

UNIVERSIDAD ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos

**ESTUDO DOS PARÂMETROS DE ENGENHARIA DE PROCESSO
QUE AFETAM A FISIOLOGIA E A PRODUÇÃO DE INULINASE POR
Kluyveromyces marxianus ATCC16045**

Bernardo Onagar Yépez Silva-Santisteban
**Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP
Ingeniero en Industrias Alimentarias, UNALM**

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

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

Campinas, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Y43e

Yépez Silva-Santisteban, Bernardo Onagar
Estudo dos parâmetros de engenharia de processo que
afetam a fisiologia e a produção de inulinase por *Kluyveromyces
marxianus* ATCC 16045 / Bernardo Onagar Yépez Silva-
Santisteban. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Inulinase. 2. Estresse mecânico. 3. Tensão de
cisalhamento. 4. Oxigênio – Transferência. 5.
Kluyveromyces marxianus. I. Maugeri Filho, Francisco.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Study of process parameters affecting the physiology and the inulinase
production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045

Palavras-chave em inglês (Keywords): Inulinase, Mechanical stress, Shear stress,
Transfer - Oxygen, *Kluyveromyces marxianus*

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Maria Helena Andrade Santana

Silvio Roberto Andrietta

Jonas Contiero

Fátima Aparecida Almeida Costa

Daniel Ibraim Pires Atala

Banca examinadora

Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
CPQBA/UNICAMP

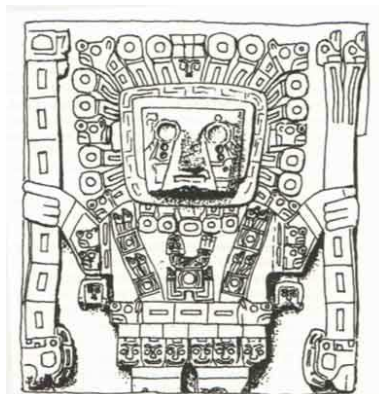
Prof. Dr. Jonas Contiero
DBM/UNESP

Dra. Fátima Aparecida Almeida Costa
DEA/FEA/UNICAMP

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala
FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador - DEA/FEA/UNICAMP

**No seas mentiroso
No seas ladrón
No seas haragán**



*Ama Llulla
Ama Sua
Ama Quella*

Dedicatorias y Agradecimientos

Al **Padre**, fuente y centro de lo más puro de mi existir, por el amor, la voluntad y la oportunidad de progreso y la tan esperada unicidad.

A mis padres: **Eloy** (*in memmoriám*) y **Yolanda**, por la vida, el amor, la confianza y sus oraciones. A mis tíos **Gunter y Violeta, Roque y Flor, Oscar y Augusta, y Horacio y Helena**, por la ayuda desinteresada y por haber sido por muchos momentos un gran soporte. A mis hermanos: **Antonio, Camila y Domingo**, por ser compañeros de lucha, por el esfuerzo constante de entenderme y por la seguridad que tengo de su amor. A **Geraldo y Francisca Duim** por haberme adoptado con tanto cariño.

A mi país, **Perú**, por ser la fuente inagotable de inspiración en el logro de mis metas personales.

A la **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** por la confianza puesta en mí al otorgarme la beca para concretar estos estudios de doctorado y por su fe puesta en los estudiantes extranjeros en las universidades brasileñas.

Al Prof. Dr. Francisco Maugeri por la confianza puesta en mí y la oportunidad de realizar este trabajo, los consejos, y la motivación constante.

Al Prof. Dr. Attilio Converti por su colaboración durante este trabajo.

A la Prof. Dra. Maria Isabel Rodrigues por los consejos respecto al diseño experimental y tratamiento estadístico.

A Fifa (Fátima) por la disposición permanente, las enseñanzas y la amistad. A mis compañeros de laboratorio: Abraão, Angélica, Carlão, Daniel, Danilo, Duzão, Eliane, Fernandinha, Guilopes, Lia, Luciano, Olga, Pedro, Raquel, Saartje y Yemiko por su amistad, espíritu de colaboración, consejos y por haber permitido crear un espacio para discutir el desarrollo y los resultados de este trabajo.

A mis amigos: Alexânde, Armando, Bosch, Junko, Lucas, Mara, Nicolás, Podre, Robinson, Severina y Sueli.

Al **Brasil** y a la **UNICAMP** por todo lo aprendido.

RESUMO GERAL	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVO	4
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. INULINASE E SUA CARACTERIZAÇÃO	5
3.2. APLICAÇÕES DA INULINASE NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	8
3.3. PRODUÇÃO DE INULINASE.....	9
3.4. INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO.....	12
3.5. REGULAÇÃO DO METABOLISMO E A PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS	13
3.6. MECANISMO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS E O CASO DA INULINASE.....	16
3.7. ESTRESSE MECÂNICO EM BIOPROCESSOS.....	18
3.8. REFERÊNCIAS	21
IV. AGITATION, AERATION AND SHEAR STRESS AS KEY FACTORS IN INULINASE PRODUCTION BY <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>	29
4.1. ABSTRACT	30
4.2. INTRODUCTION	31
4.3. MATERIAL AND METHODS	32
4.3.1. FERMENTATION	32
4.3.2. EXPERIMENTAL DESIGN	33
4.3.3. INULINASE ASSAY	33
4.3.4. BIOMASS AND CELLS VIABILITY.....	33
4.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	34
4.4.1. DESIGN 1	34
4.4.2. DESIGN 2	36
4.4.3. OPTIMIZATION OF AGITATION SPEED	39
4.4.4. IMPELLER TYPE.....	40
4.4.5. SHEAR STRESS	42
4.5. CONCLUSIONS	47
4.6. REFERENCES	49
V. EFFECTS OF CARBON AND NITROGEN SOURCES AND OXYGENATION LEVEL ON THE PRODUCTION OF INULINASE BY <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> ATCC 16045	53
5.1. ABSTRACT	54
5.2. INTRODUCTION	54
5.3. MATERIALS AND METHODS.....	56

5.3.1. MICROORGANISM	56
5.3.2. BATCH FERMENTATIONS.....	56
5.3.3. ANALYTICAL METHODS	57
5.4. RESULTS AND DISCUSSION	58
5.4.1. CULTIVATIONS ON MINIMAL MEDIUM	60
5.4.2. CULTIVATIONS ON COMPLEX MEDIUM	67
5.5. CONCLUSIONS	71
5.6. REFERENCES	73

VI. INTRINSIC ACTIVITY OF INULINASE FROM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* ATCC 16045 AND CARBON AND NITROGEN BALANCES..... 77

6.1. SUMMARY	78
6.2. INTRODUCTION	78
6.3. MATERIALS AND METHODS.....	80
6.3.1. MICROORGANISM AND FERMENTATIONS	80
6.3.2. ANALYTICAL METHODS	81
6.3.3. DETERMINATION OF INULINASE ACTIVITY	82
6.3.4. INULINASE PURIFICATION AND CONCENTRATION	82
6.3.5. DETERMINATIONS OF INULINASE MOLAR MASS AND PURITY DEGREE	82
6.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	83
6.4.1. INTRINSIC SPECIFIC INULINASE ACTIVITY	83
6.4.2. CARBON AND NITROGEN BALANCES	85
6.5. CONCLUSIONS	90
6.6. REFERENCES	91

VII. OPTIMIZATION OF SEPARATION BY HPLC OF YEAST METABOLITES USING EXPERIMENTAL DESIGN 94

7.1. ABSTRACT	95
7.2. INTRODUCTION	95
7.3. MATERIAL AND METHODS.....	100
7.3.1. LIQUID CHROMATOGRAPHY AND SAMPLE.....	100
7.3.2. EXPERIMENTAL DESIGN	101
7.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	102
7.4.1. CHROMATOGRAM PROFILE	102
7.4.2. FACTORIAL DESIGN 2 ³	104
7.4.3. CHROMATOGRAM PROFILE AS A RESOLUTION FUNCTION	111
7.5. CONCLUSION	112
7.6. REFERENCES	113

VIII. INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE ENGENHARIA DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE INULINASE EM CULTIVOS CONTÍNUOS POR *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* ATCC 16045 115

8.1. RESUMO.....	116
8.2. INTRODUÇÃO.....	117

8.3. MATERIAL E MÉTODOS	119
8.3.1. MICRORGANISMO	119
8.3.2. SISTEMA CONTÍNUO	119
8.3.3. PERTURBAÇÕES TIPO DEGRAU	120
8.3.4. AMOSTRAGEM E ANÁLISES	120
8.3.5. POTÊNCIA, K_{LA} E TENSÃO DE CISALHAMENTO	121
8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
8.4.1. A VELOCIDADE DE AGITAÇÃO COM IMPULSOR DE PÁS INCLINADAS	122
8.4.2. A VELOCIDADE DE AGITAÇÃO COM DUAS TURBINAS DE DISCO	129
8.4.3. A TAXA DE DILUIÇÃO	131
8.4.4. POTÊNCIA, K_{LA} , TAXA DE DILUIÇÃO E TENSÃO DE CISALHAMENTO: CORRELAÇÕES PARA DESCREVER O PROCESSO	136
8.5. CONCLUSÕES.....	141
8.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
 <u>IX. CONCLUSÕES GERAIS.....</u>	 <u>145</u>
 <u>X. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</u>	 <u>146</u>
 <u>ANEXO I: INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR AO CAPÍTULO VI</u>	 <u>147</u>
 <u>ANEXO II: INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR AO CAPÍTULO VII</u>	 <u>150</u>
 <u>ANEXO III: INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR AO CAPÍTULO VIII</u>	 <u>155</u>

Resumo geral

A produção de inulinase por leveduras em batelada simples foi sensível a tensão de cisalhamento. Em virtude disto o estresse mecânico e a transferência de oxigênio no sistema têm que ser considerados durante o estudo de aumento de escala deste processo. Este processo, em *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, é produto da expressão regulada do gene INU1, e em batelada simples é feita em duas fases, a primeira em nível basal sob repressão catabólica, e a segunda após o consumo total do substrato onde é produzida em grandes quantidades. A produção em meio complexo é maior ao meio mínimo. A melhor concentração de sacarose para produção da enzima foi 30 e 20 g/L em meio mínimo e complexo, respectivamente. A melhor concentração de sulfato de amônio foi 5g/L quando a concentração de sacarose foi de 10 g/L. O enriquecimento do ar, com oxigênio, não eliminou a produção de etanol nem melhorou a produção da enzima em nenhum dos tipos de meio testados. Através de eletroforese SDS-Page, foi determinado a massa molar do monômero da inulinase sendo esta igual a 59 kDa. A atividade específica intrínseca da inulinase obtida foi de 879 UI/mg de inulinase. A inulinase representa menos de 0,1 % de carbono e nitrogênio, sendo desprezível sua consideração num modelo estequiométrico para descrever sua produção. A determinação de metabólitos por HPLC durante o crescimento da levedura foi otimizado usando planejamento experimental e as melhores condições de separação na coluna HPX-87H foram: 40 °C, 0.7 mL/min e fase móvel de H₂SO₄ a pH 1. O estresse mecânico se manifesta em situações de inanição e a inulinase foi produzida em condições drásticas tais como taxas de diluição baixas (0,01 h⁻¹) combinadas com altas tensões de cisalhamento (0,6 Pa). A melhor produção da enzima (50 UI/mL) foi atingida a taxas de diluição de 0,22 h⁻¹ usando duas turbinas de disco a 1200 rpm. Taxas de diluição maiores que 0,36 h⁻¹ provocaram o arraste de células do biorreator. Fatores definidos pela combinação de um ou mais dos seguintes parâmetros: tensão de cisalhamento, consumo de potência, coeficiente de transferência de oxigênio e taxa de diluição, permitiram descrever satisfatoriamente as principais variáveis do processo indicando sua importância no projeto do processo.

Abstract

The inulinase production by yeast in batch bioreactor has been shown to be sensible to shear stress and it was shown that mechanical stress and oxygen transfer are important for the scale up procedures of this process. There are evidences for a regulated mechanism of genetic expression of INU1. Batch cultures of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 produce inulinase at in two phases: the first at basal level, and the other at high levels after total depletion of carbon source. Complex medium is better for inulinase production if compared with minimal composition medium. The best sucrose concentrations for inulinase production were 30 and 20 g/L in minimal and complex medium, respectively. The best ammonium sulfate concentration was 5 g/L for a medium with 10 g/L of sucrose. The air enrichment with O₂ doesn't suppress ethanol formation during yeast growth in both minimal and complex medium. The molecular weight (59 KDa) of the inulinase monomer was determined using electrophoreses SDS-Page, and the intrinsic specific activity (879 UI/mg or inulinase) was calculated. Material balance of carbon and nitrogen were performed and suggested that no more than 0.1% either of the carbon or nitrogen initially present in the medium were incorporated in the extracellular inulinase released under different cultivation conditions. The determination by HPLC of metabolites during yeast growth was optimized by experimental design and the best separation conditions were: 40 °C of HPX-87H column, 0.7 mL/min and mobile phase of H₂SO₄ at pH 1. Continuous cultures suggest that the mechanical stress is performed on starvation conditions, and that low dilution rate (0.01 h⁻¹) and high shear stress (1200 rpm) allow inulinase production. The best inulinase production (50UI/mL) was performed at 0.22 h⁻¹ of dilution rate using two disk turbines and 1200 rpm. The dilution rates higher than 0.36 h⁻¹ promoted the washout. Some factors resulting from the combination of the main parameters design of continuous bioreactors, such as shear stress, power input, oxygen transfer coefficient and dilution rate, were tested to describe the behavior of main process variables, such as biomass, inulinase, viability and dissolved oxygen. These factors were shown to be the relevant in the inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045.

I. Introdução

A inulina é um polímero de frutose que se encontra na natureza como reserva de carboidratos de diversos vegetais. Apresenta vantagens em relação a outros polímeros convencionalmente usados na produção de xaropes ricos em frutose, pela simplicidade do processo e maior grau de pureza do produto final. A inulinase é uma enzima usada na transformação da inulina em frutose. O processo tem uma única etapa de hidrólise da qual se obtém xaropes de até 95% de frutose. Deste fato surgiu o interesse da produção industrial desta enzima. A frutose possui maior poder adoçante em relação à sacarose, e é usada como adoçante natural para diabéticos. A importância das fontes de frutose tem aumentado, e os processos para sua obtenção têm sido amplamente estudados. Recentemente, diversos tipos de inulinase têm adquirido importância devido à sua capacidade de formar oligossacarídeos e também de hidrolisar a sacarose, adquirindo uma posição importante no mercado de enzimas produtoras de polímeros dietéticos e invertases.

Foi comprovado que é possível a produção de inulinase em grande escala por processos fermentativos que utilizam fungos, leveduras e bactérias, sendo em geral a inulina a melhor fonte de carbono em relação a outros açúcares. Não obstante, o uso de leveduras apresenta grande vantagem sobre fungos filamentosos em relação ao potencial de controle do processo em escala industrial. Paralelamente, a sacarose como fonte de carbono neste processo representa uma redução significativa dos custos, e adicionalmente incorpora agentes sócioeconômicos de interesse para a economia brasileira. Os processos de produção de inulinase usando como fonte de carbono a sacarose foram otimizados quanto aos meios de cultivo e alguns parâmetros de fermentação, agitação e aeração principalmente, em sistemas em batelada. Já em sistemas de batelada alimentada e contínuo os estudos tem sido focalizados nos parâmetros de alimentação.

