação, praticamente toda a sacarose foi convertida em 79,9% de isomaltulose, 7,0% de trealulose, 5,84% de frutose, 2,90% de glicose e 2,79% de outros açúcares.

Influência da temperatura (27-45°C), da concentração de massa celular úmida (10-30 %, p/v) e da concentração de solução de sacarose (15-35 % p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®)

A Tabela 4.5 ilustra os resultados experimentais do planejamento fatorial composto central 2³ para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1. Após 2 horas de reação, foi verificada maior conversão de sacarose em isomaltulose nos experimentos 1 (85,23%), 3 (84,52%) e 9 (85,02%), utilizando concentrações de solução de sacarose entre 20% e 25% e temperaturas entre 27°C e 30°C. Nos experimentos 15, 16 e 17 (repetições do ponto central) o valor médio de conversão de sacarose em isomaltulose foi de 83,44%, utilizando-se massa celular 20%, solução de sacarose 25% e temperatura de 35°C.

Tabela 4.5. Resultados do planejamento experimental para estudo dos efeitos da temperatura, da concentração de massa celular e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®).

Ensaio	Temperatura (°C)	Massa celular (%)	Solução sacarose (%)	Valores experimentais (% de conversão de sacarose em isomaltulose)
1	-1	-1	-1	85,23
2	+1	-1	-1	50,09
3	-1	+1	-1	84,52
4	+1	+1	-1	60,97
5	-1	-1	+1	76,49
6	+1	-1	+1	71,50
7	-1	+1	+1	77,45
8	+1	+1	+1	78,09
9	- α	0	0	85,02
10	+ α	0	0	29,01
11	0	- α	0	75,02
12	0	+ α	0	81,35
13	0	0	- α	82,08
14	0	0	+ α	78,46
15	0	0	0	83,41
16	0	0	0	83,45
17	0	0	0	83,46

A Tabela 4.6 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1. A análise estatística do modelo foi feita pelo teste Fischer (F-test), obtido por ANOVA e os resultados foram expressos na Tabela 4.7. O valor-F experimental foi 2,12 vezes maior do que o valor F-tabelado, isso mostra que o modelo é estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança ($p < 0,05$). A adequação do modelo foi obtida com excelente coeficiente de determinação ($R^2 = 0,93$). O erro puro foi muito baixo (0,001), indicando ótima reprodutibilidade do modelo obtido.

Tabela 4.6. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média *	83,30	0,01	83,24	83,37
(1) Temperatura (L) *	-11,51	0,00	-11,54	-11,48
Temperatura (Q) *	-8,93	0,00	-8,96	-8,89
(2) Massa celular (L) *	2,08	0,00	2,04	2,10
Massa celular (Q) *	-1,43	0,00	-1,46	-1,39
(3) Solução sacarose (L) *	1,22	0,00	1,18	1,25
Solução sacarose(Q) *	-0,69	0,00	-0,72	-0,65
1LX2L *	2,15	0,00	2,11	2,19
1LX3L *	6,79	0,00	6,75	6,83
2LX3L *	-0,33	0,00	-0,36	-0,28

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 4.7. Análise de variância do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	3245,69	9	360,63	7,81
Resíduos	323,37	7	46,19	
Falta de ajuste	323,37	5		
Erro puro	0,00	2		
Total	3569,06	16		

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,93$, Valor-F tabelado: $F_{0,95;9;7} = 3,68$

Após a análise de variância para validação dos parâmetros estudados, foi possível obter a equação 1, que representa o modelo codificado:

$$Y = 83,30 - 11,51.X_1 + 2,08.X_2 + 1,22.X_3 - 8,93.X_1^2 - 1,43.X_2^2 - 0,69.X_3^2 + 2,15.X_1.X_2 + 6,79.X_1.X_3 - 0,33.X_2.X_3 \quad (\text{equação 1})$$

onde Y é a porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose, X_1 é a temperatura, X_2 é a concentração de massa celular e X_3 é a concentração de solução sacarose.

A Figura 4.8 ilustra as curvas de contorno e superfícies de resposta com os efeitos da temperatura, da concentração de massa celular úmida e da concentração substrato na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* produzidas em meio de cultivo 1.

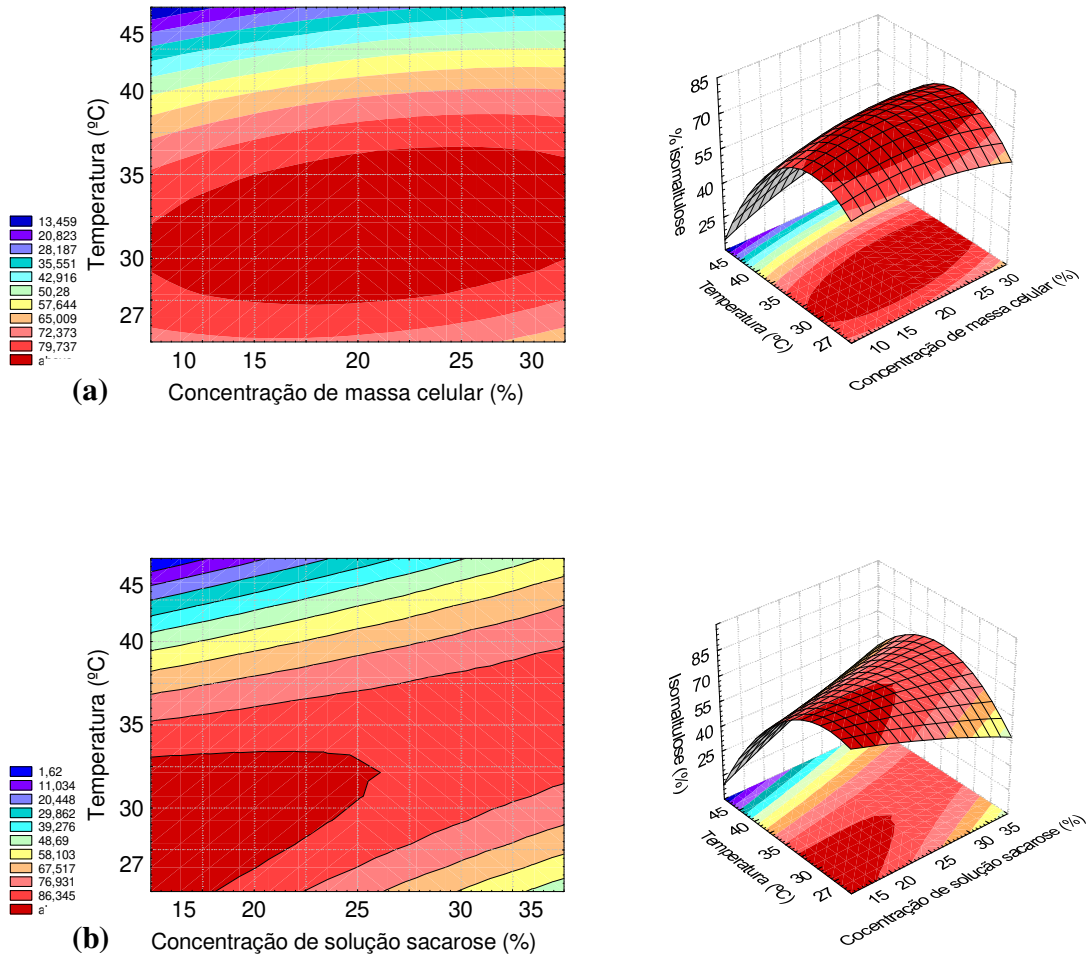


Figura 4.8: Curvas de contorno e superfícies de resposta da conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* produzidas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®), em função: (a) da concentração de massa celular úmida e da temperatura e (b) da concentração de solução de sacarose e da temperatura.

Influência da temperatura (27-45°C), da concentração de massa celular úmida (10-30 %, p/v) e da concentração de solução de sacarose (15-35 % p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)

A Tabela 4.8 ilustra os resultados experimentais do planejamento fatorial composto central 2³ para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* produzidas em meio de cultivo 2. Após 2 horas de reação, os maiores valores de conversão de sacarose em isomaltulose foram obtidos nos experimentos 1 (85,42%), 3 (86,74%) e 9 (83,64%), da mesma forma que nos ensaios do planejamento experimental com células livres cultivadas em meio de cultivo 1. Nos experimentos 15, 16 e 17 (repetições do ponto central), observou-se valor médio de conversão de sacarose em isomaltulose de 81,89%.

Tabela 4.8. Resultados do planejamento experimental para estudo dos efeitos da temperatura, da concentração de massa celular e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).

Ensaio	Temperatura (°C)	Massa celular (%)	Solução sacarose (%)	Valores experimentais (% de conversão de sacarose em isomaltulose)
1	-1	-1	-1	85,42
2	+1	-1	-1	77,50
3	-1	+1	-1	86,74
4	+1	+1	-1	77,39
5	-1	-1	+1	79,15
6	+1	-1	+1	72,43
7	-1	+1	+1	80,31
8	+1	+1	+1	73,11
9	- α	0	0	83,64
10	+ α	0	0	63,69
11	0	- α	0	76,42
12	0	+ α	0	83,39
13	0	0	- α	81,38
14	0	0	+ α	77,24
15	0	0	0	81,67
16	0	0	0	81,78
17	0	0	0	82,23

A Tabela 4.9 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2. A análise estatística do modelo foi obtida por ANOVA e os resultados foram expressos na Tabela 4.10. Neste planejamento o valor-F experimental foi 6,74 vezes maior do que o valor F-tabelado, indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 80% de nível de confiança ($p < 0,20$). A adequação do modelo foi obtida com um ótimo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,92$).

Tabela 4.9. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -80%	Limite de Confiança +80%
Média *	81,78	0,00	81,46	82,10
(1) Temperatura (L) *	-4,71	0,00	-4,86	-4,55
Temperatura (Q) *	-2,59	0,00	-2,75	-2,42
(2) Massa celular (L) *	1,11	0,00	0,96	1,26
Massa celular (Q) *	-0,29	0,08	-0,45	-0,12
(3) Solução sacarose (L) *	-2,12	0,00	-2,27	-1,97
Solução sacarose(Q) *	-0,54	0,02	-0,71	-0,38
1LX2L *	-0,23	0,15	-0,43	-0,04
1LX3L *	0,41	0,05	0,22	0,61
2LX3L *	0,07	0,53	-0,11	0,27

* parâmetros estatisticamente significativos (80% de confiança)

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 4.10. Análise de variância do planejamento experimental para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	461,73	8	57,72	11,73
Resíduos	39,36	8	4,92	
Falta de ajuste	39,54	5		
Erro puro	0,18	2		
Total	501,45	16		

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,92$, Valor-F tabelado: $F_{0,80;8;8} = 1,74$

Após as análises, foi possível obter a equação 2, que representa o modelo codificado:

$$Y = 81,78 - 4,71.X_1 + 1,11.X_2 - 2,12.X_3 - 2,59.X_1^2 - 0,29.X_2^2 - 0,54.X_3^2 - 0,23.X_1.X_2 + 0,41.X_1.X_3 \quad \text{(equação 2)}$$

onde Y é a porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose, X_1 é a temperatura, X_2 é a concentração de massa celular e X_3 é a concentração de solução sacarose.