Leveduras do gênero *Kluyveromyces* mostram ser hiperprodutoras de inulinase, sendo uma delas a *K. marxianus* a mesma que tem sido amplamente estudada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos-UNICAMP. Apesar disso, idéias relacionadas à natureza constitutiva ou regulada da enzima, à influência da concentração da fonte de carbono e do nitrogênio na produção da mesma, entre outras questões ainda não foram esclarecidas. Um fato interessante, produto do trabalho desenvolvido neste laboratório, tem sido caracterizar a inulinase produzida por esta cepa, por sua capacidade de formar polímeros de frutose, tais como oligossacarídeos, de grande importância como alimento funcional. A diminuição dos custos da produção desta enzima através do uso de subprodutos agroindustriais tem sido também um foco das pesquisas com cepas deste gênero.

No processo de produção de inulinase, como em todos os processos desempenhados por microrganismo na produção de substâncias de interesse comercial, observou-se que os parâmetros de engenharia de processo, tais como os relacionados à agitação e aeração, influenciam substancialmente nos rendimentos obtidos. Em sistema em batelada, verifica-se que o incremento na produção da inulinase está limitado por fatores que não estão relacionados unicamente à transferência de oxigênio, mas também pode estar sendo influenciado pela sua resposta à fluido-dinâmica imposta ao microrganismo e ao meio de fermentação, a mesma que podem estar relacionada à morte celular e à diminuição da eficiência da produção da enzima.

Um outro aspecto importante no estudo da inulinase é o mecanismo de regulação de expressão gênica que governa sua produção. A repressão catabólica pela fonte de carbono aparece como o principal mecanismo de regulação da produção da inulinase, da mesma forma como acontece na produção de invertase em leveduras do gênero *Saccharomyces*.

Apesar desto, alguns trabalhos encontrado na literatura motram resultado conflitantes em relação a este tema.

Observações relacionadas à viabilidade celular em relação a parâmetros de engenharia de processos e fatos descritos na literatura em relação do estresse mecânico indicam a necessidade de um estudo aprofundado em relação a estes fenômenos, pois interliga aspectos de engenharia de processos com aspectos fisiológicos dos microrganismos envolvidos. Desta forma existe um forte motivo para estudar a morte celular em relação à produção da inulinase.

É importante destacar a inexistência de estudos que proponham modelos que descrevam a fisiologia do processo, sendo de suma importância para melhorar esta tecnologia de processo. Alguns indícios da importância do estresse mecânico neste processo somado a que o mesmo tem sido praticamente inexplorada no caso de leveduras, desafiam um estudo mais aprofundado. O estudo do estresse mecânico tem um grande potencial relacionando os parâmetros de engenharia de processos e os aspectos fisiológicos implicados.

Neste trabalho os resultados foram apresentados no formato de artigos. Primeiramente, dados da literatura foram analisados em termos de estresse mecânico causados pela tensão de cisalhamento, conforme apresentado no item 4. Em seguida, foram explorados alguns aspectos básicos da produção de inulinase relacionados ao mecanismo de produção e dos efeitos da composição do meio de cultura durante fermentações em batelada simples. No capítulo 6, a proposta de modelos estequiométricos que incluam a inulinase foi avaliada como forma de caracterizar este bioprocessos, e para isto o cálculo da atividade específica intrínseca da enzima considerou-se como um aspecto chave. Para melhorar as condições de monitoramento dos metabólicos, incluídos nos modelos estequiométricos, foi feita uma otimização da técnica cromatográfica, dando origem ao item 7. Finalmente o

estudo de alguns parâmetros em sistemas contínuos e a avaliação da tensão de cisalhamento e a cinética de morte celular na produção da enzima foram também estudados no item 8.

II. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi explorar a importância dos parâmetros de engenharia no projeto do processo de produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e na sua fisiologia.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a tensão de cisalhamento como parâmetro de estresse mecânico em batelada simples durante a produção de inulinase por leveduras.
- Avaliar aspectos básicos da fisiologia da produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045o e efeito das fontes de carbono, nitrogênio e oxigênio sobre a mesma.
- Avaliar a ordem de grandeza da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 em função da massa de enzima produzida através do cálculo de sua atividade específica intrínseca e de balanços de carbono e nitrogênio.
- Otimizar a quantificação por cromatografia líquida dos metabólitos produzidos durante a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045.
- Avaliar o efeito da tensão de cisalhamento, consumo de potência, coeficiente global de transferência de oxigênio e da taxa de diluição na produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 em sistemas contínuos.

III. Revisão bibliográfica

3.1. Inulinase e sua caracterização

A inulina é um polímero de origem vegetal que serve como reserva de carboidratos nos *Compositae* e *Gramineae* (Vandamme e Derycke, 1983). A inulina e análogos são polifrutanos formados por cadeias de frutose unidas por ligações lineares β -2-1 com uma unidade de glicose terminal (Grootwassink and Fleming, 1980).

Em 1924 foi descrita a inulinase (E.C.3.2.17) de *Aspergillus niger* por Pringsheim e Kohn (Vandamme e Derycke, 1983). Weidenhagen (1932), citado por Vandamme e Derycke (1983), defendeu a idéia de so ter uma única enzima para hidrolisar sacarose e inulina, rafinose, irisine, gentianose e estaquiose. No entanto, uma das mais estudadas é a inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus*, que tem boa atividade sobre sacarose, inulina, rafinose e levanas (Kushi et al., 1996).

As inulinasas podem ser subdivididas segundo sua especificidade com respeito ao substrato. Muitas inulinasas recebem a designação 2,1- β -D-frutan-frutano-hidrolases, por liberarem uma unidade de frutose terminal da molécula de inulina. Algumas inulinasas como as de *Penicillium spp.* e de *Kluyveromyces fragilis* hidrolisam levanas de bactérias, o que implica na quebra tanto das unidades de frutose nas cadeias de levanas unidas por ligações β -2-6, quanto as unidades de frutose unidas por ligações β -2-1 nas ramificações (Vandamme e Derycke, 1983). Kushi et al. (1996) mencionam que a ação da inulinase sobre a inulina resulta em uma grande quantidade de D-frutose, com uma pequena quantidade de glicose.

As inulinasas podem ser classificadas em *endo*-inulinasas e *exo*-inulinasas. As *exo*-inulinasas desempenham importante papel na hidrólise de inulina agindo sobre as ligações β -2-1 (Vandamme e Derycke, 1983), sendo que as *endo* são responsáveis pela produção

inuloligosacarídeos (Park et al., 1999). Segundo Azhari et al. (1989), as inulinases de *Aspergillus* são também de dois tipos, caracterizados como *endo* e *exo* inulinases. Os dois tipos diferem no peso molecular, mecanismo de degradação da inulina e nas constantes cinéticas. O mesmo autor esclarece que ambas desenvolvem um efeito sinérgico, pois a *endo* inulinase age nas ligações glucosídicas o que incrementa o substrato da *exo*, pois a *exo* age nos terminais de cadeias dos polímeros de frutose. Park et al. (1999) e Jong et al. (1999) tem reportado *endo* inulinases de *Xanthomonas sp.* e *Pseudomonas sp.* respectivamente.

Alguns autores como Contiero (1992), Rouwenhorst et al. (1990); Hensing et al. (1994) e Manzoni e Cavazzoni (1988) reportaram a produção da inulinase extracelular. Manzoni e Cavazzoni (1988), Rouwenhorst et al. (1988) e Rouwenhorst et al. (1990) reportaram também a inulinase associada à parede celular produzida por *Kluyveromyces*. Rouwenhorst et al. (1988), Rouwenhorst et al. (1990) e Espinoza et al. (1992) também fizeram referência à inulinase contida no interior da célula do mesmo microrganismo. Desta forma existem três localizações da inulinase em relação à célula: parede celular, intracelular e extracelular.

A atividade na inversão de açúcares, característica das invertases, é também um aspecto típico das inulinases de fungos e leveduras. Já foi reportada a coexistência de vários tipos de inulinases em cultivos de alguns microrganismos. Segundo Grootwassink e Fleming (1980), ao contrario da invertase de leveduras, a inulinase é uma β -fructofuranosidase não-específica apresentando alta atividade sobre β -(2-1) e β -(2-6)-frutanos de maior ou menor tamanho, como também sobre a sacarose. Os autores comentam que esta propriedade torna as inulinases uma alternativa às invertases para seu uso na indústria. A atividade de inulinolítica (I) é usualmente comparada com a atividade

sacarolítica (S) de um mesmo microrganismo ou extrato enzimático através da razão entre as suas atividades expressa como S/I. As verdadeiras invertases apresentam um valor para esta razão muito alto (1600-28300) (Grootwassink and Fleming, 1980). Por outro lado os valores de S/I para as inulinases são menores que 50 (Vandamme e Derycke, 1983).

A partir dessas informações relatada concluiu-se que existem diferenças no papel das inulinases na fisiologia do microrganismo, que por sua vez depende das condições de cultivo. Já Rouwenhorst et al. (1990) conseguiram definir diferenças estruturais e funcionais entre diferentes tipos de inulinases, estabelecendo que a inulinase extracelular e a contida na parede celular são formadas por subunidades semelhantes, mas elas se diferenciam pela massa molar, pois a enzima extracelular é um dímero, enquanto que a contida na parede é um tetrâmero. Observaram também que a purificação por cromatografia de troca aniônica com DEAE-Sephadex A-50 de ambos tipos de enzima resultou na sua eluição em diferentes forças iônicas.

Rouwenhorst et al. (1990) concluíram que a natureza extracelular da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* está relacionada à impermeabilidade da inulina na parede celular da levedura, enquanto que a presença de enzima ligada na parede celular estaria orientada a auxiliar no metabolismo de cadeias menores de oligofrutossacarídeos. Observaram também que modificações na localização da enzima e na concentração de inulina alteram a capacidade metabólica do microrganismo já que estes fatores limitam a disponibilidade de fonte de carbono. Já Kaur et al. (1992) verificaram que o *Fusarium oxysporum* produz quatro tipos de enzimas diferentes usando meios enriquecidos com frutanos e sacarose.

Azhari et al. (1989) também identificaram dois tipos de enzimas diferenciadas por cromatografia de troca iônica com CM-Sepharose, eluídas em diferentes condições de força iônica. Posteriormente diferenciaram estes tipos de enzima segundo seu modo de ação na hidrólise, estabelecendo que a primeira é uma enzima *endo* e a segunda uma enzima *exo*.

Finalmente, a inulinase não é produzida como um complexo de isoenzimas, como é o caso da invertase, apesar delas cumprir a mesma função mas em microrganismos diferentes.

3.2. Aplicações da inulinase na indústria de alimentos

Xaropes de alto conteúdo de frutose são produzidos a partir da hidrólise de amido de milho e uma isomerização enzimática da glicose. A inulinase microbiana aparece como uma alternativa a este processo, pois a partir de inulina permite obter-se alta conversão em frutose, (Vandamme e Derycke, 1983). Manzoni e Cavazzoni (1992) conseguiram rendimentos de até 80% na hidrólise de inulina pura e de extratos de alcachofra de Jerusalém usando inulinase extracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Bajpai e Margaritis (1986) otimizaram a produção de xaropes concentrados de frutose a partir de extrato de alcachofra de Jerusalém, fonte natural de inulina, usando células inativas de *Kluyveromyces marxianus* e imobilizadas em alginato de sódio. As células imobilizadas foram acondicionadas em reator de leito empacotado e usadas em processo contínuo.

Guiraud et al. (1981) concluíram que as leveduras com atividade de inulinase podem ser usadas na produção de etanol, tendo como matéria prima um extrato fermentescível de alcachofra de Jerusalém. Os autores propõem um método que permite atingir rendimentos entre 25 e 65 hL etanol/ha , além da forragem. Pejin et al. (1993) estudaram outro método com o mesmo objetivo usando *Kluyveromyces marxianus*, e quando comparado com a *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se vantajosa devido à matéria prima não precisar de acondicionamento e requisitar menor consumo de energia.

Além dos usos hidrolíticos da inulinase, é possível a síntese de polímeros solúveis em água, atingindo níveis de até 51g/L, segundo foi observado por Santos (1998). Esses polímeros caracterizados como frutooligossacarídeos foram identificados como kestose e

nistose. Sobotka et al. (1997) avaliou a inulina como fibra, afirmando que a boa tolerância torna-a uma fonte potencial de fibra. O uso de *endoinulinases* sobre inulina permite a produção de inulooligossacarídeos (Mitsui Toatsu Chem INC, 1995). Algumas inulinases têm a capacidade também de sintetizar inulooligossacarídeos cíclicos de 6-8 frutoses que podem ser usados como fixadores de aroma (Maruzen Kasei Co LTD, 1990). É possível também a produção de di:frutose di:anhidrido III usando a inulinase partindo de inulina, composto este caracterizado como um adoçante de baixo conteúdo calórico (Zuckerverbund Nord Ag et al., 1998; Mitsubishi Kasei Corp, 1991).

3.3. Produção de inulinase

A produção de inulinases por diversos microrganismos ha sido amplamente reportada na literatura. Dentre os principais parâmetros discutidos deste processo estão a composição do meio de cultura para a produção de inulinase, principalmente relacionados à fonte de carbono e nitrogênio. Também o pH e a temperatura têm sido estudados para diferentes cepas. As condições de agitação e aeração serão tratadas no item seguinte. A Tabela 1 apresenta os resultados de testes fisiológicos aplicados a três espécies do gênero *Kluyveromyces*, onde diferentes fontes de carbono foram utilizadas em condições de aerobiose ou anaerobiose.

Kalil (2000) otimizou um meio sintético para produção de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em shaker após 48 horas de fermentação, obtendo na condição ótima 72 UI/mL. Em contraste a GrootWanssink e Fleming (1980), Kalil (2000) observou que o pH da fermentação influenciou muito na produção da inulinase.

Tabela 1. Resposta de espécies de *Kluyveromyces* a testes fisiológicos.

Teste	K. marxianus	K. bulgaricus	K. fragilis	Teste	K. marxianus	K. bulgaricus	K. fragilis
D-glicose F	+	+	+	Etanol A	+	+	+
D-galactose F	+/-	+	+	Glicerol A	+	+	+
Sacarose F	+	+	+	Eritritol A	-	-	-
Maltose F	-	-	-	Ribitol A	+	+/-	+/-
Celobiose F	-	-	-	Galactitol A	-	-	-
Trehalose F	-	-	-	D-manitol A	+	+/-	+
Lactose F	+/-	+/-	+	D-glucitol A	+	+	+
Melobiose F	-	-	-	Metil α -D-glicosídeo A	-	-	-
Rafinose F	+	+	+	Salicina A	+	+/-	+
Melezitose F	-	-	-	Lactato A	+	+	+
Inulina F	+	+/-	+/-	Succinato A	+	+	+
Amido F	-	-	-	Citrato A	+/-	-	+/-
Metil α -D-glicosídeo F	-	-	-	Inositol A	-	-	-
D-glicose A	+	+	+	Arbutina A	+	+/-	+
D-galactose A	+	+	+	Nitrato A	-	-	-
L-Sorbitol A	+/-	-	+/-	Etilamina A	+	+	+
Sacarose A	+	+	+	Não vitaminas A	-	-	-
Maltose A	-	-	-	10% NaCl, 5% glicose A	+/-	+/-	+/-
Celobiose A	+	-	+	50% glicose A	-	-	-
Trehalose A	-	+/-	-	60% glicose A	+/-	+/-	+/-
Lactose A	+/-	+/-	+	37 °C A	+	+	+
Melobiose A	-	-	-	Formação de éster A	+/-	+/-	+/-
Rafinose A	+	+	+	Produção de ácido A	+/-	+/-	+/-
Melezitose A	-	-	-	Resistência cicloheximide A	+	+	+
Inulina A	+	+	+	Crescimento em Glucono-d-lactone A	+/-	+/-	+/-
Amido A	-	-	-	Crescimento em 2-ceto gluconato A	+/-	+/-	+/-
D-xilose A	+	+/-	+	Crescimento em 5-ceto gluconato A	+/*-	+/-	+/-
L-arabinose A	+	+/-	+	Crescimento em nitrito A	+/-	+/-	+/-
D-arabinose A	-	-	-	Liquefação de gelatina A	+/-	+/-	+/-
D-ribose A	+/-	-	+/-	Hidrólise de uréia A	+/-	+/-	+/-
L-rhamnose A	-	-	-	Produção de amido A	+/-	+/-	+/-

F: testes em condições de fermentação A: testes em condições de crescimento aeróbio.

+: positivo; -: negativo; +/-: forma observados ambas respostas.

Fonte: Barnett e Pankhurst (1974).

Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278 produziu 52,84 UI/mg de biomassa tendo como fonte de carbono 0,25% de inulina, sendo assim considerado um hiperprodutor de inulinase (Cruz-Guerrero et al., 1995). *Staphylococcus* sp. RRL1 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC52466 produziram 618 UI/L e 470,4 UI/L, respectivamente, de inulinase extracelular quando crescidos em meio líquido contendo inulina como única fonte de carbono (Selvakumar e Pandey, 1999). *Kluyveromyces fragilis* em cultivo contínuo em meio contendo sacarose como única fonte de carbono e substrato limitante produz

inulinase, sendo que a máxima quantidade de enzima foi formada a baixas taxas de diluição ($0,09\text{h}^{-1}$) devido ao efeito da repressão catabólica. No entanto, o pH não influenciou a produção na faixa de 3,5 até 6 e a concentração de oxigênio dissolvido entre 2,5 e 40 % de saturação. O rendimento de atividade-biomassa foi 38,9 UI/mg. Cultivos contínuos, produziram o dobro de enzima em comparação a cultivos em batelada (GrootWanssink e Fleming, 1980).

A atividade de inulinase obtida de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em cultivo contínuo sobre sacarose (52 UI/mg de biomassa) foi relacionada à parede celular e teve uma S/I de 15. Entretanto com sacarose e inulina obteve-se rendimentos maiores quando comparados com os obtidos usando glicose e lactose (Rouwenhorst et al., 1988). Os mesmos autores observaram que aparentemente a temperatura ótima de produção da enzima, entre 37 e 42°C, coincide com a temperatura ótima de crescimento da levedura.

A sacarose e a frutose foram pobres indutores da produção de inulinase comparadas com a inulina como fonte de carbono, em um processo de fermentação com *Kluveromyces fragilis*, que produz 1,4 UI/mL de inulinase extracelular após 36 h de crescimento a 25-27°C (Gupta et al., 1994). Poorna e Kulkarni (1995), usando um planejamento fatorial, mostraram que a inulina foi a fonte de carbono com maior influência positiva sobre a produção de inulinase em cultivos de *Aspergillus niger*, obtendo 80 UI/mL. Quando a sacarose foi a fonte de carbono, a atividade foi 25 UI/mL. Parekh e Margaritis (1985) confirmaram, em um processo de batelada simples com *Kluyveromyces marxianus*, que a sacarose é a segunda melhor fonte de carbono, depois da inulina. Eles obtiveram 63,5 UI/mL com sacarose como fonte de carbono e 212 UI/mL quando a fonte foi inulina. Rouwenhorst et al. (1988) explicam que independentemente das condições de cultivo, aproximadamente 50% do conteúdo da inulinase em cultivos de *Kluyveromyces marxianus*

são excretados no meio de crescimento em um quimiostato, enquanto que outros trabalhos indicaram que a maior produção de inulinase acontecia com sacarose limitante.

Rouwenhorst et al. (1988) obtiveram considerável produção de inulinase com *Kluyveromyces marxianus* usando etanol e glicerol como fonte de carbono, enquanto que obtiveram baixa produção com glicose e lactose. Observaram também que a temperatura afetou significativamente a produção da enzima, sendo que a 40°C obteve a maior produção, mas também observaram que a localização (extracelular, parede celular e intracelular) da enzima foi também afetada. Também o incremento do pH do meio estimulou a liberação da enzima desde a parede celular provocando falso incremento da produção de enzima extracelular.

3.4. Influência da aeração e agitação

Outros parâmetros importantes na produção de inulinase são aqueles relacionados à agitação e aeração. Snider e Phaff (1962), observaram que *Kluyveromyces fragilis*, cultivado sem aeração cresceu pouco e a síntese de inulinase foi baixa. Grootwassink e Fleming (1980) estudaram o efeito da aeração no mesmo microrganismo com mais detalhes, verificando que uma variação da concentração de oxigênio dissolvido de 2,5 a 40% de saturação aparentemente não influenciou a formação de biomassa e inulinase. Usando *Penicillium sp*, Kim (1975) citado por Vandamme e Derycke (1983), obteve os rendimentos máximos de inulinase depois de 72 horas de crescimento em agitador rotatório a 120 rpm. Entretanto, os cultivos em superfície resultaram em menores rendimentos, inclusive depois de 120 horas de incubação.

Wei et al. (1998) observaram que a influência do volume de meio de cultivo na fermentação de *Kluyveromyces sp* Y-85 em shaker foi inversamente proporcional à produção de inulinase e biomassa, devido a que o aumento do volume do meio diminuiu o coeficiente de transferência de oxigênio. No mesmo trabalho foi feita a ampliação de escala

de 15 L a 1000 L usando as mesmas condições de aeração, pressão, inóculo, temperatura de fermentação e velocidade de agitação, obtendo-se em ambos os casos atividades mais altas que aquelas obtidas em *shaker*. Parekh e Margaritis (1985), em uma fermentação com sacarose pelo método de batelada simples por *Kluyveromyces marxianus*, produziram 60 U/mL. Nesse processo usaram velocidade de agitação de 250 rpm e aeração de 1,0 vvm.

Os critérios de ampliação de escala deste processo também têm sido objeto de estudo. Nesse sentido, Pessoa et al. (1996) usou como critério de aumento de escala em um processo de produção de inulinase com *Candida kefir* manter constante o K_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de massa). A maior produção de inulinase foi atingida com um K_{La} de 46 h^{-1} para um volume de 15 L. O aumento de escala até 300 L foi feito mantendo o K_{La} constante. Os resultados mostraram que ambos os processos resultaram em atividades de inulinase semelhantes.

Yépez Silva-Santisteban (2001) verificou que o efeito da agitação e aeração sobre a produção da inulinase, em cultivo em batelada de *Kluyveromyces marxianus*, depende dos níveis das mesmas, sendo que em baixos níveis de agitação e aeração ambas têm efeito positivo, enquanto que em altos níveis só é importante o efeito da agitação. Também observou que o incremento da agitação, até 550 rpm, provocou o incremento do K_{La} , sem provocar um incremento da produção da enzima.

3.5. Regulação do metabolismo e a produção de enzimas em leveduras não convencionais

Para compreender melhor um bioprocessos é importante considerar os mecanismos de controle do metabolismo no qual está envolvido. O metabolismo global dos seres vivos esta regulado em diferentes níveis. Pode ser ao nível do DNA quando são provocadas mudanças na estrutura do gene, um caso disto é a variação de fase. Quando ocorre ao nível do mRNA existe uma modulação da frequência de transcrição do gene como acontece na

indução ou na repressão. Se for ao nível da proteína quer dizer que há uma modulação da frequência da tradução do mRNA durante a síntese da proteína. Um exemplo deste mecanismo é a produção de proteínas ribossomais. Quando a proteína já foi sintetizada e a função da proteína é controlada por uma modificação pós-traducional se diz que foi ao nível de proteína modificada e um exemplo disso é a adenilação da glutamina sintase. Finalmente se a função catalítica da proteína sintetizada é modulada pela concentração de pequenos ligantes, podemos dizer que o controle do metabolismo foi ao nível da atividade enzimática, sendo que várias enzimas das vias biosintéticas ou reguladoras estão sujeitas a este tipo de mecanismo de controle (Mendoza, 2004).

A síntese de inulinase está diretamente relacionada ao metabolismo de carbono, sendo praticamente o ponto de partida do mesmo, por isso é necessário o entendimento dos mecanismos de regulação específicos deste caso. Existe muita informação sobre os componentes das vias de metabolismo de açúcares em *Saccharomyces cerevisiae*, porém esta informação tem sido assumida como válida para outros tipos de leveduras. Muitas variações bioquímicas e genéticas existem em relação ao uso de vias metabólicas para os açúcares, principalmente em leveduras não convencionais (NCY). Por exemplo, a respiração em presença de oxigênio no metabolismo dos açúcares. Dentro as leveduras não convencionais estão as dos gêneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Cândida*, *Yarrowia* e *Schizosaccharomyces* (Flores et al., 2000). Os mesmos autores, afirmam que o conhecimento preciso do mecanismo de regulação é de extremo interesse quando se pretende modificar organismos para usos específicos ou para modelagem da conduta de sistemas industriais com NCY.

Os mecanismos clássicos de regulação do metabolismo de açúcares são descritos por Fiechter et al. (1981) e os mesmos que estão relacionados com o balanço entre respiração e fermentação (Pronk et al., 1996), uns relacionados à presença de oxigênio e

outros à presença de glicose. O efeito Pasteur é definido como a inibição da via glicolítica em presença de oxigênio, o mesmo que se manifesta com a não formação de etanol. Um efeito oposto é o efeito Custers, descrito como a inibição da formação de etanol na ausência de oxigênio e o estímulo do mesmo na presença de oxigênio. O efeito Crabtree (De Deken, 1966) é definido como a repressão da atividade respiratória na presença de glicose, em condições aeróbicas, o que manifesta a glicólise com formação de etanol. Têm sido descritos dois tipos de efeito Crabtree, o long-term, definido como a fermentação alcoólica aeróbica com altas velocidades de crescimento independente da limitação ou excesso de açúcar. Este seria provocado pela insuficiente capacidade da via respiratória para consumir o piruvato. Entretanto, o *short-term*, definido como a fermentação alcoólica instantânea depois de provocar uma mudança desde uma condição de limitação de açúcar até excesso da mesma, seria provocado pela saturação da via respiratória levando a um sobre-fluxo ao nível do piruvato. O efeito Kluyver descreve a ausência de fermentação alcoólica durante crescimento com um açúcar, geralmente um dissacarídeo, em condições em que a glicose é rapidamente fermentada (Pronk et al., 1996).

A repressão catabólica é definida como o processo no qual açúcares facilmente usados no metabolismo provocam a repressão da transcrição de genes que codificam as enzimas necessárias para o uso de fontes alternativas de carbono (Flores et al. 2000). Já Fiechter et al. (1981) esclarecem que a repressão catabólica é historicamente referida ao efeito da glicose, pois em leveduras a glicose é o principal substrato regulador em condições aeróbicas, mas aparentemente não é um fenômeno restrito à mesma. Enzimas como hexoquinase II em leveduras estão implicadas na repressão catabólica de enzimas como invertase e maltase, as mesmas relacionadas ao uso de diferentes fontes de carbono (Entain, 1980). Em *Kluyveromyces lactis* a glicose exerce repressão catabólica da invertase, a mesma que é codificada pelo gene *KIINV1* (Georis et al., 1999).

3.6. Mecanismo de expressão gênica de proteínas e o caso da inulinase

A expressão de um gene provoca o início da sequência de síntese de uma proteína, começando pela transcrição, síntese de RNAm e terminando com a proteína em plena atividade. Desta forma o início da transcrição é um ponto de regulação principal da expressão gênica. A expressão dos genes nos seres vivos pode ser de dois tipos. Um gene pode ser expresso constitutivamente se sua expressão é invariável, indicando que em qualquer condição de crescimento à que esteja submetido, a expressão do gene será a mesma, sem sofrer nenhum mecanismo de regulação. Caso contrário um gene pode ser expresso de uma forma regulada, onde sua expressão esta sujeita a algum mecanismo de regulação, aumentando ou diminuindo sua expressão, em resposta a sinais moleculares de dentro ou de fora da célula (Lehninger, 2005).

Quando um gene é expresso de forma regulada, esta expressão pode ser induzível e/ou reprimível. Se for induzível significa que a expressão gênica aumenta sob circunstâncias moleculares particulares, podendo dizer que o gene está sujeito a indução. Se o gene for reprimível significa que a expressão do gene diminui, também como resposta a um sinal molecular. Estes mecanismos de repressão e indução podem se dar a nível transcricional. O início da transcrição está marcado pela ligação da RNA polimerase sobre o DNA num sítio específico chamado promotor. As características do promotor influenciam a afinidade de sua ligação com a RNA polimerase alterando a frequência do início da transcrição. Os sinais reguladores agem aumentando ou interferindo na interação entre RNA polimerase com o promotor. Desta forma o nível basal transcricional é determinado pela afinidade do promotor com a maquinária transcricional *in vivo* na ausência de qualquer sequência reguladora, sendo que no caso de procariotes, os promotores têm maior afinidade pela RNA polimerase se comparado com os eucariotes. Esta maior afinidade permitiria maior produção ao nível basal (Lehninger, 2005).

O início da transcrição está regulado por três tipos de proteínas que agem como sinais moleculares: os fatores de especificidade que alteram a especificidade da RNA polimerase pelo promotor, os repressores que impedem o acesso da RNA polimerase ao promotor, e finalmente os ativadores ou indutores que agem aumentando a interação da RNA polimerase com o promotor. Num segundo nível temos os efetores que se ligam nos repressores influenciando positivamente ou negativamente na ligação do repressor com o DNA, da mesma forma agem os intensificadores sobre os ativadores (Lehninger, 2005).

No caso específico da inulinase, em *Kluyveromyces marxianus*, é codificada pelo gene *KmINU1* o mesmo que tem sido clonado e seqüenciado por Laloux et al. (1991) e sua expressão tem sido confirmada por ser reprimida por glicose em nível transcricional (Cassart et al., 1997). Nesse sentido, usando cepas diferentes do mesmo microrganismo, Yépez Silva-Santisteban (2001) e Schneider (1996) observaram que a inulinase é produzida logo após o consumo total do substrato, independentemente da disponibilidade de oxigênio. Também Yépez Silva-Santisteban (2001) observou que a produção da inulinase esteve parcialmente associada ao crescimento e que a velocidade específica de crescimento foi influenciada pela intensidade de agitação provavelmente pela melhor disponibilidade de oxigênio.