A Figura 4.9 ilustra as curvas de contorno e superfícies de resposta com os efeitos da temperatura, da concentração de massa celular úmida e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* produzidas em meio de cultivo 2.

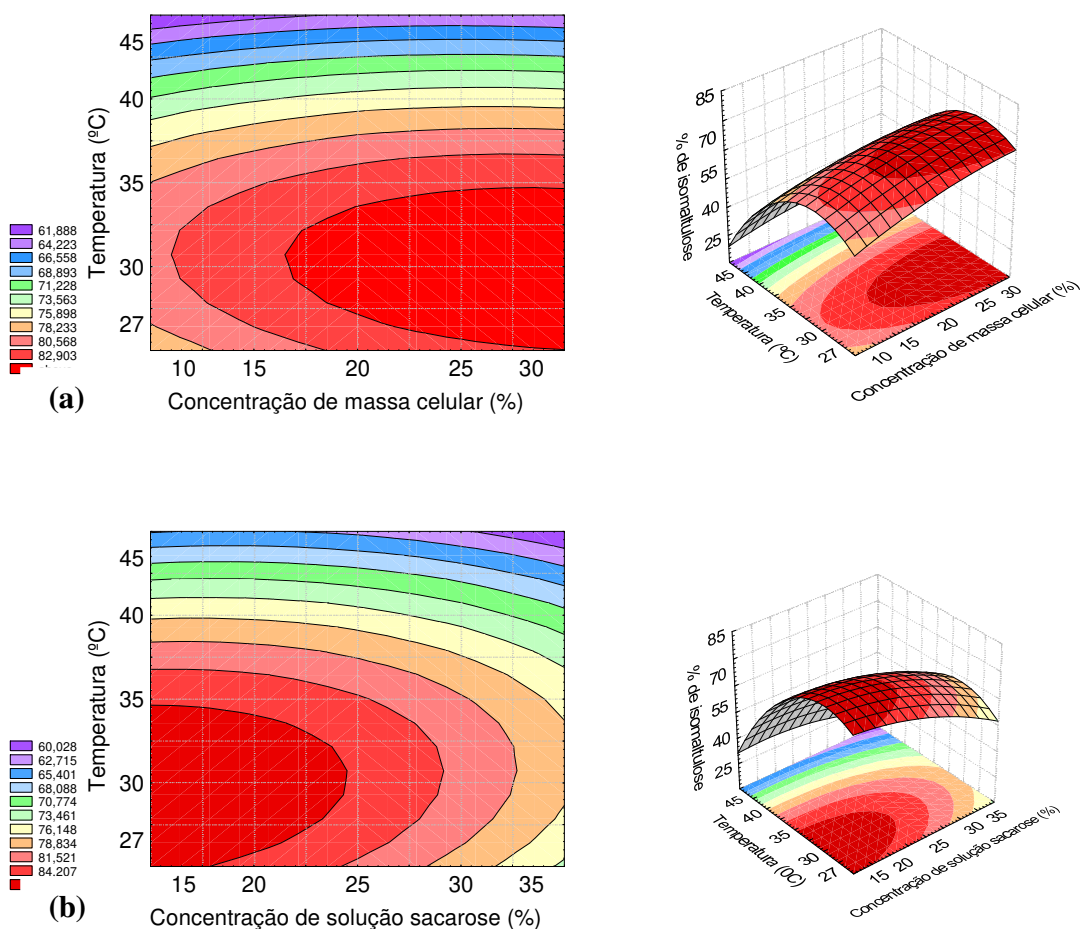


Figura 4.9: Curvas de contorno e superfícies de resposta da conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres da bactéria *Serratia plymuthica* produzidas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) em função: (a) da concentração de massa celular úmida e da temperatura e (b) da concentração de solução de sacarose e da temperatura.

Pôde-se observar, pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 4.8 e Figura 4.9) que a maior conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica* ocorreu nas faixas de temperatura entre 27 e 35°C, concentração de massa celular úmida entre 20 e 30% e concentração de solução de sacarose entre 15 e 25%.

Para a continuidade dos estudos, escolheu-se produzir isomaltulose nas condições do ensaio 9, ou seja, usando a menor temperatura testada (27°C), concentração de massa celular úmida de 20% (p/v) e concentração de solução de sacarose de 25% (p/v), que resultou em alta conversão de sacarose em isomaltulose (média de 84,33%). Escolhendo essas condições espera-se que a conversão de sacarose em isomaltulose mantenha-se alta e estável no decorrer do tempo pelo uso da temperatura mais baixa de 27°C. Já o uso de menor quantidade de massa celular úmida (20% em vez de 30%) implica no uso de menor quantidade de meio de cultivo para sua produção e o uso de uma solução sacarose mais concentrada (25% em vez de 20%) facilita a recuperação da isomaltulose no xarope de açúcares.

Estabilidade enzimática das células livres de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) na conversão de sacarose em isomaltulose no processo de batelada.

A Figura 4.10 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose após 9 bateladas, com reciclagem das células livres de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2. Observou-se que nas quatro primeiras reciclagens houve conversão total de substrato sacarose, com formação média de 80,38% de isomaltulose e 19,63% de glicose, frutose e trealulose. Na quinta reciclagem uma pequena porcentagem de sacarose (3,53%) não foi convertida e houve formação de 77,31% de isomaltulose e 19,13% de glicose, frutose e trealulose. Nas etapas seguintes a produção de isomaltulose declinou lentamente e houve aumento gradativo da quantidade de sacarose não convertida. Na nona reciclagem obteve-se 55,60% de isomaltulose, 15,84% de glicose, frutose e trealulose e 28,54% de sacarose não convertida.

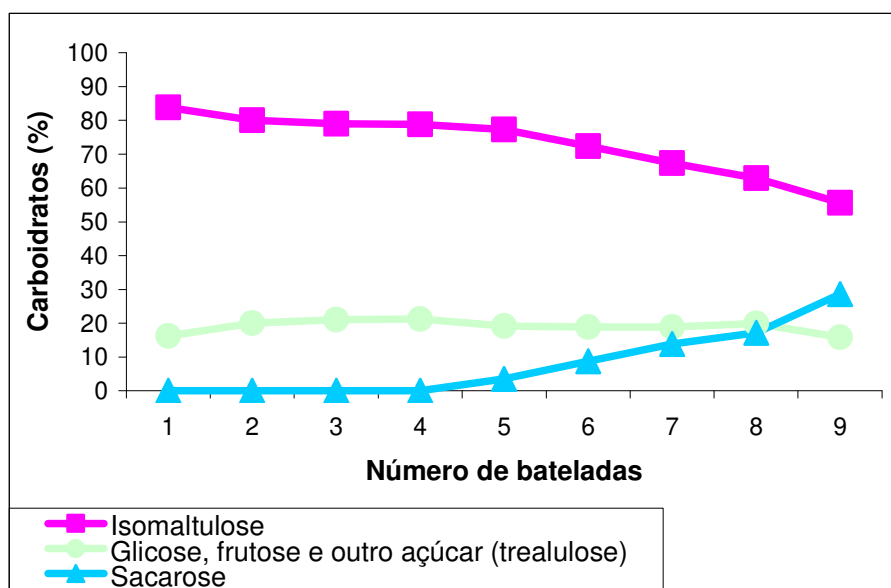


Figura 4.10. Conversão de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose no processo de batelada, utilizando células livres de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®)

Kawaguti ⁸ estudou a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres de *Erwinia* sp. D12 por 20 bateladas consecutivas. A produção de isomaltulose foi realizada na temperatura de 35°C, utilizando-se concentração de massa celular úmida de 10% (p/v) e concentração de substrato sacarose P.A. Synth[®] de 35% (p/v). As amostras de 20 g de massa celular úmida foram suspensas em 200 mL de solução de sacarose 35% (p/v) e incubadas a 35°C durante 15 minutos a 200 rpm. Foram obtidos altos valores de conversão de sacarose em isomaltulose (em torno de 70%) em todas as 20 bateladas realizadas.

CONCLUSÕES

Neste estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres da bactéria *Serratia plymuthica*, utilizando-se concentração de massa celular úmida de 20% (p/v) e concentração de solução de sacarose de 25% (p/v) foi obtido cerca de 84% de isomaltulose após 2 horas de reação a 27°C. No estudo da estabilidade enzimática das células livres de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) a conversão de sacarose em isomaltulose manteve-se em torno de 80% até a quinta batelada e na nona batelada foi obtido mais de 55% de isomaltulose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUCKE, C.; CHEETHAM, P. S. J. **Production of isomaltulose. US Patent 4.670.387**, 1987.
2. CHEETHAM, P. S. J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471-481, 1985.
3. CHEETHAM, P. S. J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. **Biochemistry Journal**, v. 220, p. 213-220, 1984.
4. FUJII, S.; KISHIIHARA, S.; KOMOTO, M.; SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation of *Serratia plymuthica*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 30, p. 339-344, 1983.
5. HASHIMOTO, H.; YAMADA, K.; YOSHIMURA, J. Glucosylation of methyl β -D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 849-854, 1987
6. 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
7. HUANG, J. H.; HSU, L. H.; SU, Y. C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 22-27, 1998.
8. KAWAGUTI, Y. H. **Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2006. 166p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

9. KAWAGUTI, Y. H.; 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.
10. KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 593-598, 2003.
11. LANTERO, O. J. **Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum***. US Patent 82109404.2, 1983.
12. 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, p. 95-102, 2005.
13. PARK, Y. K.; UEKANE, R. T.; SATO, H. H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 131-136, 1996.
14. 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.
15. SCHIWECK, H., STEINLE, G., MULLER, L., GAU, W., MUNIR, M. **Glucopyranosideo-1,6-mannitol, a process for producing the same and its use as a sugar substitute** US Patent 4,233.439, 1980
16. 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.
17. **Statistica**® 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74104, USA).

18. TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 483-490, 1992.
19. 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.

CAPÍTULO 5: CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE POR CÉLULAS DA BACTÉRIA *SERRATIA PLYMUTHICA* IMOBILIZADAS EM ALGINATO

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a produção de isomaltulose a partir de sacarose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio. A conversão de sacarose em isomaltulose foi feita em bioreatores de leito empacotado mantidos a temperatura constante de 25°C, contendo células imobilizadas em alginato Synth[®] 2% e em alginato Sigma[®] 1%. Foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 70% utilizando-se células imobilizadas em alginato Synth[®] 2%, durante 7 dias de operação contínua do bioreator. No estudo do efeito do glutaraldeído na estabilidade enzimática das células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth[®] 2% para conversão de sacarose em isomaltulose, verificou-se que os grânulos tratados com glutaraldeído mostraram maior estabilidade e foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 64% por 15 dias. No bioreator em que se utilizaram células imobilizadas não tratadas com glutaraldeído, no décimo primeiro dia a conversão de sacarose em isomaltulose sofreu rápido declínio e foi obtido em 15 dias somente 38,4% de isomaltulose.

INTRODUÇÃO

Encapsulação é uma das técnicas mais usadas para imobilização celular pois as células imobilizadas em uma matriz ficam protegidas de condições ambientais desfavoráveis. A aplicação de células imobilizadas nos processos bioquímicos oferece muitas vantagens como a facilidade de separar as células do produto para reutilização, operação contínua por longos períodos e muitas vezes aumento na produtividade do reator (Akin ², Park et al. ¹⁴).

As cápsulas podem ser feitas de vários materiais, mas a maioria é formada por alginato, material muito usado por ser de fácil manuseio, ter custo baixo e não ser tóxico. Alginato é um polissacarídeo natural (extraído de várias espécies de algas) de cadeia linear composto por ligações de ácido gulurônico e ácido manurônico (Figura 5.1). Muitos trabalhos relatam a produção de isomaltulose com uso de células imobilizadas em alginato de cálcio (Anh et al. ¹, Bucke et al. ³, Cheetham et al. ^{4,5}, Kawaguti et al. ⁸, Krastanov et al. ^{6,7}, Lantero ¹¹, Moraes et al ¹², Shimizu et al ¹⁵).

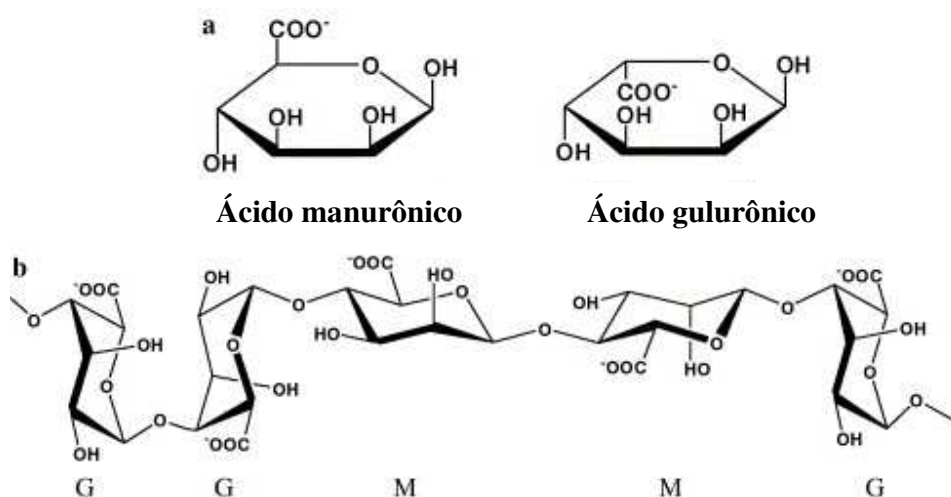


Figura 5.1: Composição do alginato: (a) unidade de ácido manurônico (M) e unidade de ácido gulurônico (G) e (b) cadeia do alginato com diferentes seqüências de ácido gulurônico (G) e ácido manurônico (M).

Nos trabalhos pioneiros com uso de células imobilizadas para produção de isomaltulose foram utilizadas linhagens de *Erwinia* (Bucke et al. ³, Cheetham et al. ^{4, 5}). Nesses trabalhos vários materiais (alginato de cálcio, DEAE-celulose, poliacrilamida, κ-carragena e ágar) foram testados como suporte de imobilização celular, mas o melhor resultado foi a imobilização das células em alginato de cálcio. As células imobilizadas de *Erwinia* apresentaram maior estabilidade operacional com uso de células inteiras do que com o uso de células rompidas ou enzima livre. O empacotamento dos grânulos de células imobilizadas em reatores forneceu os melhores resultados para produção de isomaltulose. Um reator de leito empacotado operando em condições padronizadas, teoricamente, é o método mais eficiente de se utilizar um biocatalisador para conversão enzimática. Geralmente, o uso de reatores em forma de leito empacotado é recomendado para processos contínuos. Os parâmetros operacionais mais importantes para a conversão contínua de sacarose em isomaltulose são a produtividade e a estabilidade do reator (Krastanov et al. ⁶).

Como a atividade e estabilidade das células imobilizadas são fatores importantes para determinar o tempo de vida operacional de um reator, vários autores estudaram o uso de aditivos como glutaraldeído e polietilenoimina para aumentar a estabilidade das células imobilizadas. Supõe-se que o glutaraldeído funciona como agente de reticulação ou ligação do suporte com as células imobilizadas. Alguns autores verificaram que a utilização de aditivos diminuiu a atividade das células imobilizadas, mas em compensação aumentou a estabilidade das mesmas. Assim, as células imobilizadas tratadas com aditivos converteram sacarose em isomaltulose por período muito maior do que as células imobilizadas não tratadas com aditivos (Kawaguti ⁹, Shimizu et al ¹⁵, Tsuyuki ¹⁶).

Neste trabalho foi estudada a produção de isomaltulose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio. O objetivo foi desenvolver um biocatalisador que combinasse a simplicidade da técnica de imobilização celular em alginato com alta bio-conversão de sacarose em isomaltulose pela bactéria *Serratia plymuthica*. A produção contínua de isomaltulose a partir de sacarose foi testada em

bioreatores de leite empacotado, utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio tratadas e não tratadas com glutaraldeído, por um período de 15 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de massa celular da bactéria *Serratia plymuthica*

A fermentação para obtenção de massa celular da bactéria *Serratia plymuthica*, foi feita em fermentador de 6,6 L Bioflow IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) contendo 3L de meio de cultivo. Foi utilizado o meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]). A fermentação foi realizada a 26°C, durante 6 horas, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm. A massa celular foi removida por centrifugação, lavada com água destilada e usada para o procedimento de imobilização celular (Figura 5.2).



Figura 5.2: Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para obtenção de massa celular da bactéria *Serratia plymuthica*.

Imobilização celular em alginato de cálcio

Para o procedimento de imobilização celular, suspensões aquosas de massa celular úmida (30%, p/v) foram misturadas com soluções aquosas de alginato de sódio Synth[®] (2%, p/v) e alginato de sódio Sigma[®] de alta viscosidade (1%, p/v), na proporção de volume de 1:2. As misturas homogêneas resultantes foram gotejadas com auxílio de bomba peristáltica (MasterFlex[®] L/S, Cole-Parmer Instruments Co., Vernon Hills, EUA) em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% (p/v), para a formação de esferas de 3,0 mm de diâmetro (Figura 5.3). Para aumentar a resistência do gel, os grânulos foram mantidos na solução de cloreto de cálcio 2% por 12 horas sob refrigeração e posteriormente foram lavados com água destilada.



Figura 5.3: Técnica de imobilização das células de *Serratia plymuthica* em alginato de cálcio.

Produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando bioreator

O processo contínuo de produção de isomaltulose a partir de sacarose, por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio, foi feito em bioreatores (colunas de vidro de 15 cm comprimento × 3 cm diâmetro) mantidos a temperatura constante de 25°C. Amostras de 100 g de células imobilizadas foram transferidas para os bioreatores e soluções aquosas de sacarose 35% (p/v) foram bombeadas, no sentido ascendente, utilizando fluxo de 0,3 mL/min. Foram preparados 2 bioreatores, sendo o bioreator 1 empacotado com células imobilizadas em alginato Synth[®] 2% (p/v) e o bioreator 2 empacotado com células imobilizadas em alginato Sigma[®] 1% (p/v) (Figura 5.4). Amostras foram coletadas a cada 24 horas, pelo período de 7 dias e os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].



Figura 5.4: Produção contínua de isomaltulose em bioreatores.

Tratamento das células imobilizadas em alginato Synth[®] 2% com glutaraldeído

Foi testado o efeito do glutaraldeído na estabilidade enzimática das células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio Synth[®] 2% para conversão de sacarose em isomaltulose. As células imobilizadas foram tratadas com solução aquosa de glutaraldeído 0,06% (v/v) por 20 minutos sob lenta agitação, conforme metodologia descrita por Kawaguti ¹⁰. Após tratamento com glutaraldeído, os grânulos foram lavados com água destilada. Amostras de 100 g de células imobilizadas foram transferidas para os bioreatores, mantidos a 25°C e alimentados com solução de sacarose 35% (p/v). Foram preparados 2 bioreatores, sendo o bioreator 1 empacotado com células imobilizadas tratadas com glutaraldeído e o bioreator 2 empacotado com células imobilizadas não tratadas com glutaraldeído. Amostras foram coletadas a cada 24 horas, pelo período de 15 dias e os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Análise dos carboidratos

A análise dos carboidratos foi realizada em cromatógrafo Dionex[®] DX 600 equipado com bomba isocrática IP25, coluna de guarda carbo Pac PA1TM (4 mm X 500 mm), coluna carbo Pac PA1TM (4 mm X 270 mm) e detector eletroquímico ED50. A fase móvel utilizada foi solução de hidróxido de sódio 250 mM, com fluxo de 1 mL/minuto a 20°C. As amostras foram analisadas por comparação do tempo de retenção dos padrões de sacarose, isomaltulose, glicose e frutose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leite empacotado contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth® 2% e em alginato Sigma® 1%.

A Tabela 5.1 e a Figura 5.5 ilustram o processo contínuo de produção de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose em bioreatores contendo células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio Synth® 2% e em alginato de cálcio Sigma® 1%. Num período de 7 dias as células imobilizadas em alginato Synth® 2% apresentaram produção de isomaltulose maior e mais estável do que as células imobilizadas em alginato Sigma® 1%. No bioreator contendo células imobilizadas em alginato Synth® 2% foi obtido conversão de sacarose em 81,26% de isomaltulose no primeiro dia. A conversão teve pouco decréscimo com o aumento do tempo de operação do bioreator, sendo obtido 70,89% de isomaltulose no sétimo dia. Utilizando-se células imobilizadas em alginato Sigma® 1%, a conversão de sacarose em isomaltulose foi de 77,56% no primeiro dia e decaiu para 64,84% no sétimo dia.

Tabela 5.1: Conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth® 2% e em alginato Sigma® 1%.