Apesar dos conceitos descritos acima, na literatura existe confusão em relação à natureza constitutiva ou regulada da produção da inulinase, aparentemente pela errônea interpretação de resultados e aplicação dos respectivos termos, constitutiva e indutiva. Apesar de muitos autores descrever a produção da inulinase sujeita a indução e/ou repressão (Grootwassink e Fleming, 1980; Grootwassink e Hewitt, 1983; Kushi et al., 1996; Poorna e Kulkarni, 1995), outros decrevem-na como sendo parcialmente constitutiva (Cruz-Guerrero, et al., 1995), constitutiva (Noratto e Campos, 2000), ou mesmo sendo sujeita a

indução/repressão é produzida na ausência de indutor (Schwan et al., 1997), dificultam o entendimento deste processo.

3.7. Estresse mecânico em bioprocessos

As forças hidrodinâmicas impostas pela necessidade de agitação e aeração afetam os cultivos de microrganismos em múltiplas formas segundo Märkl e Bronnenmeier (1985). O mesmo autor indica que os efeitos das forças hidrodinâmicas são manifestados sobre dois aspectos: a morfologia do microrganismo, liberação de conteúdo intracelular e sobre a fisiologia do mesmo. O dano gerado pelo estresse mecânico é definido como a resultante de todos os efeitos gerados mecanicamente e que alteram negativamente o objetivo da técnica de processo, neste caso a produção da enzima (Märkl e Bronnenmeier, 1985).

No caso de microrganismos filamentosos, Papagianni et al. (1998) verificaram que as forças mecânicas resultantes da rotação dos agitadores podem causar variações do crescimento e formação de produtos, além do desenvolvimento de formas morfológicas diferentes e ruptura de filamentos. Pela importância industrial dos microrganismos filamentosos, as relações entre os parâmetros mecânicos, a morfologia e a produtividade tem preocupado muitos pesquisadores. Os mesmos autores estabeleceram relações entre a morfologia do *Aspergillus niger* e a produção de ácido cítrico em biorreator tubular *loop* e em tanque agitado. Eles conseguiram definir um parâmetro dimensional de mistura em função do tempo de mistura que permitiu estabelecer relações entre a morfologia e a produtividade independentemente do tipo de reator.

Jüsten et al. (1996) observaram que a morfologia de *Penicillium chrysogenum* variou segundo diferentes geometrias de agitador e densidade de potência. Os mesmos estabeleceram um parâmetro de mistura, em função da dissipação de energia e a circulação no reator, correlacionando-as com o dano nas hifas. Já Jüsten et al. (1998) observaram para uma mesma densidade de potência, mudanças na morfologia do fungo, na velocidade

específica de crescimento e de produção de penicilina em função da geometria do agitador. Também a velocidade específica de crescimento e de produção de penicilina foram correlacionadas com uma função da dissipação de energia e circulação.

Dunlop et al. (1994) quantificaram a sensibilidade fluido-mecânica de células vegetais medindo vários parâmetros biológicos, como a capacidade de retomar o crescimento, integridade da membrana, atividade mitocondrial, tamanho dos agregados celulares e lise celular. Com o propósito de avaliar o estresse mecânico eles propuseram uma variável hidrodinâmica crítica, derivada de um modelo no qual a atividade biológica das células após um determinado período em ambiente cisalhante teve um efeito acumulativo do trabalho total feito pelas forças do fluido sobre a célula. Esta variável hidrodinâmica, calculada como a dissipação de energia total por unidade de volume, permitiu quantificar sobre uma base comum as forças de cisalhamento provocadas pela agitação em condições de regime laminar ou turbulento. Os autores conseguiram correlacionar a sensibilidade fluido-mecânica com esta variável hidrodinâmica em diferentes condições.

Um fato importante é aquele observado por Frangos et al. (1988) sobre células animais, onde efeitos consideráveis sobre o metabolismo celular foram detectados quando as células foram expostas a níveis de cisalhamento abaixo daqueles que provocam lise ou dano físico na célula. No caso de leveduras, Yépez Silva-Santisteban (2001) observou que a produção de inulinase diminuiu quando a agitação foi maior que 450 rpm, apesar do incremento na velocidade de transferência de oxigênio. Verificou-se, no entanto, uma queda brusca da viabilidade celular, podendo existir um fenômeno de estresse mecânico. Além disso, foi observado que a viabilidade celular foi uma função do tipo de agitador e da velocidade de agitação.

Segundo Märkl e Bronnenmeier (1985), o dano mecânico pode ser gerado por dois mecanismos: a rápida mudança de pressão sobre a pá do agitador, acompanhada pela aceleração do microrganismo e a elevada tensão de cisalhamento que existe na extremidade da pá do agitador. Estes mecanismos comumente funcionam em combinação.

Recentemente, tem sido usada a citometria de fluxo como uma técnica poderosa para o estudo do estresse mecânico em leveduras e bactérias, embora tenha sido classicamente usada no estudo de células animais. Esta técnica permite a rápida caracterização de uma população de células usando luz dispersa, sendo que a introdução de uma coloração fluorescente específica faz possível obter importante informação relacionada à fisiologia e viabilidade celular. Estes estudos têm demonstrado que qualquer mudança observada no desempenho das leveduras e bactérias estudadas, com a intensidade de agitação ou aeração e da escala de operação do bioreator não pode ser atribuída ao estresse fluidodinâmico relacionado à turbulência provocada pelos impulsores ou mesmo pela quebra de bolhas no reator. Porém estes estudos questionam que estas observações poderiam variar em função da cepa utilizada e que combinações de diferentes tipos de estresse, hidrodinâmico com altas concentrações de etanol, no caso de leveduras por exemplo, poderiam agir sinergicamente para causar dano nas células (Boswell et al., 2003; Chamsartra et al., 2005; Hewitt et al., 1998).

3.8. Referências

1. AZHARI R.; SZLAK A.M.; ILAN E.; SIDEMAN S.; LOTAN N. Purification and characterization of *endo*- and *exo*-Inulinase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.11, p.105-117, 1989.
2. BAJPAI P.; MARGARITIS A. Optimization studies for production of high fructose syrup from jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v.21(1), p.16-18, 1986.
3. BARNETT, J.A; PANKHURST, R.J. 1974. **A new key to the yeast**. North-Holland Publishing Company-Amsterdam-London, American Elsevier Publishing Co., Inc.- New York.
4. BOSWELL C.D.; NIENOW A.W.; GILL N.K.; KOCHARUNCHITT S.; HEWITT C.J. Impact of fluid mechanical stress on *Saccharomyces cerevisiae* cells during continuous cultivations in agitated, aerated bioreactor; its implications for mixing in the brewing process and aerobic fermentations. **Trans IchemE**, v.81(C), p.1-10, 2003.
5. CASSART J.P.; ÖSTILING J.; RONNE H.; VANDENHAUTE J. Comparative analysis in three fungi reveals structurally and functionally conserved regions in the Mig1 repressor. **Molecular General Genetic**, v.255, p.9-18, 1997.
6. CHAMSARTRA S.; HEWITT C.J.; NIENOW A.W. The impact of fluid mechanical stress on *Corynebacterium glutamicum* during continuous cultivations in an agitated bioreactor. **Biotechnology Letters**, v.27, p.693-700, 2005.
7. CONTIERO J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus***, Campinas, 1992, 276 p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

8. CRUZ-GUERRERO A.; GARCIA-PEÑA I.; BARZANA E.; GARCIA-GARIBAY M.; GOMEZ-RUIZ L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80(2), p.159-163, 1995.
9. DE DEKEN R.H. The Crabtree effects and its relation to petite mutation. **Yeast**, v.14, p.157-165, 1966.
10. DUNLOP E.; NAMDEV K.P.; ROSENBERG M.Z. Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. **Chemical Engineering Science**, v.49(14), p.2263-2276, 1994.
11. ENTAIN K.D. Genetic and biochemical evidence for hexokinase pII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. **Molecular General Genetic**, v.178, p.633-637, 1980.
12. ESPINOZA P.; BÁRZANA E.; GARCÍA-GARIBAY M.; GOMEZ-RUIZ L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. **Biotechnology Letters**, v.14(11), p.1053-1058, 1992.
13. FIECHTER A.; FUHRMANN G.F.; KAPPELI O. **Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells**. In: Advances microbial physiology. Edited by A.H. Rose and J. Gareth Morris, Academic Press, v.22, p.123-183, 1981.
14. FLORES C.-L.; RODRIGUEZ C.; PETIT T; GANCEDO C. Carbohydrate and energy-yielding in non-conventional yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.507-529, 2000.
15. FRANGOS J.A.; MCINTIRE L.V.; ESKIN S.G. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, p.1053-1060, 1988.

16. GEORIS I.; CASSART, J.P.; BREUNIG, K.D.; VANDENHAUTE J. Glucose repression of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene *KIINV1* does not require *Mig1p*. **Molecular and General Genetics**, v.261 (4-5), p.862-870, 1999.
17. GROOTWASSINK J.W.D.; FLEMING S.E. Non-specific β -fructofuranosidase (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.2, p.45-53, 1980.
18. GROOTWASSINK J.W.D.; HEWITT G.M. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, v.129, p.31-41, 1983.
19. GUIRAUD J.P.; DAURELLES J.; GALZY P. Alcohol production from jerusalem artichoke using yeast with inulinase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p. 1461-1465, 1981.
20. GUPTA A.K.; SINGH D.P.; KAUR N.; SINGH R. Production, purification and immobilisation of inulin. **Chemical Technology and Biotechnology**, v.59, p.377-385, 1994.
21. HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.516-521, 1994.
22. HEWITT C.J.; BOON L.A.; MCFARLAND C.M. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in agitated bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.59(5), p.612-620, 1998.

23. JONG W.Y.; YONG J.C.; CHII H.S.; SEUNG K.S. Microbial production on inulo-oligosaccharides by an endoinulinase from *Pseudomonas* sp. expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87(3), p.291-295, 1999.
24. JUSTEN P.; PAUL G.C.; NIENOW A.W.; THOMAS C.R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, p.672-684, 1996.
25. JUSTEN P.; PAUL G.C.; NIENOW A.W.; THOMAS C.R. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.59(6), p.762-775, 1998.
26. KALIL S.J. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido**, Campinas, 2000, Tese Doutorado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
27. KAUR, N.; KAUR, M.; GUPTA, A.K.; SINGH, R. Properties of β -fructosidases (Invertase and Inulinase) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intibus* roots. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.53, p.279-84, 1992.
28. KUSHI R.T.; HOJO O.; TREVISAN H.C.; MONTI R.; CARVALHO A.; CONTIERO J. **Estudo da inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus***, XI Simpósio Nacional de Fermentações São Carlos-SP. 31 julho- 2 agosto 1996.
29. LALOUX O.; CASSART J.P.; DELCOUR J.; BEEUMEN J.; VANDENHAUTE J. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. **FEBS-Letters**, v.289 (1), p. 64-68, 1991.

30. LEHNINGER A.L. **Lehninger's principles of biochemistry**. 2005. Editado por Nelson DL e Cox MM, 4° Ed., 1119 p.
31. MANZONI M.; CAVAZZONI V. Extracellular inulinase from four yeasts. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, v.21, p.271-274, 1988.
32. MANZONI M.; CAVAZZONI V. Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem artichoke) fructanos by extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.54, p.311-315, 1992.
33. MÄRKL H.; BRONNENMEIER R. **Mechanical stress and microbial production**, In: Fundamentals of Biochemical Engineering: Biotechnology, Volume Editor: H. Brauer VCH, 1985, v.2, cap.18.
34. MARUZEN KASEI Co LTD, Novel inulinase prepn.- by culturing bacterial attrain in the culture medium contg. fructose polymer i.e. inulin and then recovering inulinase accumulated, JP 02255085-A, 10-15-1990.
35. MENDOÇA L.L., <http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbiology/regulation2004.pdf>, 2004.
36. MITSUBUSHI KASEI CORP, Prepn. Of di: fructose di:anhydride useful as sweetner- by reacting inulin and inulinase as obt. from *Artherobacter* sp, JP3259090-A, 11-19-1991.
37. MITSUI TOATSU CHEM INC, A new DNA encoding endo-inulinase- useful for the production of inulo-oligosaccharides, JP07059574-A, 3-7-1995.
38. NORATTO G.; CAMPOS D. Producción de inulinasa (2,1-β-D-fructan fructanohidrolasa) a partir de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281. **Anales Científicos UNALM**, v.45, p.193-210, 2000.
39. PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred

- tank and a tubular loop bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.2, p.197-205, 1998.
40. PAREKH S.; MARGARITIS A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.446-448, 1985.
 41. PARK J.P.; BAE J.T. YOU D.J.; KIM B.W.; YUN J.W. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endo inulinase from *Xanthomonas sp.* **Biotechnology Letters** v.21(12), p.1043-1046, 1999.
 42. PEJIN D.; JAKOVLJEVIC J.; RAZMOVSKI R.; BERENJI J. Some possibilities for the cultivation and processing of jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus*). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75(1), p.79-81, 1993.
 43. PESSOA A.; VITOLO M.; HUSTEDT H. Use of K_{La} as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57(8), p.669-709, 1996.
 44. POORNA V.; KULKARNI P.R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional desing. **Bioresource Technology**, v.54(3), p.315-320, 1995.
 45. PRONK J.T.; STEENSMA H.Y.; VAN DIJKEN P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.12, p.1607-1633, 1996.
 46. ROUWENHORST R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL J.; SCHEFFERS A.W.; VAN DIJKEN J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, **Applied and Enviromental Microbiology**, v.56(11), p.3337-3345, 1990.
 47. ROUWENHORST R.J.; VISSER L.E.; VAN DER BAAN A.A.; SCHEFFERS W.A.; VAN DIJKEN J.P. Production, distribution, and kinetic properties of

- inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54(5), p.1131-1137, 1988.
48. SANTOS A. **Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus***, Campinas, 1998. 86p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
49. SCHNEIDER A. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**, Florianópolis, 1996. 137p. Tese Mestrado em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
50. SCHWAN R.F., COOPER R.M., WHEALS A.E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.234-44, 1997.
51. SELVAKUMAR P.; PANDEY A. Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture. **Bioresource Technology**, v.69(2), p.123-127, 1999.
52. SOBOTKA L.; BRATOVA M.; SLEMROVA M.; MANAK J.; VIZD'A J.; ZADAK Z. Inulin as the soluble fiber in liquid enteral nutrition, **Nutrition**, v.13(1), p.vi, 1997.
53. SNIDER H.E., PHAFF H.J. The Pattern of Action of Inulinase from *Saccharomyces fragilis* on Inulin. **Journal of Biological Chemistry**, v.237, p.2438-2441, 1962.
54. VANDAMME E.J.; DERYCKE D.G. Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications. **Advances in applied microbiology**, v.29, p.139-176, 1983.

55. WEI W.; ZHENG Z.; LIU Y.; ZHU X. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces sp.* Y-85 and scaling-up fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86(4), p.395-399, 1998.
56. YEPEZ SILVA-SANTISTEBAN B.O. **Efeito da agitação e aeração na produção de inulinase em processo de batelada simples por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045**, Campinas, 2001. 90p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
57. ZUCKERVERBUND NORD AG., BUCHHOLZ K.;NEUBAUER A.; STOPPOK E.; WALTER M.; Preparation of di:fructose di:anhydride III from inulin using inulinase present in biomass produced by culturing or fermenting of, e.g. *Arthrobacter ureafaciens*, DE19547059-C2, 11-5-1998.

IV. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*

Bernardo O. Yépez Silva-Santisteban; Francisco Maugeri Filho*.

Keywords: agitation, aeration, inulinase, impeller effect, factorial design, K_{La} , shear stress, scale up

Published in Enzyme Microbial Technology 36 (2005) 717-724.

4.1. Abstract

Factorial design and response surface analyses were used to optimize the production of inulinase (2,1-b-D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, using sucrose as carbon source. Effects of aeration, agitation and type of impeller (disk turbine, marine, pitched blade up) were studied in a batch stirred reactor. Two factorial designs 2^2 were carried out. Agitation speed varied from 50 to 550 rpm (revolution per minute), aeration rate from 0.5 to 2.0 vvm (air volume/broth volume.minute). It has been shown that the enzyme production was strongly influenced by mixing conditions, while aeration rate was shown to be less significant. Additionally, the increase in the agitation speed is limited by the death rate, which increases drastically at high speeds, lowering the enzyme production. Also, the impeller type has significant influence in the enzyme production, the disk impeller at 450 rpm and aeration at 1.0 vvm led to an activity of 121 UI/mL, while the pitched blade was shown to be the best impeller for this process, leading to the best production, 176 UI/mL, at 450 rpm and 1.0 vvm. The maximum shear stress for inulinase production was about 0.22 Pa, since higher values cause higher cell death rates, affecting the enzyme production. The same results were confirmed with another microorganism, which was also sensible to shear stress. Therefore, it has been concluded that in some cases, mainly when the microorganism is sensible to shear stress, the interaction between mass transfer and mechanical stress should be considered in scale up processes.

List of symbols

vvm air volume per broth volume per minute (min^{-1})

rpm revolution per minute (min^{-1})

K_{La} volumetric oxygen transfer coefficient (min^{-1})

S/I sucrose/inulin activities

v/v inoculum/broth volume

4.2. Introduction

Inulin is the storage carbohydrate in the roots and tubers of plants such as Jerusalem artichoke, chicory, dahlia or yacon. It represents good sources of high fructose, calorie-reduced sweeteners and consists of linear β -2,1 linked poly-fructose chains displaying a terminal glucose unit [1]. High fructose syrups are produced using corn hydrolyzed starch and glucose enzymatic isomerization. Microbial inulinase (2,1-b-D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) appears as an alternative for fructose production because it is possible to reach high fructose content having inulin as raw material [1, 2, 3]. Inulinase is able also to synthesize fructooligosaccharides from sucrose [4]. Inulinase is produced by many microorganisms as *Kluyveromyces* [5, 6, 7], *Aspergillus* [8, 9], *Staphylococcus* [6], *Xanthomonas* [10] and *Pseudomonas* [11]. The best source of carbohydrate for inulinase production is the inulin [8], but the sucrose is the second better source for it [12]. The agitation and aeration are important in order to supply oxygen for the microorganism in the fermentation process. The production by fermentation of several important metabolites is influenced by the agitation and aeration [13, 14, 15]. A few number of works in the literature state the importance of agitation and aeration in the inulinase production. *Kluyveromyces fragilis* produced a little inulinase without aeration [16]; the increase of culture medium volume in the flask diminished the inulinase production of *Kluyveromyces sp* [17]; the scale up for inulinase production by *Candida kefir* was carried out maintaining constant the oxygen transfer coefficient (K_La) [18]. Kalil *et al* [7] optimized the culture medium for the inulinase production in shaken flask using experimental design. However,

the bench scale inulinase production using the same medium composition and strain failed to produce similar amounts of inulinase.

In the present work, the agitation speed, aeration rate and impeller type were optimized for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus* ATCC 16045, using experimental design. Some relationships between the inulinase production, K_{La} , viability and metabolic performance during the fermentation were also studied. Some important aspects about the influence of shear stress and oxygen transfer in inulinase production were described.

4.3. Material and methods

4.3.1. Fermentation

Shaked flasks: *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 was employed for inulinase production. The microorganism was grown on MY broth. The inoculum cultures were grown in a medium containing 2% sucrose with pH at 6.5. Biomass was produced in 500 mL flasks with 100 mL of culture medium, at 30°C, 150 rpm for 24 hours. The fermentation was started with 10 % (v/v) inoculum.

Fermenter and K_{La} : The fermentations were carried out in a Bioflo III (NewBrunswick Scientific) fermenter, containing 2.2 L of the culture medium composed by sucrose 14 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L and K_2HPO_4 1 g/L, at initial pH 3.5 (no pH control) and 30°C, during 72 hours. The fermentations were started with 10 % (v/v) inoculum. Three types of impellers, disk turbine, marine and pitched blade up, were tested. The dynamic technique without microorganism was performed to calculate the K_{La} and nitrogen was used to eliminate the oxygen. The dissolved oxygen was measured with polarographic sensor.

4.3.2. Experimental design

Two 2^2 factorial designs were performed to optimize aeration and agitation rates with disk turbine. Table 1 shows the real values and coded levels used in all factorial designs.

4.3.3. Inulinase Assay

Activity was assayed as follows: 1 mL enzyme solution was mixed with 9 mL of 2% sucrose or inulin in acetate buffer 0.1 M pH 4.5. The mixture was maintained at 50°C and the rate of appearance of fructose was determined by the DNS method [19]. One unit of inulinase activity is defined as the amount of enzyme which hydrolyses 1 μ mol of sucrose per min under the conditions above mentioned (sucrose as substrate) or amount of enzyme catalyzing the liberation of 1 μ mol of reducing sugar per min, under the conditions above mentioned (inulin as substrate). Inulinase have different hydrolytic activities on sucrose compared to the hydrolytic activities on inulin. This behavior is represented by the *S/I* (sucrose/inulin activities) ratio. Values of *S/I* lower than 50 are a characteristic behavior of an inulinase, and higher than 50 are representative of an invertase [1]. The optimization work was carried out by measuring only the sucrose hydrolytic activity.

4.3.4. Biomass and cells viability

The biomass was determined by an indirect dry weight method, by comparing the cell suspensions optical density at 600 nm to a standard curve, which was previously prepared with the same microorganism produced in the same culture medium. Cell viability was measured by the coloration technique with methylene blue.

4.4. Results and Discussion

4.4.1. Design 1

Factorial designs 1 and 2, as depicted in Table 1, were performed to optimize agitation speed and aeration rate. The first design was carried out with aeration changing from 0.5 to 1.5 *vvm* and agitation from 50 to 200 *rpm*. It has been shown, in these ranges of values, that both parameters are significant, as shown in Table 2, and also that they should be increased in order to enhance enzyme production. The analysis of variance (ANOVA) of the model (equation 1) is shown in Table 3. The ANOVA shows a high R-squared (0,91, coefficient of determination) and a good performance of the *F* test for lack of fit (listed value is about 6 times the calculated one) and for the regression (calculated value is about 5 times de listed one). Therefore, equation 1 is predictive of the inulinase production process, in this range of the factor values, and consists of a first order function for agitation speed and aeration rate, and a second order function for agitation speed-aeration rate interaction. This model, describing the activity as a function of agitation speed and aeration rate, is represented in Figure 1. It can be seen in this figure that the lower the agitation and aeration levels the lower the inulinase production; however, the enzyme production increases when both parameters increase and achieved about 101 UI/mL after 72 hours of fermentation, at 200 *rpm* and 1.5 *vvm*.

$$Activity = 82,02 + 17,16 * vvm + 8,65 * rpm - 17.1 * vvm * rpm \quad (1)$$

Table 1. Real values and coded levels used in the factorial designs

Design	Aeration	Coded level	Agitation	Coded level
	(vvm)	for aeration	(rpm)	for agitation
Design 1	0,5	-1	50	-1
	1,0	0	150	0,33
	1,5	+1	200	+1
Design 2	1,0	-1	150	-1
	1,5	0	200	0
	2,0	+1	250	+1

Tabela 2. Design 1: parameters real values and coded level, and results after 72 hours of fermentation.

Real values		Coded level		Activity	Biomass
Agitation (rpm)	Aeration (vvm)	Agitation	Aeration	(UI/mL)	(g/L)
200	1,5	1	1	101	6
200	1,5	1	1	88	7,4
200	1,5	1	1	87	6,5
200	0,5	1	-1	95	5
150	1,0	0,33	0	74	5,7
150	1,0	0,33	0	89	5,6
150	1,0	0,33	0	79	5
50	1,5	-1	1	110	4,9
50	0,5	-1	-1	41	2,8

Table 3. ANOVA for the inulinase activity from design 1

Source of variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean squares	F test
Regression	3258,51	3	1086,17	17,97 ^a
Residual	323,32	5	64,66	1,07
Lack of fit	81,59	1	81,59	1,35 ^b
Pure error	241,73	4	60,43	-
Total	3581,83	8	-	-

R-squared: $R^2=0.91$; $F_{0,90,3,5}=3,62$; $F_{0,90,1,4}=7.71$

^aF-ratio (regression/residual)

^bF-ratio (lack of fit/pure error)

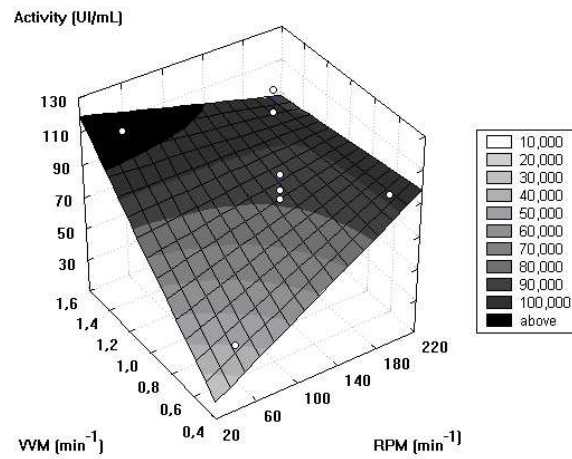


Figure 1. Response surface from design 1 for the enzymatic activity as a function of aeration (vvm) and agitation (rpm) after 72 hour of fermentation.

4.4.2. Design 2

According to the result from the first experimental design, as depicted by Figure 1, another set of experiments, the design 2 shown in Table 1, was performed. Since, from the previous experiments, both agitation and aeration increase the enzyme production, the ranges for both variables were increased in comparison to design 1. In design 2 the ranges varied from 150 to 250 rpm for agitation and from 1.0 to 2.0 vvm for aeration.

The results are shown in Table 4. It can be noticed that the highest activity achieved in this step was similar to the one obtained in the previous design, however, at these ranges only agitation was significant and an increase could be tried in order to obtain higher enzyme production. In Table 5 are shown the analysis of variance (ANOVA) for the model (Equation 2) that describes the activity as a function of agitation speed and aeration rate at these new ranges. The ANOVA shows an R-squared of 0.6, that is suitable for describing the tendency and the influences over the inulinase production, and a good *F* test for lack of fit and regression (2 times the listed value). The Equation 2 describes the inulinase production only as a first order function of the agitation speed, and it is used to create the response surface depicted by Figure 2. As it can be seen, the inulinase production was similar (89 and 84 IU/mL) no matter is the aeration rate, which changed from with 1 and 2 vvm. On the other hand, the activity enhanced considerably when agitation increased from 150 to 250 rpm, leading to activities from 80 to 97 IU/mL, respectively. The enhanced productivity was probably due to the enhancing in oxygen transfer.

$$Activity = 89,85 + 8,95 * rpm \quad (2)$$

Additionally, the biomass, in the design 1, is a function of both agitation and aeration, whereas for design 2 it is only influenced by agitation (results not shown here). Therefore, the activity and biomass are both function of oxygen supply.

Tabela 4. Design 2: Real values and coded levels, and results for activity and biomass after 72 hours of fermentation.

Real values		Coded level		Activity	Biomass
Agitation	Aeration	Agitation	Aeration	(UI/mL)	(g/L)
(rpm)	(vvm)	(rpm)	(vvm)		
250	2,0	1	1	101	7,2
250	1,0	1	-1	94	6,6
200	1,5	0	0	101	6
200	1,5	0	0	88	7,4
200	1,5	0	0	87	6,5
150	2,0	-1	1	78	5,7
150	1,0	-1	-1	74	5,7
150	1,0	-1	-1	89	5,6
150	1,0	-1	-1	79	5

Table5. ANOVA for the inulinase activity from design 2

Source variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F test
Regression	445,85	1	445,85	7,37 ^a
Residual	299,12	7	42,73	0,707
Lack of fit	57,39	3	19,13	0,317 ^b
Pure erro	241,73	4	60,43	-
Total	744,97	8	-	-

R-squared: $R^2=0,6$; $F_{0,90, 1, 7}=3,59$; $F_{0,90, 3, 4}=4,19$

^aF-ratio (regression/residual)

^bF-ratio (lack of fit/pure error)

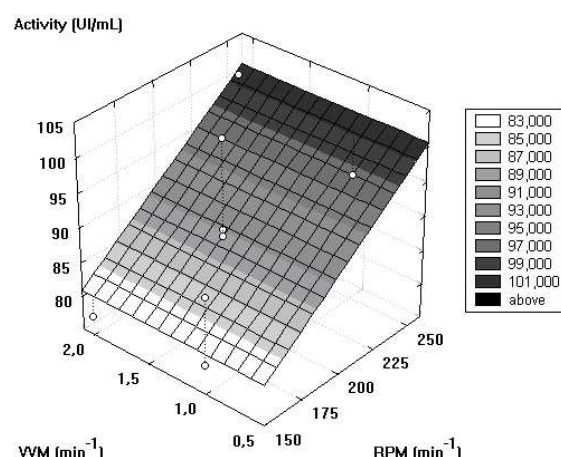


Figure 2. Response surface from design 2 for the enzymatic activity as a function of aeration (vvm) and agitation (rpm) after 72 hour of fermentation.

4.4.3. Optimization of agitation speed

According to the previous result, a new set of experiments was performed, where only the agitation was increased, keeping aeration at 1.0 vvm. Agitation changed from 150 rpm to 550 rpm, as shown in Figure 3. It can be seen that there was an increase in the enzyme production with the increase of the agitation speed from 150 up to 450 rpm. The maximum achieved activity was 121 IU/mL at 450 rpm. It is interesting to notice that the biomass concentration profile is similar to the one of enzymatic activity, showing that enzyme production is related to the biomass concentration and that both of them are function of the agitation speed. Therefore, there is a good chance that this process with a high biomass concentration may ensure a high inulinase production. It can also be seen that there is an increasing death rate as revolution speed increases (Figure 3). This death mechanism is probably due to the shear stress caused by the blade tips of the impeller, which increases as the revolution speed increases [20]. Additionally, this effect is pernicious for the enzyme production, since for agitations higher than 450 rpm there is an effective decrease of the activity. Therefore, it is clear that there are two mechanisms acting

in antagonism, which are the oxygen supply and the shear stress. The former contributes for the biomass increase and the latter acts against better enzyme yields.