Tempo (dias)	BIOREATOR 1: alginato Synth® 2%			BIOREATOR 2: alginato Sigma® 1%		
	Isomaltulose (%)	Glicose, frutose e trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)	Glicose, frutose e trealulose (%)	Sacarose (%)
1	81,26	15,44	3,30	77,56	16,35	6,08
2	79,58	17,44	2,97	76,07	17,47	6,46
3	76,93	17,09	5,99	75,22	21,59	3,19
4	76,42	18,93	4,65	75,60	19,31	5,09
5	74,94	20,01	5,06	73,13	21,07	5,80
6	72,39	18,58	9,02	66,71	18,79	14,50
7	70,89	18,42	10,69	64,84	17,36	17,80

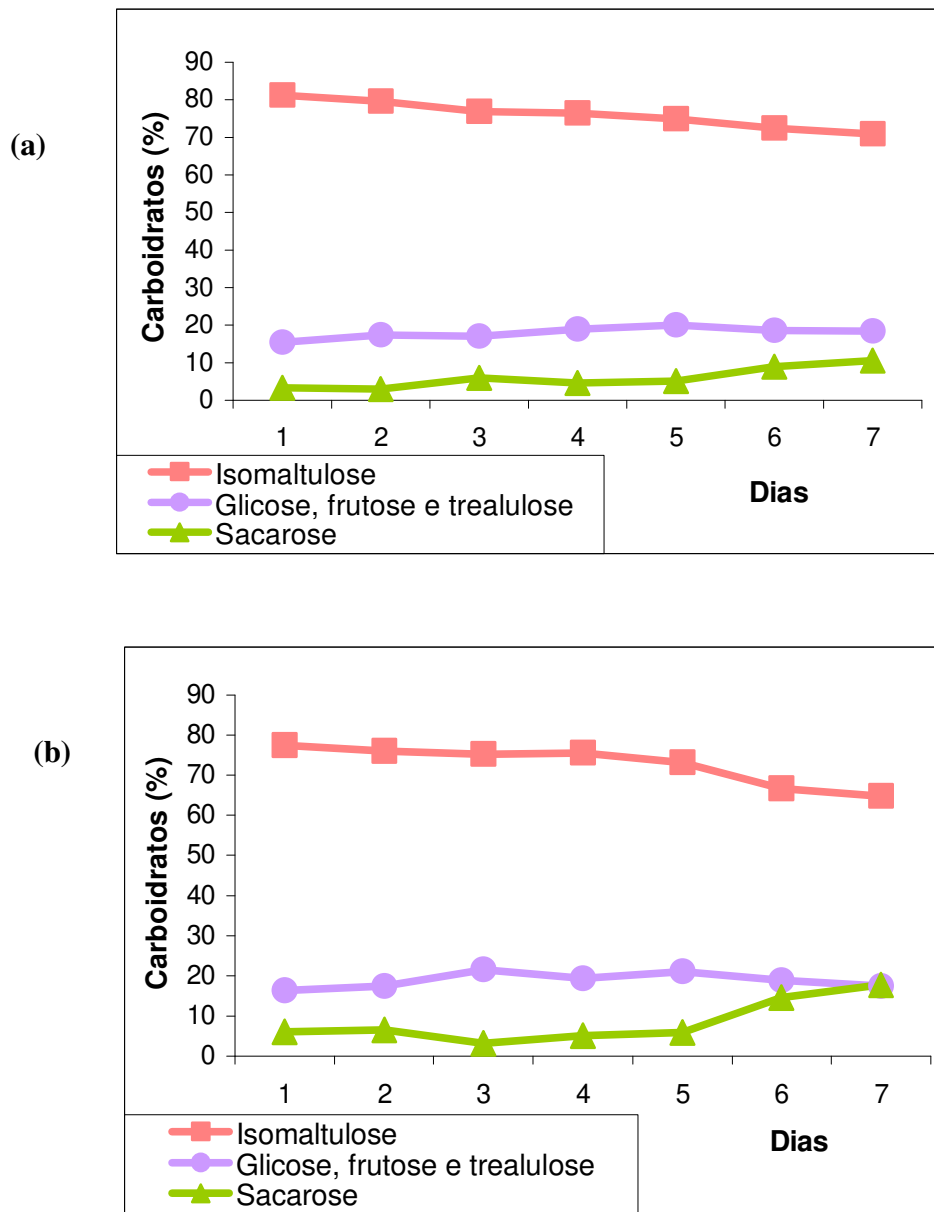


Figura 5.5: Produção de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose em bioreatores contendo células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio: (a) células imobilizadas em alginato Synth[®] 2% (p/v) e (b) células imobilizadas em alginato Sigma[®] 1% (p/v).

Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo descrito por Kawaguti ¹⁰, onde se verificou que a solução 1% de alginato de alta viscosidade da marca Sigma[®] pode ser substituída por solução 2% de alginato da marca Synth[®], de menor custo, para a imobilização de células de *Erwinia* sp. Foi obtido 74,2% de conversão de sacarose em isomaltulose, após 24 horas de reação a 30°C, utilizando-se a mistura de 40% de massa celular úmida de *Erwinia* sp. e 2% de solução alginato Synth[®], na proporção de volume de 1:2.

No trabalho de Orsi ¹³ estudou-se a influência da concentração de alginato de cálcio Synth[®] (2% a 4%) na imobilização de células de *Klebsiella* sp. para produção de isomaltulose. As células imobilizadas foram empacotadas em bioreatores alimentados com solução de sacarose 35%, a 30°C. Foi obtido melhor resultado de conversão de sacarose em isomaltulose (62,1%) no bioreator contendo células imobilizadas em solução 2% de alginato Synth[®], após 24 horas de reação. Utilizando-se células imobilizadas com alginato Synth[®] 3% e 4% a conversão de sacarose em isomaltulose foi menor, sendo obtido respectivamente, 51,1% e 47,4% de isomaltulose após 24 horas de reação.

Estabilidade enzimática nas células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth® 2% e tratadas com glutaraldeído na conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreator

A Figura 5.6 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 1, utilizando-se células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio Synth® 2% e tratadas com glutaraldeído. Observou-se que nos seis primeiros dias a sacarose foi totalmente convertida em cerca de 83,90% de isomaltulose e 16,24% de glicose, frutose e trealulose. No sétimo dia uma pequena porcentagem de sacarose (3,39%) não foi convertida e houve produção de 78,39% de isomaltulose e 18,22% de glicose, frutose e trealulose. Nos dias seguintes a produção de isomaltulose declinou lentamente e houve aumento gradativo da quantidade de sacarose não convertida. No décimo quinto dia obteve-se 64,95% de isomaltulose, 5,95% de glicose, 4,19% de frutose, 7,75% de trealulose e 17,16% de sacarose residual.

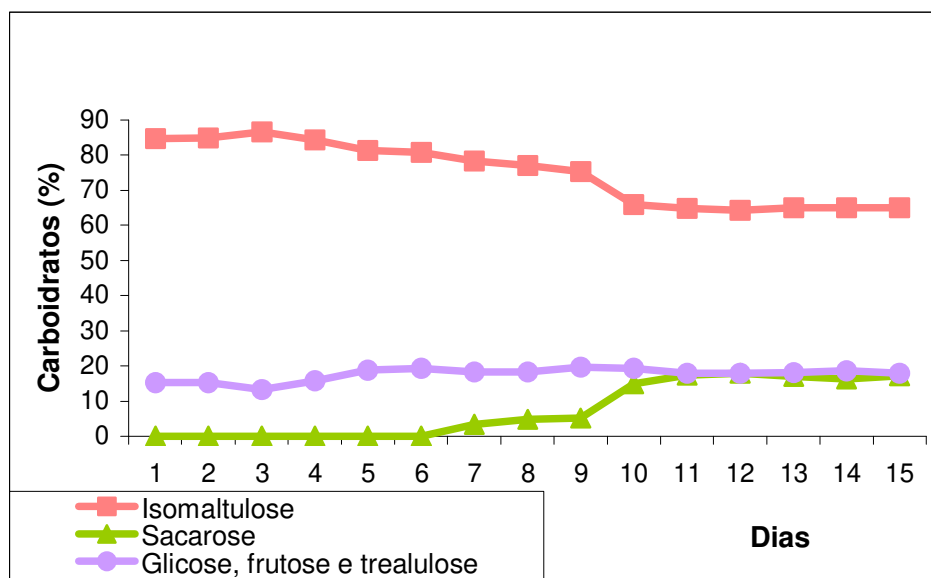


Figura 5.6: Produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir da sacarose em bioreator 1, contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth® 2% e tratadas com glutaraldeído.

Estabilidade enzimática nas células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth® 2% e não tratadas com glutaraldeído na conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreator

A Figura 5.7 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 2, utilizando-se células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio Synth® 2% e não tratadas com glutaraldeído. Observou-se que até o décimo dia a conversão de sacarose em isomaltulose foi de aproximadamente 77,07%, com produção de glicose, frutose e trealulose em torno de 17,40%. Entretanto, no décimo primeiro dia ocorreu brusca queda da conversão enzimática, formando-se apenas 39,57% de isomaltulose e sobrando 50,04% de sacarose não convertida. No décimo quinto dia foi obtido 38,38% de isomaltulose, 4,00% de glicose, 3,46% de frutose, 4,28% de trealulose e 49,88% de sacarose residual.

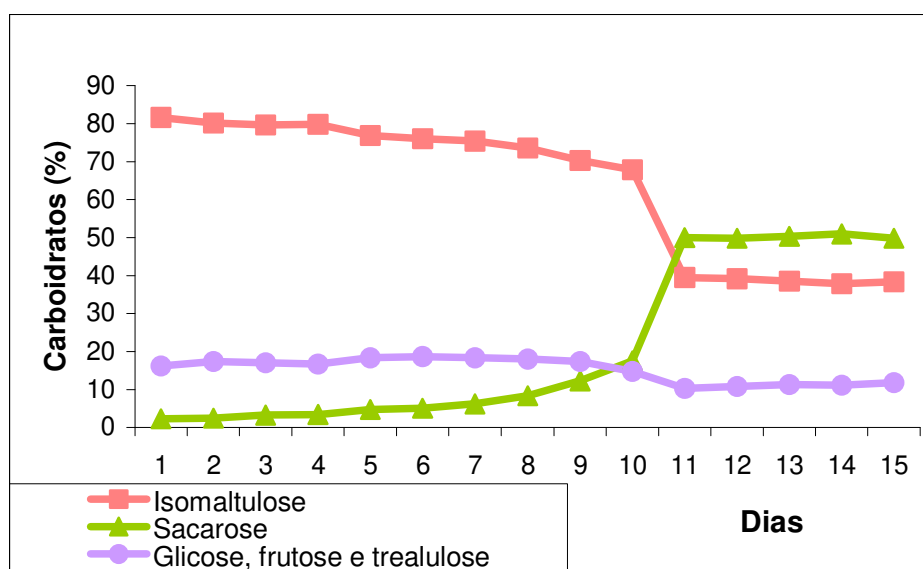


Figura 5.7: Produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir da sacarose em bioreator 2, contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato Synth® 2% e não tratadas com glutaraldeído.

A Figura 5.8 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose pelas células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio, tratadas com glutaraldeído e não tratadas com glutaraldeído, no período de 15 dias. Verificou-se que as células imobilizadas tratadas com glutaraldeído mostraram estabilidade enzimática maior do que as células imobilizadas não tratadas com glutaraldeído. No bioreator contendo células imobilizadas tratadas com glutaraldeído foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 64% por 15 dias. Utilizando-se células imobilizadas sem tratamento com glutaraldeído a conversão de sacarose em isomaltulose se manteve estável até 10 dias, sendo obtido porcentagens de isomaltulose acima de 70%. No décimo primeiro dia a conversão de sacarose em isomaltulose sofreu uma brusca queda, sendo obtido somente 39,6% de isomaltulose.

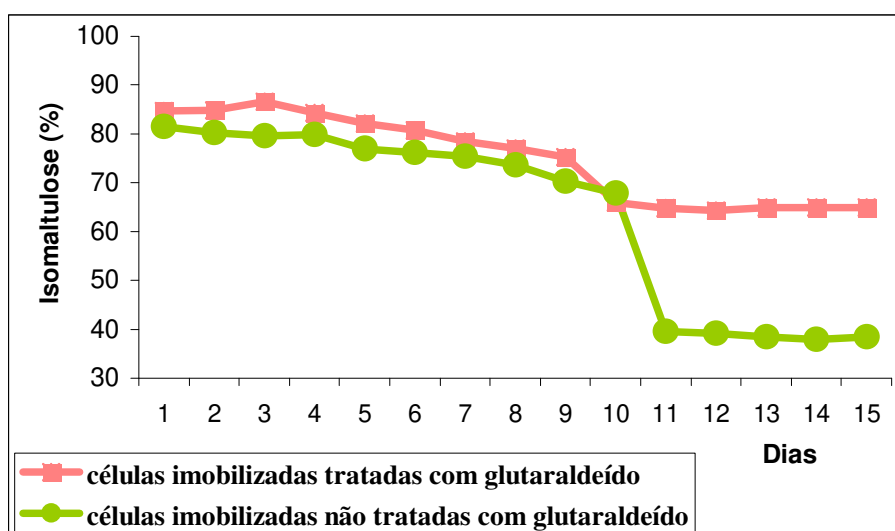


Figura 5.8: Conversão contínua de sacarose em isomaltulose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio, tratadas e não tratadas com glutaraldeído, em bioreatores.

No trabalho de Kawaguti ⁹, o autor verificou a produção de isomaltulose por células de *Erwinia* sp. imobilizadas em alginato de cálcio tratadas com glutaraldeído. As células foram imobilizadas com concentração celular de 40% (p/v) em alginato de cálcio 2% (p/v). Os grânulos foram empacotados em colunas (15 x 3 cm) a 30°C e alimentados com solução

de sacarose 35% (p/v). A conversão de sacarose em isomaltulose foi acompanhada por 11 dias. A coluna contendo células imobilizadas tratadas com glutaraldeído mostrou alta estabilidade e foi obtida produção de isomaltulose acima de 50% por 11 dias. Já a coluna contendo células imobilizadas sem tratamento com glutaraldeído, mostrou rápido declínio da conversão ao longo do tempo, sendo que no 11º dia não houve nenhuma formação de isomaltulose.

CONCLUSÕES

No estudo da conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leite empacotado contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas com solução 2% de alginato Synth[®] e solução 35% de sacarose, foram obtidas porcentagens de isomaltulose acima de 70% por 7 dias. O tratamento das células imobilizadas em alginato Synth[®] 2% (p/v) com glutaraldeído resultou em aumento da estabilidade enzimática. No bioreator contendo células imobilizadas tratadas com glutaraldeído, no décimo quinto dia, foram obtidos 65,0% de isomaltulose, 6,0% de glicose, 4,2% de frutose, 7,8% de trealulose e 17,1% de sacarose residual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 5, p. 319-367, 1987.
3. BUCKE, C.; CHEETHAM, P. S. J. **Production of isomaltulose. US Patent 4.670.387**, 1982.
4. CHEETHAM, P. S. J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471-481, 1985
5. CHEETHAN, P. S. J.; IMBER, C. E.; ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, v. 299, p. 628-631, 1982.
6. 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.
7. KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Enzyme**, v. 30, p. 593-598, 2003.
8. KAWAGUTI, Y. H; 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.
9. KAWAGUTI, Y. H. **Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2006. 166p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

10. KAWAGUTI, Y. H. **Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose.** Campinas, 2003. 145p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
11. LANTERO, O.J. **Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*.** US Patent 82109404.2, 1983
12. 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, p. 95-102, 2005.
13. ORSI, D.C. **Produção de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18 e otimização do processo de conversão de sacarose em isomaltulose.** Campinas, 2004. 72p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
14. PARK, Y. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 303-319, 2000.
15. 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.
16. TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 483-490, 1992.

CAPÍTULO 6: GOMA GELANA: ESTUDO DE UM NOVO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA BACTÉRIA *SERRATIA PLYMUTHICA*

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a imobilização das células da bactéria *Serratia plymuthica* em goma gelana KELCOGEL[®] F. No estudo preliminar foi testada a capacidade de produção de isomaltulose a partir de sacarose por células imobilizadas em goma gelana cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]) e em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]). Foi observado que as células imobilizadas em goma gelana preparadas com massa celular cultivada em meio de cultivo 1 ficaram firmes e apresentaram melhor resistência mecânica do que as células imobilizadas em goma gelana preparadas com massa celular cultivada em meio de cultivo 2.

Foi verificada a influência da concentração de substrato sacarose (15-55%, p/v) e da concentração de goma gelana KELCOGEL[®] F (1-5%, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana, cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]). Na análise dos efeitos da concentração de solução sacarose, as células foram imobilizadas em solução de goma gelana 3% e após 24 horas de reação foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose em torno de 77% utilizando soluções de sacarose entre 45% e 55%. Na análise dos efeitos da concentração de goma gelana, a produção de isomaltulose foi realizada com solução de sacarose 35% e a maior conversão de sacarose em isomaltulose (77,5%) foi obtida na concentração de goma gelana 5%.

A produção contínua de isomaltulose a partir de sacarose foi realizada em bioreatores de leite empacotado mantidos a temperatura constante de 25°C. Na conversão de solução 45% de sacarose, utilizando-se 30% de suspensão de células imobilizadas com

solução 3% de goma gelana, foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 65% por 7 dias. Foi testado o efeito da secagem por 36 horas das células imobilizadas em goma gelana e tratadas com glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose. A secagem das células imobilizadas em goma gelana 3% resultou em aumento da estabilidade enzimática na conversão de sacarose em isomaltulose. No bioreator contendo células imobilizadas secas foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 69% por 15 dias.

INTRODUÇÃO

Numerosos processos biotecnológicos são vantajosos com o uso de células imobilizadas e vários materiais têm sido aplicados na imobilização celular. As células devem ser imobilizadas em suportes que permitam a fácil difusão de substrato e produto. Entre os materiais utilizados para o encapsulamento celular dentro de matriz porosa, destacam-se os polissacarídeos alginato e kappa-carragena. Outros polissacarídeos como ágar e quitosana também são utilizados, além de materiais como gelatina, colágeno e álcool polivinil (Ertesvag ³, Kourkoutas ⁶).

Krastanov et al. ⁷ utilizaram quitosana como suporte para a imobilização de células de *Serratia plymuthica*. Para a gelificação, a massa celular úmida foi misturada com solução aquosa de acetato de quitosana 2% e 1,5 mL de solução de glutaraldeído 25%. A mistura gelificada foi fragmentada em pequenas partículas. Porém o gel não mostrou boa resistência mecânica e para aumentar a estabilidade, as partículas foram secas em temperatura ambiente por 36 horas. Kawaguti ⁵ também estudou o uso do acetato de quitosana como suporte para imobilização de células de *Erwinia* sp. Neste estudo não foi possível realizar a conversão de sacarose em isomaltulose em colunas de leite empacotado, devido à baixa resistência mecânica dos grânulos de quitosana, que se rompiam nas colunas.

Neste estudo buscou-se outro suporte para a imobilização celular que tivesse características parecidas com o alginato (ser de fácil manuseio, formar grânulos de células imobilizadas com boa resistência mecânica e não ser tóxico). A goma gelana KELCOGEL[®] F é um produto manufaturado pela indústria CP KELCO. É uma mistura multifuncional de ação gelificante para uso em alimentos, ideal para aplicação como gelificante, estabilizante e espessante. A goma gelana KELCOGEL[®] F pode ser aplicada na produção de gelatina, recheios de confeitos, sobremesas cremosas, preparações de sucos, geléias, bebidas, produtos derivados de leite, entre outros. Tem uso aprovado como aditivo em alimentos

(Food Chemical Codes, USA e Canadian Food and Drug Law). É definida como um polissacarídeo solúvel em água produzido por fermentação. A estrutura molecular da goma gelana é uma cadeia linear baseada na repetição de unidades de glicose, ramnose e ácido galacturônico (Figura 6.1).

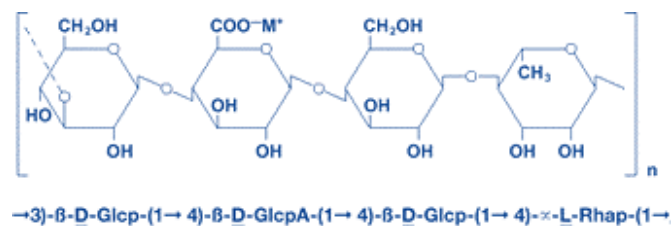


Figura 6.1: Composição da goma gelana KELCOGEL[®] F.

A goma gelana KELCOGEL[®] F tem a capacidade de formar gel em baixas concentrações (menor que 0,05%). A resistência do gel pode ser aumentada por aumento da concentração de goma e/ou da concentração de íons. O gel é formado pela adição da goma em solução aquosa contendo íons mono ou bivalentes, como: K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ ou por aquecimento a 90°C. As características do gel são alta resistência, estabilidade térmica e aparência clara e brilhante.

Neste trabalho a goma gelana KELCOGEL[®] F foi utilizada para imobilização das células de *Serratia plymuthica*. Foram realizados testes para avaliar a capacidade de produção de isomaltulose pelas células imobilizadas em goma gelana. A produção contínua de isomaltulose a partir de sacarose foi testada em bioreatores de leito empacotado, utilizando-se células imobilizadas em goma gelana tratadas com glutaraldeído, secas por 36 horas e sem o tratamento de secagem. Avaliou-se a conversão de sacarose em isomaltulose e a estabilidade do bioreator no período de 15 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de massa celular da bactéria *Serratia plymuthica*

A fermentação da bactéria *Serratia plymuthica*, para obtenção de massa celular, foi feita em fermentador de 6,6 L Bioflow IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) contendo 3L de meio de cultivo. Foram utilizados o meio de cultivo 1 (40 g/L de melaço de cana de açúcar, 15 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]) e o meio de cultivo 2 (40 g/L de melaço de cana de açúcar e 20 g/L de extrato de levedura). A fermentação foi realizada a 26°C, durante 6 horas para o meio de cultivo 1 e durante 12 horas para o meio de cultivo 2, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm. A massa celular foi removida por centrifugação a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C e lavada com água destilada.

Imobilização celular em goma gelana

Para o procedimento de imobilização celular, suspensões aquosas de massa celular úmida 30% (p/v) foram misturadas com soluções aquosas de goma gelana KELCOGEL[®] F (1-5%, p/v), na proporção de volume de 1:2. As misturas homogêneas resultantes foram gotejadas com auxílio de bomba peristáltica (MasterFlex[®] L/S, Cole-Parmer Instruments Co., Vernon Hills, EUA) em solução aquosa de cloreto de cálcio 2% (p/v), para a formação de esferas de 3,0 mm de diâmetro. Para aumentar a resistência do gel, os grânulos foram mantidos na solução de cloreto de cálcio 2% por 12 horas sob refrigeração e posteriormente foram lavados com água destilada.