Important also are the results for the oxygen supply and the K_{La} . It can be notice in Figure 3 that K_{La} increases sharply with the agitation, meaning that an adequate oxygen supply could be reached by this means. However, as agitation speed continues increasing from 450 to 550 rpm, ensuring the K_{La} increasing, both the activity and biomass dropped and viability practically reaches zero after 72 hours of fermentation at 550 rpm. Indeed, the increase of agitation speed have a positive effect on K_{La} , but this does not reflects in the enzyme production, since there is the shear stress effect that enhances death rate. Consequently, other methods to enhance the K_{La} or oxygen supply, for example using oxygen enriched air, are required in order to lesser biomass damaging and increase the inulinase production.

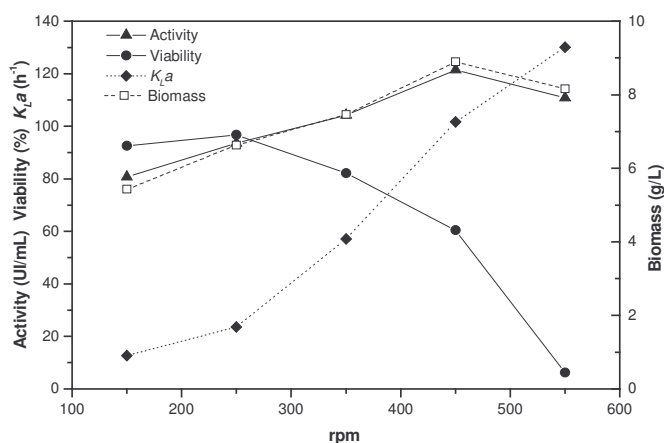


Figure 3. Agitation effects in the production of inulinase, biomass (X), K_{La} and viability (V) after 72 hours of fermentation, with 1.0 vvm aeration and disk turbine.

4.4.4. Impeller type

The two others impeller types, which are less harmful to the cells due to their smoother blade format, were than tested in order to examine the performance of the

microorganism under different shear stress. Figure 4 shows the time courses of viability and Table 6 the results of activity and K_{La} , with the three different impellers. The disk turbine led to the highest K_{La} (102 h^{-1}) and highest negative effect on the viability, whereas for marine impeller there was a low K_{La} (17 h^{-1}) and an almost negligible effect on viability, as shown in Table 6. It can be seen in Figure 4 that death rate is higher with disk impeller and lower with the marine impeller, while the pitched impeller has an intermediate effect. This could suggest that the marine impeller would give the best results followed by pitched and disk impellers, if only shear stress would be relevant. However, in Table 6 it can be seen that, in fact it is the pitched blade which gives the highest activity, 176 UI/mL, followed by the marine and disk impellers, both with almost similar results. The reason is that in this situation there is an intermediate K_{La} value obtained with the pitched impeller (75 h^{-1}) and an intermediate negative effect on the viability.

Therefore, for this microorganisms, not only oxygen supply is important, as shear stress can be very harmful and play an important role in the organism's physiology and consequently biomass formation and enzyme production.

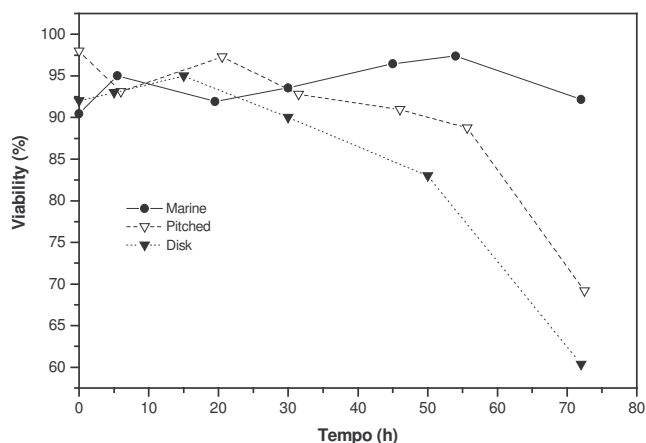


Figure 4. Time courses for viability for different impellers at 450 rpm and 1,0 vvm.

Table 6. Enzyme production, biomass concentration at the end of fermentation and K_La for the three different impeller types, at 450 rpm and 1.0 vvm

Impeller type	Activity (UI/mL)	Biomass (g/L)	K_La (h ⁻¹)
Two disk turbine	122	8,9	102
Two marine impellers	126	6,5	17
One pitched blade up	176	8,6	75

4.4.5. Shear stress

Shear stress in a bioreactor is related to rheological properties of broth and to shear rate. Rheological properties are defined for broth viscosity during the fermentation process, and the shear rate is a function of impeller geometry and impeller rotational speed, equations 3 and 4, as established by Metzner *et al* [21] and Calderbank and Moon Young [22] for newtonian fluids.

$$\tau_{av} = \mu \dot{\gamma}_{av} \quad (3)$$

$$\dot{\gamma}_{av} = \kappa N \quad (4)$$

where τ_{av} is the average shear stress between impeller neighborhood and tank wall, μ is dynamic viscosity, $\dot{\gamma}_{av}$ is the average shear rate between impeller neighborhood and tank wall, κ is a constant that depend on the system geometry only for newtonian fluids and N is the impeller rotational speed. These equations make it possible to determine the approximated shear stress in a agitation systems, assuming the viscosity similar to water, and defining κ values for the case system.

Disk turbine and marine impellers were widely studied and κ values been defined as 15 and 11 respectively ([21],[22]) whereas κ for the pitched blade up was estimated as 30, based on data from similar impellers ([23], [24], [25],[26]). It was assumed that shear stress

was proportional to impeller number. These data enables the approximate calculation of the shear stress in all conditions of agitation and aeration from designs 1 and 2 and Figure 3.

These shear stress data are plotted in Figure 5 against enzyme activity, biomass and K_{La} . It can be seen that the increase of K_{La} with shear stress caused simultaneous increasing in the activity and biomass concentration. When shear stress reached 0.17 Pa, K_{La} starts a faster increase, meanwhile activity and biomass increase with a slight slope. Finally, when shear stress is 0.22 Pa, K_{La} still keeps increasing, both activity and biomass reached the maximum levels (176 UI/mL and 8.6 g/L, respectively), and any additional shear stress diminishes significantly both variables. These results make clear the relevance of shear stress as valuable parameter for the optimization of inulinase production. It shows that the increase in inulinase production needs high K_{La} , as long as this condition do not imply in shear stress higher than 0.22 Pa.

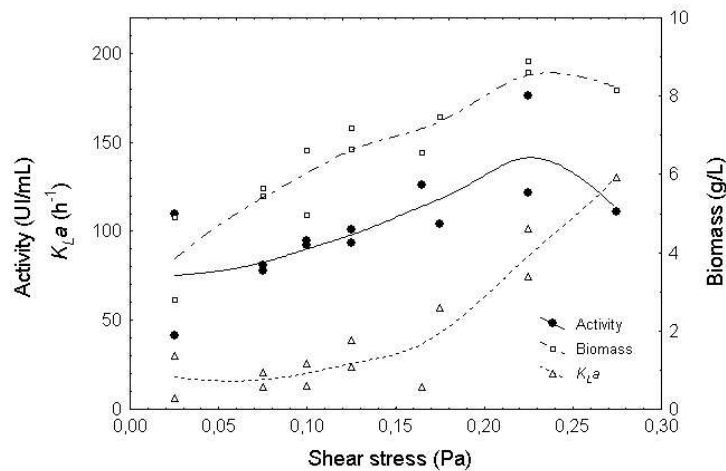


Figure 5. Activity, biomass, and K_{La} as functions of shear stress during inulinase production. Shear stress was estimated according to the method used by Metzner *et al* [21].

The mean shear rate in a stirred tank can be calculated, according to Ilevsky *et al* [27] and Byrne *et al* [28], in turbulently stirred tank precipitators by equation 5, where P/V is the power per unit volume dissipated by the impeller and μ the fluid dynamic viscosity.

$$\dot{\gamma}_{av} = \sqrt{\frac{P}{V^* \mu}} \quad (5)$$

The power is estimated from N_P and N_{Re} relation for each impeller type (data not shown) and the viscosity and density was considered similar to water. In Figure 6 it can be seen that the behavior of the three variables are quite similar to the one observed in Figure 5, only the scale of shear stress is different due to a different estimating method. In both cases there is a maximum level of shear stress for inulinase production (0.22 in Figure 5 and 1.3 in Figure 6).

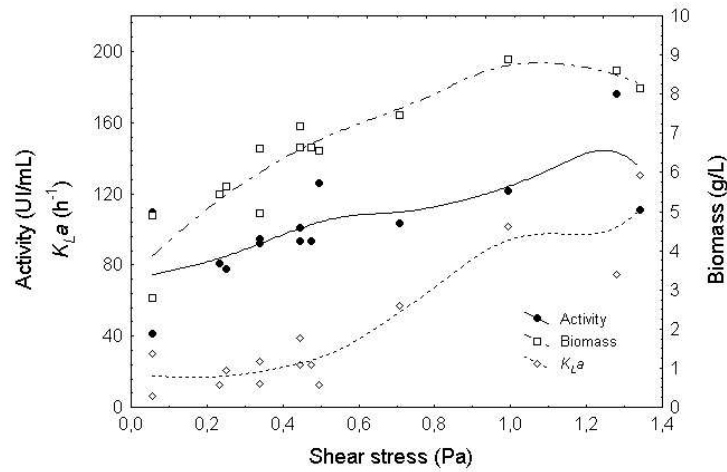


Figure 6. Activity, biomass, and K_La as functions of shear stress during inulinase production. Shear stress was estimated according to the method used by Ilevsky *et al* [27].

This method of estimating the effect of shear stress in fermentation processes can also be applied as scale up technique, since it predicts the effects of the agitation speed and of the type of the impeller in the process yields. Data of the scaled up of inulinase production by *Candida kefyr* from Pessoa *et al* [18], with volumes ranging from 15L to 300L, were used to validate this method. The inulinase production data and tank geometry used by Pessoa *et al* [18] are shown in Table 7 and 8.

Table 7. Inulinase production data from Pessoa *et al.* [18]

	Fermentor volume (L)							
	15				300			
Agitation (rpm)	180	100	120	120	150	300	500	100
Aeration (vvm)	1	1	0,5	1,0	1	1	1	0,8
K_La (h ⁻¹)	25	35	39	43	70	164.4	199	43
Biomass (g/L)	5,8	5,7	5,8	5,9	5,8	5,8	5,9	5,9
Activity (UI/mL)	25,5	30,2	34	37,5	32,6	0	0	36,7

Table 8. Tank geometry used by Pessoa *et al* [18]

Tank volume	15L		300L
Medium volume	9L		200L
Blaffe number	4		4
Tank diameter (mm)	200	490	490
Impeller type	Two blades paddle	Two blades paddle	Two blades paddle
Impeller diameter (mm)	128	200	340
Impeller number	2	3	3
Blade height (mm)	22	40	60
κ values	12,37	8,69	12,37

The two methods used above to estimate shear stress were applied again to data from Pessoa *et al* [18]. Approximated values for κ for two blades paddle was taken from Castell-Perez and Steffe [29]. It was assumed that the shear stress was the sum of shear stress of each type of impeller and it was proportional to the impeller number. For the power estimating, the N_P and N_{Re} relations for two blades paddle impeller reported by

Nagata [30] were used. The relation between shear stress and activity, biomass, and K_La for inulinase production by *Candida kefyr* is shown in Figure 7 and 8. The two methods give approximated tendencies for activity, biomass and K_La as a function of shear stress. In both Figures 7 and 8, it can be observed that there are two regions; the first region is the high activity production region, where the shear stress is lower than 0.10 Pa (Figure 7) and 0.14 Pa (Figure 8) and the second region is the null activity production region, where the shear stress is higher than these values. In the second region the shear stress was harmful to inulinase production, probably to microorganism too, however the authors did not report viability data. According to the results, *C. kefyr* seems to be more susceptible to the shear stress than *K. marxianus*, because the latter yeast produces activity even at 0.28 Pa, according to the first method, and 1.23, according to the second method, while *C. kefyr* did not.

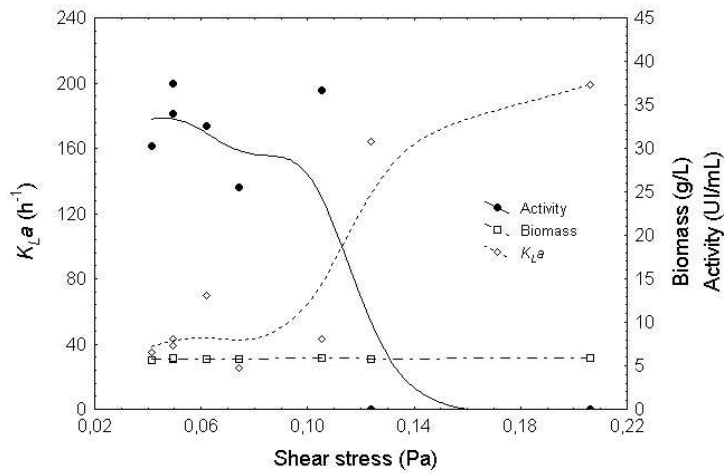


Figure 7: Activity, biomass, and K_La as functions of shear stress during inulinase production by *C. kefyr* from Pessoa *et al* [29]. Shear stress was estimated according to Metzner *et al* [21].

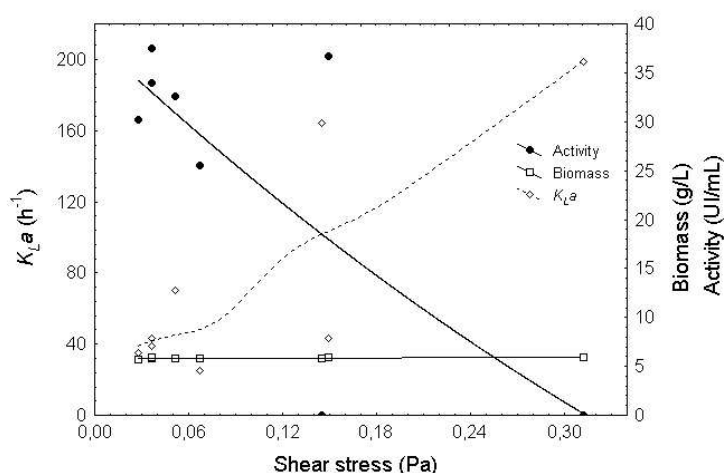


Figure 8. Activity, biomass, and K_La as a functions of shear stress during inulinase production by *C. kefir* from Pessoa *et al* [29]. Shear stress was estimated according to Ilevsky *et al* [27].