Testes preliminares para conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana

Nos testes preliminares com células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]) e em meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]), verificou-se a influência da concentração de goma gelana KELCOGEL[®] F (3, 4 ou 5%, p/v), da concentração de substrato sacarose (25 ou 35%, p/v) e da concentração de massa celular úmida (20 ou 30%, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose. Amostras de 40 g de células imobilizadas foram misturadas com 50 mL de solução sacarose e incubadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL a 25°C. Alíquotas de 1 mL foram coletadas após 24 horas e os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Influência da concentração de substrato e da concentração de goma gelana na conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana e cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás[®])

Verificou-se a influência da concentração de substrato sacarose (15-55%, p/v) e da concentração de goma gelana KELCOGEL[®] F (1-5%, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana e cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás[®]). Para fazer os experimentos, amostras de 40 g de células imobilizadas foram misturadas com 50 mL de solução de sacarose e incubadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL a 25°C. No teste da influência da concentração de substrato, suspensões de massa celular úmida 30% (p/v) foram imobilizadas com solução de goma gelana 3% (p/v) e a conversão de sacarose em isomaltulose foi feita com soluções de sacarose 15-55% (p/v). No teste da influência da concentração de goma gelana, suspensões de massa celular úmida 30% (p/v) foram imobilizadas com soluções de goma gelana 1-5% (p/v) e a conversão de sacarose em isomaltulose foi feita utilizando-se solução de sacarose 35% (p/v). Amostras foram

coletadas após 24 horas e os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Produção de isomaltulose a partir de sacarose em bioreatores de leito empacotado contendo células imobilizadas em goma gelana

O processo contínuo de produção de isomaltulose a partir de sacarose, por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana, foi realizado em bioreatores (colunas de vidro de 15 cm comprimento × 3 cm diâmetro) mantidos a temperatura constante de 25°C. Amostras de 100 g de células imobilizadas foram transferidas para os bioreatores e soluções aquosas de sacarose foram bombeadas, no sentido ascendente, utilizando fluxo de 0,3 mL/min. Foram preparados 2 bioreatores, sendo o bioreator 1 empacotado com células imobilizadas em goma gelana 3% (p/v) e alimentado com solução sacarose 45% (p/v) e o bioreator 2 empacotado com células imobilizadas em goma gelana 5% (p/v) e alimentado com solução sacarose 35% (p/v). Amostras foram coletadas a cada 24 horas, pelo período de 7 dias e os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Influência da secagem das células imobilizadas em goma gelana 3% (p/v) e tratadas com glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leito empacotado

Foi testado o efeito da secagem por 36 horas das células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana e tratadas com glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose. Suspensões de massa celular úmida 30% (p/v) foram imobilizadas com solução de goma gelana 3% (p/v). As células imobilizadas foram tratadas com solução aquosa de glutaraldeído 0,06% (v/v) por 20 minutos sob lenta agitação, conforme metodologia descrita por Kawaguti⁵. Após tratamento com o aditivo glutaraldeído, 100 g de grânulos foram lavados com água destilada e secos por 36 horas, sob refrigeração a 10°C. As células imobilizadas foram transferidas para bioreatores mantidos a 25°C e alimentadas com solução aquosa de sacarose 45% (p/v). Foram preparados 2 bioreatores,

sendo o bioreator 1 empacotado com células imobilizadas tratadas com glutaraldeído e secas por 36 horas e bioreator 2 empacotado com células imobilizadas tratadas com glutaraldeído e frescas, ou seja, sem o tratamento de secagem. Amostras foram coletadas a cada 24 horas, pelo período de 15 dias e os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo Dionex[®].

Análise dos carboidratos

A análise dos carboidratos foi feita em cromatógrafo Dionex[®] DX 600 equipado com bomba isocrática IP25, coluna de guarda carbo Pac PA1TM (4 mm X 500 mm), coluna carbo Pac PA1TM (4 mm X 270 mm) e detector eletroquímico ED50. A fase móvel utilizada foi solução de hidróxido de sódio 250 mM, com fluxo de 1 mL/minuto a 20°C. As amostras foram analisadas por comparação do tempo de retenção dos padrões de sacarose, isomaltulose, glicose e frutose.

A Figura 6.2 ilustra os passos da conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando-se células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana.



(1) Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para obtenção de massa celular



(2) Técnica de imobilização celular em goma gelana



(3) Produção contínua de isomaltulose em bioreatores

Figura 6.2. Conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana: (1) Fermentação e centrifugação do meio de cultivo para obtenção da massa celular, (2) Técnica de imobilização celular em goma gelana, (3) Produção contínua de isomaltulose a partir de sacarose em bioreatores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes preliminares para conversão de sacarose em isomaltulose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana

A Figura 6.3 ilustra o aspecto dos grânulos de goma gelana contendo as células de *Serratia plymuthica* imobilizadas. Foi observado que os grânulos resultantes de massa celular cultivada em meio de cultivo 1 imobilizada em goma gelana ficaram firmes e apresentaram boa resistência mecânica. Por outro lado, a utilização do meio de cultivo 2 para a imobilização celular em goma gelana deu origem a grânulos frágeis, sendo que muitos se despedaçaram ao longo do tempo, liberando a massa celular para o meio de reação.

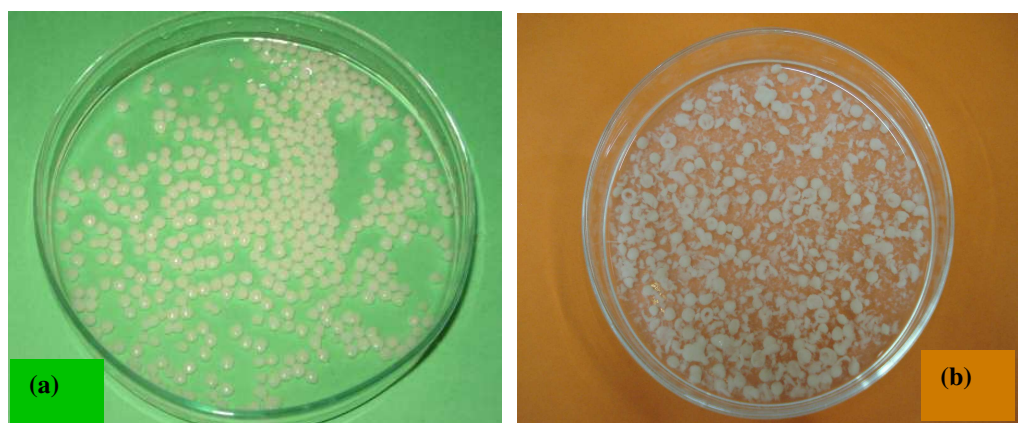


Figura 6.3: Células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana: (a) massa celular obtida com meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás®) e (b) massa celular obtida com meio de cultivo 2 (sem adição de peptona bacteriológica da Biobrás®).

A Figura 6.4 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas em goma gelana e cultivadas em meio de cultivo 1. A maior conversão de sacarose em isomaltulose (86,32%) foi obtida no teste 2 em que se utilizou goma gelana 3% (p/v), substrato sacarose 35% (p/v) e massa celular úmida 30% (p/v). A diminuição da concentração de massa celular úmida de 30% para 20% resultou em menor conversão de sacarose em isomaltulose (61,25%, teste 3). O uso de concentração de goma gelana 3% nos testes 1 e 2 forneceu melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose do que nos testes 4, 5 e 6, nos quais utilizaram-se goma gelana 4% ou 5%. A utilização de concentração de sacarose 35% (teste 2) resultou em maior conversão de sacarose em isomaltulose do que a utilização de concentração de substrato sacarose 25% (teste 1).

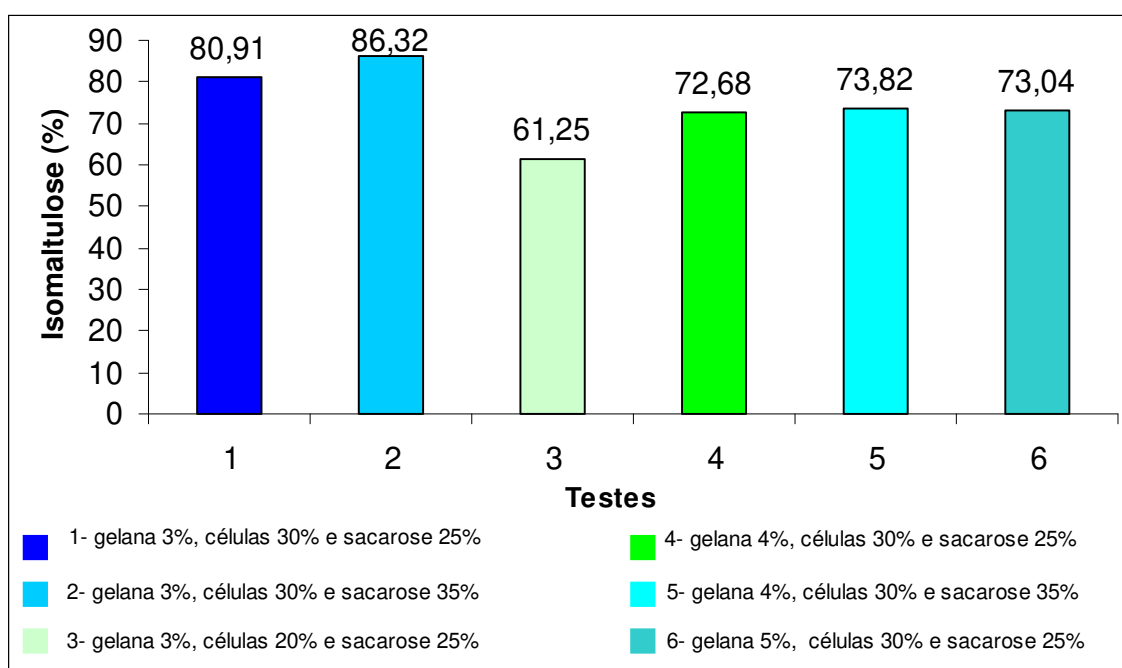


Figura 6.4: Conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* cultivadas em meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica Biobrás®) e imobilizadas em goma gelana.

A resistência mecânica da matriz é um fator importante para determinar o tempo de vida operacional do sistema com células imobilizadas. Um sistema mecanicamente estável deve resistir à pressão exercida pelas células em crescimento e formação de gás intrapartículas e também às condições hidrodinâmicas severas como a compactação em leitos empacotados (Derwakos et al. ²). Foi observado que a utilização do meio de cultivo 1 para a imobilização celular em goma gelana resultou em grânulos bem mais firmes do que o meio de cultivo 2. Assim, escolheu-se o meio de cultivo 1 (com adição de peptona bacteriológica da Biobrás[®]) para a continuidade dos estudos com células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana.

Influência da concentração de substrato (15-55%, p/v) e da concentração de goma gelana (1-5%, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana.

No estudo dos efeitos da concentração de substrato sacarose (15-55%, p/v) na conversão de sacarose em isomaltulose por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana 3%, observou-se aumento da produção de isomaltulose quanto maior a concentração de solução de sacarose (Figura 6.5 a). Então, as maiores conversões de sacarose em isomaltulose (76,45% e 77,77%) foram obtidas nas concentrações de solução de sacarose 45% e 55% e a menor conversão (66,62%) foi obtida na concentração de solução de sacarose 15%. No estudo dos efeitos da concentração de goma gelana (1-5%, p/v) na produção de isomaltulose com solução de sacarose 35% (Figura 6.5 b), a maior conversão de sacarose em isomaltulose (77,46%) foi obtida por células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana 5% e a menor conversão de sacarose em isomaltulose (73,82%) foi obtida por células imobilizadas em goma gelana 1%.