4.5. Conclusions

Aeration rate and agitation speed are shown to be critical for *K. marxianus* vr. *bulgaricus*, affecting the microorganism viability and enzyme production. The best fermentation condition found after an optimization study in a stirred reactor was: 1 vvm aeration, 450 rpm agitation, with pitched blade up impeller, with a production of 176 IU/ml. The microorganism performance was shown not to be entirely related to the oxygen transfer rate, but also that the fluid-dynamic of the system has an important role. Since agitation speed has to be kept at high levels for high yields of enzyme, shear stress turned out to be an important factor and the choice for less harmful impellers has to be considered for this microorganism. In this work, the pitched blade, an impeller typically used for cell cultures, led to the best result concerning inulinase production, compared to the disk and marine impellers. The influence of shear stress in inulinase production was compared between two different inulinase producing yeasts, *Candida kefir* and *Kluyveromyces marxianus*, giving similar results, although *K. marxianus* seems to be more resistant. These results led to conclude that the interaction between oxygen transfer and mechanical stress

seems to define the inulinase production and both shear stress and K_{La} should be considered in the cases of process optimization and scaling up. For a more general conclusion, the sensitivity to shear stress being a intrinsic characteristic of microorganisms and varying sometimes greatly from strain to strain, in some cases it can turn out to be a limiting factor in optimization, as well as in scale up processes, in such a case the improvement of the K_{La} should be considered not only using standard procedures but non conventional systems.

Acknowledgements

First author is grateful to the Interamerican Development Bank-Japan Fellowships Programm for master study scholarship, and to FAPESP-Brazil for doctoral scholarship.

4.6. References

- [1]. Vandamme EJ, Derycke G. Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties, and Applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 1983, 29, 139-176
- [2]. Manzoni M, Cavazzoni V. Hydrolysis of Topinambur (*Jerusalem artichoke*) fructanos by extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 1992, 54, 311-315
- [3]. Bajpai P, Margaritis A. Optimization studies for production of high fructose syrup from jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem.* 1986, 21, 16-184.
- [4]. Santos A. Síntese de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. 1998, Campinas, 86p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [5]. Cruz-Guerrero A, Garcia-Peña I, Barzana E, Garcia-Garibay M, Gomez-Ruiz L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. *J. Ferment. Bioeng.* 1995, 80, 159-163
- [6]. Selvakumar P, Ashok Pandey. Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture. *Bioresource Technol.* 1999, 69, 123-127
- [7]. Kalil, SJ, Maugeri Filho F, Rodrigues MI. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Appl. Biochem. Biotech.* 2001, 94, 257-264
- [8]. Poorna V, Kulkarni PR. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional design. *Bioresource Technol.* 1995, 54, 315-320
- [9]. Azhari R, Szlak AM, Ilan E, Sideman S, Lotann. Purification and characterization of *endo*- and *exo*-Inulinase. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 1989, 11, 105-117

- [10]. Park JP, Bae JT, You DJ, Kim BW, Yun JW. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endo inulinase from *Xanthomonas* sp. Biotechnol. Lett. 1999, 21, 1043-1046
- [11]. Jong WY, Yong JC, Chii HS, Seung KS. Microbial production on inulooligosaccharides by an endoinulinase from *Pseudomonas* sp. expressed in *Escherichia coli*. J. Biosci. Bioeng. 1999, 87, 291-295
- [12]. Parekh S, Margaritis A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture. Appl. Microbiol. Biot. 1985, 22, 446-448
- [13]. Chen JY, Wen CM, Chen TL. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. Biotechnol. Bioeng. 1999, 62, 311-316
- [14]. Serrano-Carreón L, Corona RM, Sanchez A, Galindo E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. Process Biochem. 1998, 33, 133-146
- [15]. Justen P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. Biotechnol. Bioeng. 1998, 59, 762-775
- [16]. Snider HE, Phaff HJ. The Pattern of Action of Inulinase from *Saccharomyces fragilis* on Inulin. J. Biol. Chem. 1962, 237, 2438-2441
- [17]. Wei W, Zheng Z, Liu Y, Zhu X. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling-up fermentation. J. Ferment. Bioeng. 1998, 86, 395-399
- [18]. Pessoa A, Vitolo M, Hustedt H. Use of K_{La} as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. Appl. Biochem. Biotech. 1996, 57, 669-709

- [19]. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959, 31, 426-428
- [20]. Märkl H, Bronnenmeier R. Chapter 18. Mechanical stress and microbial production. In: *Biotechnology*. H.J. Rehm and G.Reed (Ed.). *Fundamentals of Biochemical Engineering*. H.Brauer (Volume Ed.). 1985, 2, 369-392
- [21]. Metzner AB, Otto RE. Agitation of non-newtonian fluids. *AIChE J.* 1959, 3, 3-10
- [22]. Calderbank PH, Moo-Young MB. The prediction of power consumption in the agitation of non-newtonian fluids. *Trans. Instn. Chem. Eng.* 1959, 37, 26-33
- [23]. Cantú D. Estudo das propriedades reológicas de caldos de fermentação. 1982, Campinas 74 p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas
- [24]. Kembrowski Z, Kristiansen B. Rheometry of fermentation liquids. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, 28, 1474-1483
- [25]. Badino Jr AC, Facciotti MCR, Schimidell W. Construction and operation of an impeller rheometer for on line rheological characterization of non newtonian fermentation broths. *Braz. J. Chem. Eng.* 1997, 14, 4
- [26]. Charles M. Technical aspects of the reological properties of microbial cultures. *Adv. Biochem. Eng.* 1979, 8, 1-65
- [27]. Ilevsky D, Rudman M, Metcalfe G. The separate roles of shear rate and mixing on gibbsite precipitation. *Chem. Eng. Sci.* 2001, 56, 2521-2530
- [28]. Byrne E, Fistpatrick J, Pampel LW, Titchener-Hooker NJ. Influence of shear on particle size and fractal dimension of whey protein precipitates: implications for scale-up and centrifugal clarification efficiency. *Chem. Eng. Sci.* 2002, 57, 3767-3779

- [29]. Castell-Perez ME, Steffe JF. Evaluating shear rates for power law fluids in mixer viscometry. *J. Texture Stud.* 1990, 21, 439-453
- [30]. Nagata S. *Mixing: Principles and applications.* 1975, Kodansha Ltd. Tokyo, John Wiley&Sons New York-London-Sydney-Toronto

V. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation level on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045

Bernardo O. Yépez Silva-Santisteban^a, Attilio Converti^b, Francisco Maugeri Filho^{a,*}

Keywords: Carbon source; Nitrogen source; Oxygenation level; Inulinase production; *Kluyveromyces marxianus*

Submitted to Biochemical Engineering Journal (28th September, 2005)

5.1. Abstract

The results of inulinase overproduction by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 cultivated either on minimal or complex medium are discussed and compared in this work. Extracellular inulinase production exhibited a kinetic behavior similar on glucose, fructose and sucrose. Inulinase was detected at basal level since the beginning of batch fermentations, thus allowing the microorganism to grow on all these carbon sources, and then it was overproduced after their complete depletion. The highest inulinase activity in minimal medium containing 10 g/L sucrose (6.4 IU/mL) was obtained at a starting ammonium sulfate concentration of 5 g/L, whereas it was reduced to about one fourth of this value (1.7 IU/mL) and detected only at the beginning of fermentation under nitrogen-limited conditions. The best sucrose concentrations for the production of this enzyme were 30 and 20 g/L of sucrose in minimal and complex media, yielding 15.4 and 208 IU/mL, respectively. In general, the enzyme activity was much higher in complex than in minimal medium under all the conditions tested. Oxygen-enriched air neither improved inulinase production nor prevented ethanol formation in both media.

5.2. Introduction

Although inulinase production has largely been explored in various yeasts and fungi, the literature information, mainly dealing with optimization of culture media and some operating parameters, such as pH, temperature, agitation and aeration, is insufficient to get a clear picture of its general mechanism. As a consequence, there are contrasting opinions about the constitutive, repressive or inducing nature of this enzyme. For example, it was demonstrated that inulinase synthesis is subject to a mechanism of induction/repression in *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046 and *Aspergillus niger* [1-4], of induction without catabolic repression in *K. marxianus* UCD

(FST) 55-82 [5] and *vice versa* in *K. marxianus* CBS 6556 [6], whereas other strains of this microorganism did not exhibit any induction mechanism [7-9], thus suggesting the constitutive nature of this enzyme. Finally, Gupta et al. observed that glucose was responsible for catabolic repression, whereas sucrose and fructose acted as weaker inducers than inulin in *K. fragilis* [10].

The influence of carbon and nitrogen source concentrations were investigated to optimize cultivation media for inulinase production by *K. marxianus* ATCC 16045 and other strains of this species [11,12]; however, the use of experimental design for optimization did not allow evaluating each single effect independently of the others. Other studies reported different responses of inulinase synthesis to carbon source concentration [6,7,10], whereas there is sufficient agreement about the better role of organic (peptone, yeast extract, casamino acids) rather than inorganic (ammonium sulfate and phosphate, sodium nitrate, urea) nitrogen sources [9,10]. Notwithstanding the contrasting opinions, no systematic study has been performed, at least to our knowledge, to clarify the effects of either carbon or nitrogen source in the enzyme synthesis. Additionally, the mechanism of inulinase production can be quite different, even among different strains of the same species, thus requiring separate characterization for each strain.

It has been recently demonstrated that the fluid dynamic aspects responsible for mechanical stress in the production of extracellular inulinase by *K. marxianus* ATCC 16045 [13] is of high significance, which suggests that additional efforts are needed to investigate the influence of other process parameters on this fermentation. Besides, inulinase was produced in very little amounts in batch cultivation, hereby suggesting catabolic repression by glucose. So, batch tests have been carried out in this work, varying the type and concentration of both carbon and nitrogen sources, as well as the oxygenation

conditions either in minimal or complex medium, to get more information on the release of extracellular inulinase by this strain and consequently enhance its production yield.

5.3. Materials and methods

5.3.1. Microorganism

The microorganism utilized in this study as inulinase producer, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, was maintained in yeast malt agar at 4°C. Cryogenic pre-inocula (20% glycerol) were prepared in the medium described by Kalil et al. [12] at 30°C so as to obtain suspensions with optical density of 0.5.

5.3.2. Batch fermentations

Batch fermentations were carried out either on minimal [14] or complex medium [12] at the optimum temperature of 30°C [15], 450 rpm and aeration of 1 vvm (L of air per L of medium per minute) in a 3.0-L fermenter, type Bioflow III (New Brunswick Scientific, Edison, NJ), with 2.0 L working volume, after inoculation with biomass from the above suspensions and addition of little amounts of antifoam, type Aratrop (Alcamo Química, Indústria e Comércio Ltda, Sertãozinho, SP, Brazil). A 2N NaOH solution was added to control the pH at its optimum value (3.5) [15]. Cells maintained at -80°C in 20% glycerol were firstly transferred into 500 mL baffled Erlenmeyer flasks containing 100 mL of minimal medium, then incubated at 30°C for 24 h, recovered by centrifugation and finally used for inoculum. Samples were withdrawn throughout the fermentations to determine the levels of the main metabolites, inulinase, biomass and total proteins. Some tests were performed at high oxygenation levels using O₂-enriched air. For this purpose, it was used a system of valves so as to ensure a percentage of O₂ with respect to its solubility in water in the range of 90-100%. Anaerobic fermentations were also performed substituting air with N₂.

5.3.3. Analytical methods

Cell mass concentration was determined using a UV-VIS spectrophotometer, model DU 640 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), using standard curves relating the optical density at 600 nm to biomass dry weight either in minimal or complex medium. Carbon, hydrogen and nitrogen contents of dry biomass were determined by elemental analysis with a CHN analyzer, Series II 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Concentrations of acetate, acetaldehyde, pyruvate, glycerol, ethanol, sucrose, glucose and fructose during fermentations were determined at 40°C by a HPLC device consisting of 9010 Solvent Delivery System, RI-4 Refractive Index Detector, 9095 Auto-sampler (Varian, Walnut Creek, CA), SPH99 Column Thermostat (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), Millenium Chromatography Manager (Waters, Milford, MA), equipped with an anionic exchange HPX87H column (Biorad Laboratories, Hercules, CA) using a sulfuric acid solution (pH 1.0) as a mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min.

The dissolved oxygen (DO) level was on-line measured using a polarographic probe (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

According to Santos [16], inulinase activity was assayed as follows. The enzyme solution (0.5 mL) was mixed with 4.5 mL of 2% sucrose in acetate buffer 0.1 M pH 4.8. The mixture was maintained at 50°C during 8 or 40 min, depending on enzyme concentration, and the rate of appearance of reducing sugars was determined by the colorimetric method of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) [17]. One unit of inulinase activity was defined as the amount of enzyme able to release 1 μ mol of reducing sugar per min, under the above conditions.

The activities of extracellular, cell wall and cell-bound inulinase were determined by the extraction method described by Rouwenhorst et al. [6]. The activity of extracellular inulinase was quantified from the broth supernatant obtained by centrifugation. The cell

wall-associated inulinase was released from biomass using an enzyme-releasing buffer with the following composition: 50 mM potassium phosphate, 10 mM de 2-mercaptoethanol, 10 mM de dithiothreitol, 2 mM de MgSO_4 , pH 7. Finally the remaining biomass was re-suspended in a disruption buffer consisting of 50 mM potassium phosphate, 10 mM MgSO_4 , pH 7, and cell-bound inulinase was obtained by mechanical disruption of biomass suspension. Mechanical disruption was performed in a cold-jacketed mill (0.5°C) containing glass micro-spheres with 600 μm diameter, by successive milling and cooling every 10 s during 5 min.

5.4. Results and discussion

Batch cultivations of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 were performed either in minimal or complex medium using different sources of carbon (sucrose, glucose and fructose) and nitrogen (ammonium sulfate, peptone and yeast extract), at different concentrations (10-40 and 0.5-10 g/L, respectively) and different aeration conditions (with natural or O_2 enriched air, or N_2 at 1 vvm). Tables 1 and 2 list the main results of these tests in terms of maximum biomass concentration (X_m), basal level (A_b) and maximum (A_m) saccharolytic activities, total protein (TP) and maximum ethanol (E_m) concentrations collected in minimal and complex media, respectively. In all assays, X_m was reached after about 8 h of fermentation, and then cell concentration slightly decreased, while the maximum enzyme activity was reached after about 72 h.

Table 1. Experimental schedule and main results of batch *K. marxianus* cultivations performed under different conditions in minimal medium

Type of C-source	C-source conc. (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ conc. (g/L)	Air conditions (1 vvm)	X _m ^a (g/L)	A _m ^b (IU/mL)	TP ^c (g/L)	A _b ^d (IU/mL)	E _m ^e (g/L)
Suc ^f	10	5.0	Air	3.7	6.40	0.89	0.31	0.49
Suc	20	5.0	Air	6.2	5.03	0.41	0.91	2.86
Suc	30	5.0	Air	7.5	15.4	0.45	0.38	2.78
Suc	40	5.0	Air	9.1	7.20	1.22	2.35	7.26
Suc	10	0.5	Air	3.4	1.70	0.10	1.70	0.20
Suc	10	2.0	Air	3.9	2.84	0.27	1.07	0.97
Suc	10	10	Air	3.8	7.09	0.74	0.72	0.79
Glu ^g	10	5.0	Air	3.5	7.41	0.30	0.50	0.68
Fru ^h	10	5.0	Air	3.4	6.01	0.21	0.62	0.95
Suc	10	5.0	N ₂	1.0	1.30	-	0.08	7.81
Suc	10	5.0	Air+O ₂	3.5	5.33	-	0.58	0.50
Suc	40	5.0	Air+O ₂	10.7	6.54	-	1.60	2.46

^a X_m = Maximum biomass concentration.