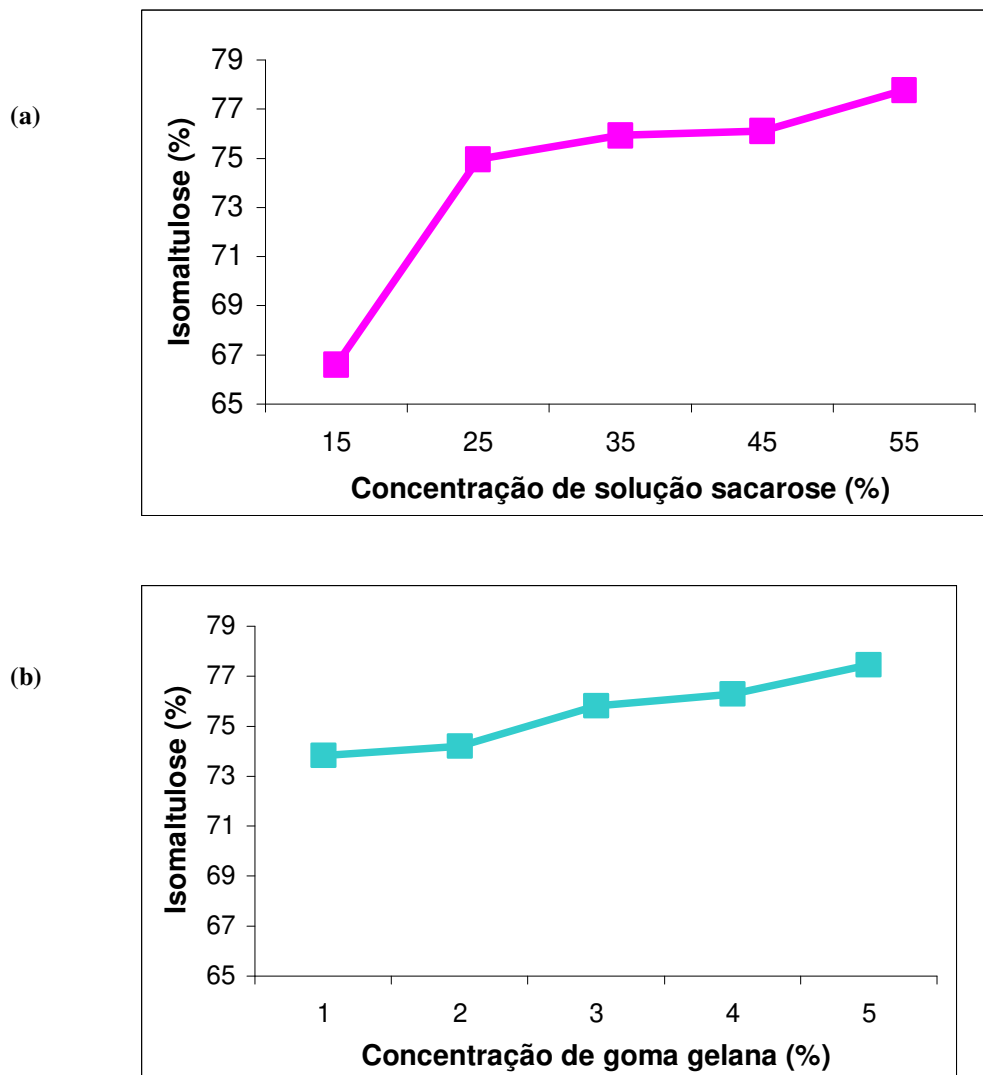


Figura 6.5: Conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana: (a) influência da concentração de substrato (15-55%) na conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas em goma gelana 3%, (b) influência da concentração de goma gelana (1-5%) na imobilização celular e na conversão de solução de sacarose 35% em isomaltulose.

Conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leite empacotado contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana

A Figura 6.6 ilustra a produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir de solução de sacarose 45% em bioreator 1, utilizando-se suspensões de massa celular úmida 30% imobilizadas em solução de goma gelana 3%. Observou-se conversão estável de sacarose em isomaltulose no período de 7 dias, sendo obtido cerca de 69,18% de isomaltulose, 17,63% de glicose, frutose e trealulose e 13,26% de sacarose residual.

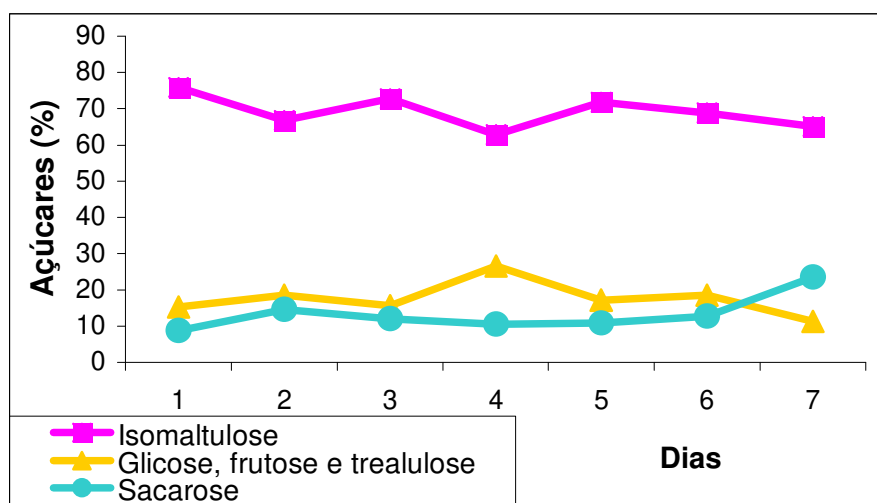


Figura 6.6: Conversão de solução sacarose 45% em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 1, contendo células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana 3%.

No trabalho de Krastanov et al.⁷ a maior conversão de sacarose em isomaltulose (cerca de 94%) foi obtida utilizando-se soluções de sacarose entre 40% e 60% e células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em quitosana. Já no trabalho de Bucke et al.¹, os autores verificaram que concentrações de sacarose ao redor de 40% diminuíram a atividade das células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas em alginato de cálcio, mas em compensação aumentaram a estabilidade enzimática, o que resultou em aumento da produtividade de isomaltulose. Além disso, altas concentrações de sacarose tendem a inibir a divisão celular, prevenir a contaminação microbiana e tornar mais fácil a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado.

A Figura 6.7 ilustra a produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir de solução sacarose 35% no bioreator 2, utilizando suspensões de massa celular úmida 30% imobilizadas em solução de goma gelana 5%. Foi observada muita variação na conversão de sacarose em isomaltulose, sendo que no primeiro, terceiro e quinto dias de reação foram obtidos 69,70%, 46,03% e 80,81% de isomaltulose, respectivamente. No sétimo dia de reação foi obtido 66,67% de isomaltulose, 16,86% de glicose, frutose e trealulose e 16,47% de sacarose residual.

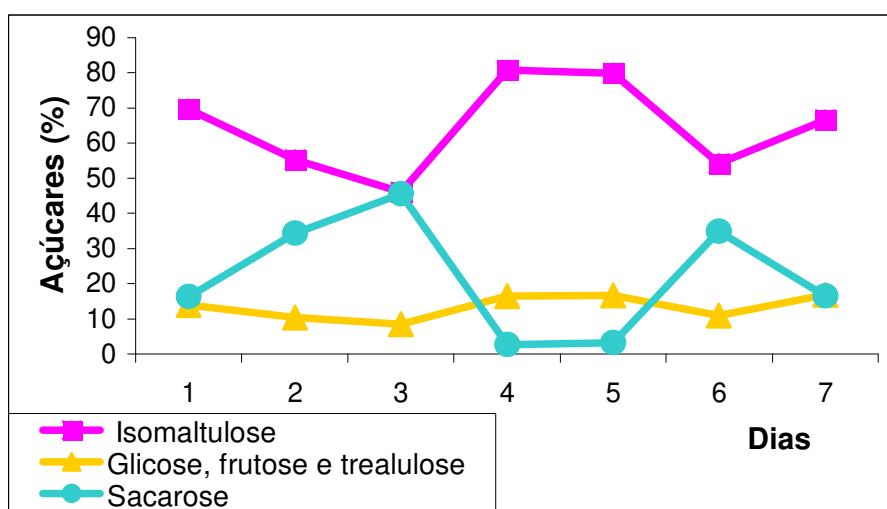


Figura 6.7: Conversão de solução sacarose 35% em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 2, contendo células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana 5%.

Talvez essa variação da conversão de sacarose em isomaltulose ao longo dos dias tenha acontecido porque o uso de solução muito viscosa de goma gelana 5% reduziu a porosidade das células imobilizadas e causou instabilidade na difusão de substrato. Segundo os autores Ogbonna et al.⁸ o uso de concentração de alginato 4% causou problemas de viscosidade na imobilização de células de *Sacharomyces cerevisiae* e resultou em esferas com difusão deficiente. Além disso, a solução de alginato muito viscosa dificultou a homogeneização com a suspensão celular, resultando em esferas com diferentes concentrações celulares.

Influência da secagem das células imobilizadas em goma gelana 3% (p/v) e tratadas com glutaraldeído na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leito empacotado

A Figura 6.8 ilustra o aspecto das células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana 3%, tratadas com glutaraldeído: (a) frescas ou seja sem tratamento de secagem e (b) secas por 36 horas, sob refrigeração a 10°C. Foi observada redução no tamanho dos grânulos secos por 36 horas, devido à perda de água, em comparação com os grânulos frescos.

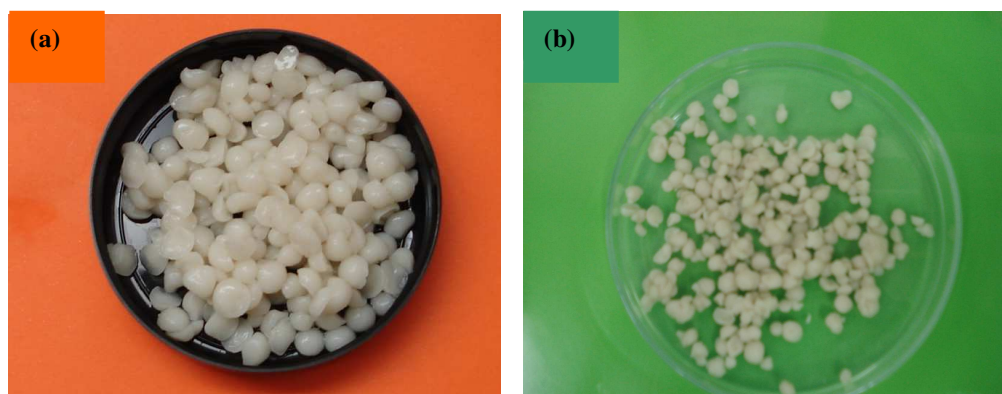


Figura 6.8: Células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana 3% e tratadas com glutaraldeído: (a) células frescas, sem tratamento de secagem e (b) células secas por 36 horas, sob refrigeração a 10°C.

A Figura 6.9 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 1 mantido a 25°C, utilizando-se células imobilizadas em goma gelana 3% e secas por 36 horas sob refrigeração a 10°C. Observou-se conversão estável de sacarose em isomaltulose, sendo obtido cerca de 72,14% de isomaltulose, 2,62% de glicose, 1,96% de frutose, 9,07% de trealulose e 14,24% de sacarose residual, no período de 15 dias. Os maiores valores de conversão de sacarose em isomaltulose (81,05% e 76,26%) ocorreram nos dois primeiros dias. No décimo quinto dia de reação, obteve-se 75,03% de isomaltulose, 12,86% de glicose, frutose e trealulose e 12,11% de sacarose residual.

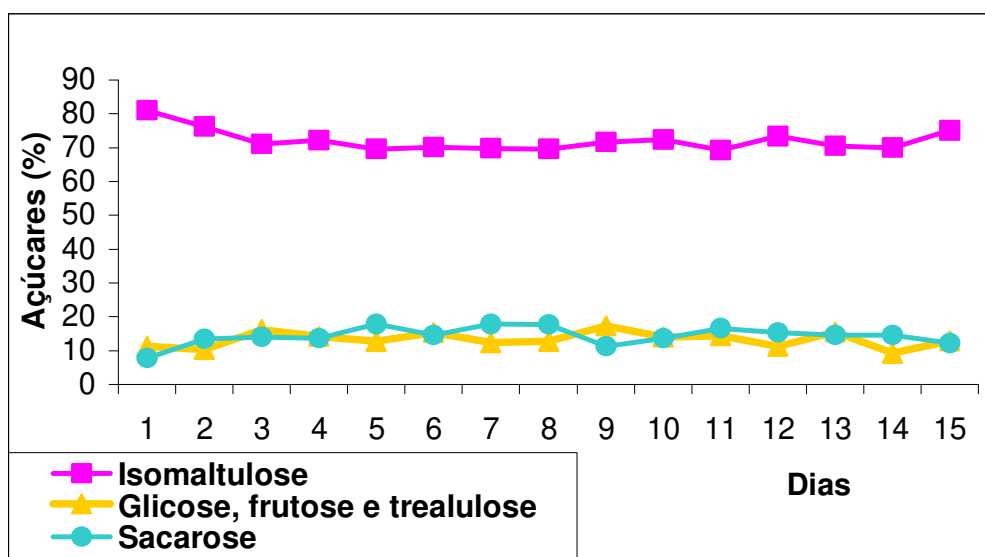


Figura 6.9: Conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares em bioreator 1 mantido a 25°C, utilizando-se células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído e secas por 36 horas, sob refrigeração a 10°C.

A Figura 6.10 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose e outros açúcares e bioreator 2 mantido a 25°C, utilizando-se células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana e frescas, ou seja, sem o tratamento de secagem. Nos três primeiros dias obteve-se conversão de sacarose em isomaltulose em torno de 64,63%. No quarto e no quinto dia de reação foram obtidos os maiores valores de conversão de sacarose em isomaltulose (73,46% e 74,59%). Nos dias seguintes a conversão de sacarose em isomaltulose variou de 73,42% a 61,09%. No décimo quinto dia de reação foi obtido 70,81% de isomaltulose, 13,10% de glicose, frutose e trealulose e 16,09% de sacarose residual.

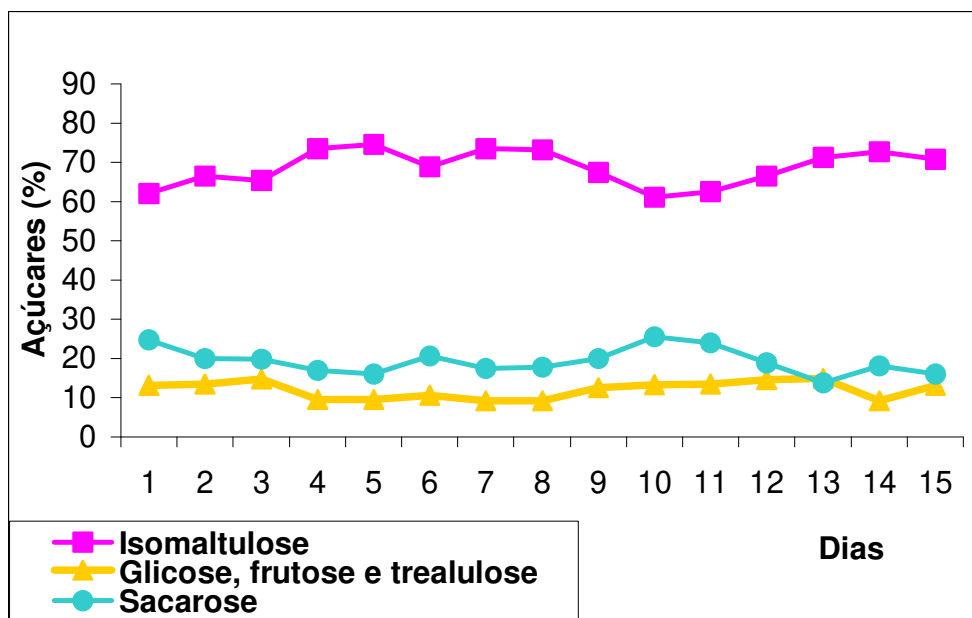


Figura 6.10: Produção contínua de isomaltulose e outros açúcares a partir de sacarose em bioreator 2 mantido a 25°C, utilizando-se células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído e frescas ou sem o tratamento de secagem.

A Figura 6.11 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores mantidos a 25°C, contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído, secas por 36 horas e frescas ou sem o tratamento de secagem, no período de 15 dias. No bioreator contendo células imobilizadas secas foi obtida conversão de sacarose em isomaltulose acima de 69% por 15 dias. A secagem das células teve efeito positivo na estabilidade enzimática e ocorreu variação menor na conversão de sacarose em isomaltulose ao longo dos dias. Utilizando-se células imobilizadas sem o tratamento de secagem foi obtida conversão média de sacarose em isomaltulose de 68,6%, sendo que as porcentagens de isomaltulose variaram de 74,6% a 61,1% no período de 15 dias.

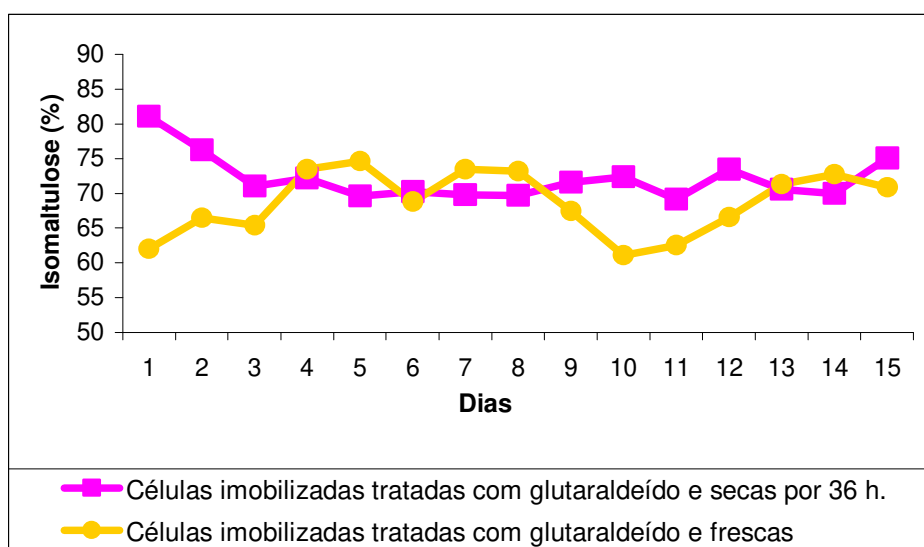


Figura 6.11: Conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreatores mantidos a 25°C, contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas em goma gelana, tratadas com glutaraldeído, secas por 36 horas e frescas ou sem o tratamento de secagem.

Kawaguti ⁵ realizou um teste de secagem das células de *Erwinia* sp. imobilizadas em alginato de cálcio. As células foram imobilizadas com concentração celular de 40% (p/v) em alginato de cálcio 2% (p/v). As células imobilizadas foram tratadas com glutaraldeído e desidratadas por 24 horas (8 horas em fluxo laminar a temperatura ambiente e 16 horas sob refrigeração a 5°C). Amostras de 12,5 g de células imobilizadas secas foram misturadas com 100 mL de solução sacarose 35% (p/v) e incubadas por 24 horas. As células foram reutilizadas por 5 vezes seguidas. Os grânulos secos mostraram maior estabilidade que os grânulos úmidos e foram obtidas conversões de isomaltulose de 49,3% a 57,2% durante os 5 ciclos de reação.

Jang et al. ⁴ verificaram o efeito do processo de secagem na estabilidade enzimática das células da bactéria *Zymomonas mobilis* imobilizadas em kappa-carragena para produção de sorbitol. As células (12 g, peso seco) foram imobilizadas em solução de kappa-carragena 3,2% (p/v), tratadas com glutaraldeído 0,3% (v/v) e secas por 2 semanas a 20°C. Para a produção de sorbitol, amostras de células imobilizadas secas foram misturadas com o substrato (uma mistura equimolar de 50 g/litro de glicose e frutose) e incubadas por 24 horas, a 39°C. As células foram reutilizadas por 3 vezes seguidas. Os grânulos secos mostraram maior estabilidade enzimática que os grânulos úmidos. Ocorreu pouca perda de atividade enzimática (em torno de 10%) nos grânulos secos após os 3 ciclos de operação, em contraste com uma perda de atividade enzimática de 71% nos grânulos úmidos.

CONCLUSÕES

No estudo da conversão contínua de sacarose em isomaltulose em bioreatores de leite empacotado contendo células da bactéria *Serratia plymuthica* imobilizadas com solução 3% de goma gelana KELCOGEL[®] F e solução 45% de sacarose, foram obtidas porcentagens de isomaltulose acima de 65% por 7 dias. A secagem das células imobilizadas em goma gelana 3% tratadas com glutaraldeído resultou em maior estabilidade enzimática na conversão de sacarose em isomaltulose. No bioreator contendo células imobilizadas secas foi obtida produção de isomaltulose acima de 69% por 15 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUCKE, C.; CHEETHAM, P. S. J. **Production of isomaltulose. US Patent** 4.670.387, 1982.
2. DERWAKOS, G.; WEBB, C. On the merits of viable cell immobilization. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 559-612, 1991.
3. ERTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.
4. JANG, K. H.; JUNG, S. J.; CHANG, H. S.; CHUN, U. H. Improvement of the process for sorbitol production with *Zymomonas mobilis* immobilized in kappa-carrageenan. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 485-492, 1996.
5. KAWAGUTI, Y. H. **Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose**. Campinas, 2006. 166p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
6. 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.
7. 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.
8. OGBONNA, J. C.; YOSHIFUMI; NAKAMURA, K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, p. 92-96, 1989.