^b A_m = Maximum saccharolytic activity.

^c TP = Total protein concentration.

^d A_b = Maximum basal level of saccharolytic activity.

^e E_m = Maximum ethanol concentration.

^f Suc = Sucrose.

^g Glu = Glucose.

^h Fru = Fructose.

- = lost data.

Table 2. Experimental schedule and main results of batch *K. marxianus* cultivations performed under different conditions in complex medium

Sucrose conc. (g/L)	Air conditions (1 vvm)	X_m^b (g/L)	A_m^c (IU/mL)	TP ^d (g/L)	A_b^e (IU/mL)	E_m^f (g/L)
10	Air	5.5	97.2	17.5	1.56	0.73
20	Air	8.0	208	18.0	9.10	3.17
30	Air	8.9	60.6	18.0	5.05	6.32
40	Air	9.7	29.5	15.8	4.68	8.86
40	Air+O ₂	10.5	31.9	-	0.91	5.24

^aThe nitrogen source was a mixture of peptone (20 g/L) and yeast extract (10 g/L).

^b X_m = Maximum biomass concentration.

^c A_m = Maximum saccharolytic activity.

^dTP = Total protein concentration.

^e A_b = Maximum basal level of saccharolytic activity.

^f E_m = Maximum ethanol concentration.

- = lost data.

5.4.1. Cultivations on minimal medium

Effect of the carbon source

Sucrose, glucose and fructose were used as carbon sources for batch cultivations in minimal medium at starting concentration of 10 g/L, whose main results in terms of X_m , A_m , TP and A_b are illustrated in Fig. 1.

Similar levels of inulinase (6.0-7.4 IU/mL), biomass (3.4-3.7 g/L) and yield of inulinase on biomass ($Y_{INU/X}$) (1.7-2.1 IU/g biomass) were detected with the three sugars under investigation, which suggests that inulinase could be constitutively present in the selected strain, as it was previously proposed [7,8]. However, some authors observed appreciably higher enzyme production on sucrose than on glucose and fructose [5,6,9], whereas others higher production on fructose than on glucose [7]. Besides, it was demonstrated that other substrates (inulin, lactose, glycerol, and ethanol) could act as

inulinase inducers with different effectiveness [5-7,10], which suggests the strain-dependent nature of this enzyme.

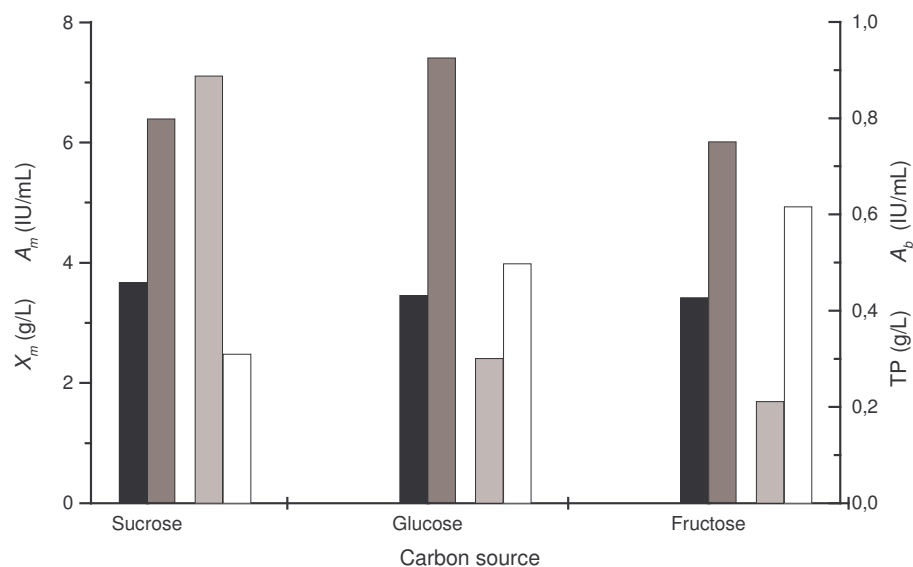


Fig. 1. Effect of the type of carbon source on the cultivation of *K. marxianus* ATCC 16045 on minimal medium. X_m (■); A_m (■); TP (■); A_b (□).

Some well-known enzymes related to carbohydrate metabolism, such as alcohol dehydrogenase coded by *KIADH* gene family in *Kluyveromyces lactis*, or aldehyde dehydrogenase coded by *ALD* gene family in *Saccharomyces cerevisiae*, are produced in different culture conditions, probably due to the fact that their genetic codes, placed in the same gene system, are regulated by different control mechanisms of expression, some genes being constitutive and others inducible and repressed by glucose or ethanol [18]. Although such a mechanistic variability suggests that inulinase could be a complex isoenzymatic system, regulated by different biosynthetic mechanisms, genetic studies reported the existence of only one repressed glucose gene (*KmINUI*), which is responsible for inulinase expression in *Kluyveromyces marxianus*, as well as the comparable ability of

microorganisms belonging to this genus to grow on the three carbon sources selected in this study for comparison [19-21].

The present results show that inulinase was produced at basal level during the first 8 h of fermentation (phase I), not only on glucose as carbon source, in accordance with the repression mechanism stressed by the above authors, but even on fructose (Fig. 2), in agreement with some reported case of catabolite repression by glucose and fructose [22]. As previously reported, enzymes whose overproduction is inducible could be produced at basal levels under non-inducible conditions [23]. Additionally, some glucose repressed enzymes are produced in small amount in presence of glucose [24], and the repression is effective at given glucose concentration [25-27].

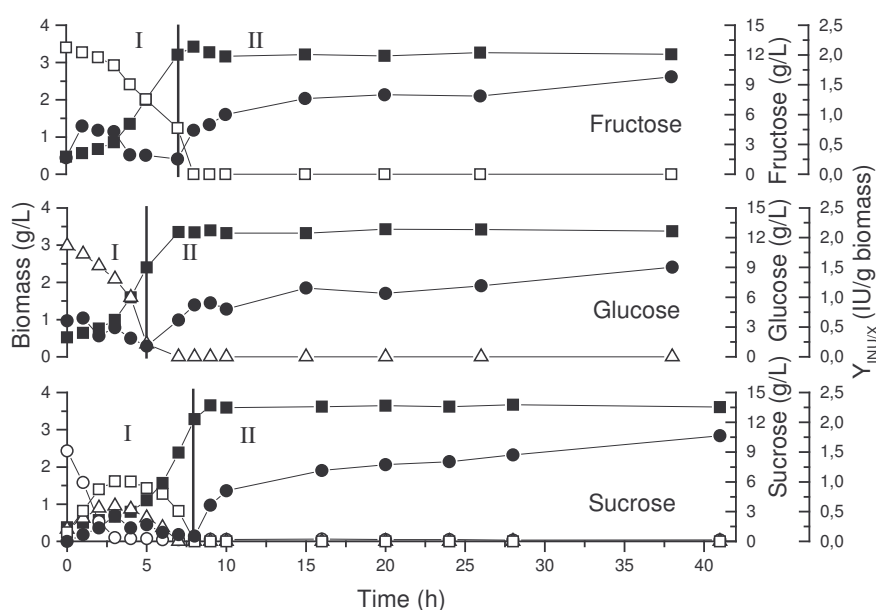


Fig. 2. Performance of *K. marxianus* ATCC 16045 cultivations on sucrose, glucose and fructose. Inulinase production phases: I: basal level, II: overproduction. $Y_{INU/X}$ (●); concentrations of biomass (■), sucrose (○), glucose (△), and fructose (□).

Inulinase overproduction, observed on phase II after total depletion of the carbon source, was similar for all sources investigated, which can be explained as an induction mechanism. The results on Fig. 3 point out that inulinase was actually oversynthesized

during phase II, rather than released *a posteriori* as a simple cell wall linked enzyme. This behavior seems to be a sort of defense response to the lack of carbon source.

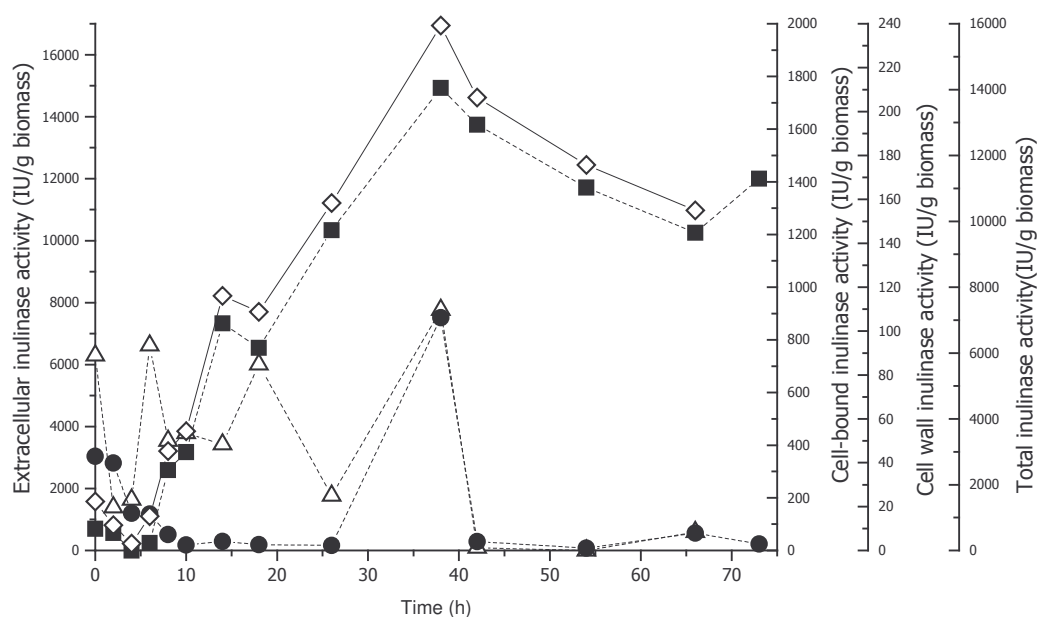


Fig. 3. Localization and distribution of inulinase related to structure of the cell throughout a typical fermentation on sucrose-based complex medium. Extracellular inulinase activity (■); Cell-bound inulinase activity (△); Cell-wall inulinase activity (●); Total inulinase activity (◇).

The production of a variety of metabolites, such ethanol, acetate, glycerol, pyruvate and acetaldehyde, was detected during the first 10 h of a typical cultivation of *K. marxianus* ATCC 16045 (Fig. 4). These compounds reached appreciable levels during the preliminary growth phase and then were totally consumed during phase II, confirming the metabolic change induced by carbon source starvation.

Effect of ammonium sulfate concentration

Since nitrogen availability is notoriously one of the limiting factors of inulinase synthesis, four tests were carried out varying the ammonium sulfate level in the range 0.5-

10 g/L, but keeping constant that of sucrose at 10 g/L. Fig. 5 shows that the overall enzyme activity progressively increased to 6.4 IU/mL with increasing ammonium sulfate concentration up to 5 g/L, beyond which it kept almost constant (7.0 IU/mL at 10 g/L). These results suggests a nitrogen optimal level of about 1 g/L for inulinase synthesis, corresponding to an N/C molar ratio of about 0.2. Additionally, with ammonium sulfate concentrations higher than 2.0 g/L, the productions of inulinase and biomass occurred simultaneously during the whole fermentation, while at 0.5 g/L the extra-cellular enzyme activity was observed only at the beginning of the run.

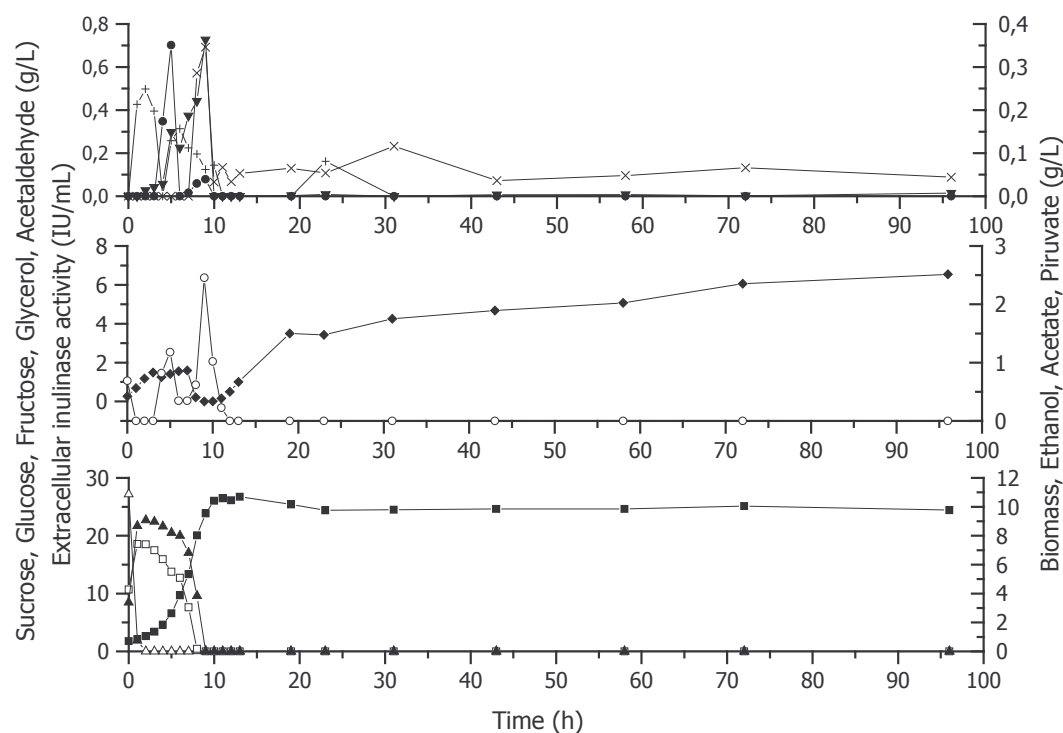


Fig. 4. Inulinase activity and metabolites production during *K. marxianus* ATCC 16045 cultivation on minimal medium containing 40 g/L sucrose and 5 g/L ammonium sulfate performed supplying 1.0 vvm oxygen enriched air. Extracellular inulinase activity (IU/mL) (◆); Concentrations of sucrose (△), glucose (□), fructose (▲), glycerol (▼), acetate (+), ethanol (○), pyruvate (×), acetaldehyde (●), and biomass (■).

Considering the dry biomass composition of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, experimentally determined under non-limiting nitrogen conditions ($\text{CH}_{1.94}\text{O}_{0.76}\text{N}_{0.17}$), we can calculate a minimal ammonium sulfate concentration for growth of 1.53 g/L. However, as it can be seen in Fig. 5, there was no significant difference between the growth with 0.5 and 2 g/L ammonium sulfate. According to Roels [28], this behavior could be explained with the reduced nitrogen content of biomass grown under nitrogen limited conditions. It can also be seen in this figure that there was a direct dependence of the released total proteins and inulinase on the nitrogen level up to an ammonium sulfate concentration of 5.0 g/L. However, the released protein corresponding to inulinase was only a small fraction of total proteins, since the intrinsic specific activity of this enzyme was about 879 IU/mg [29].

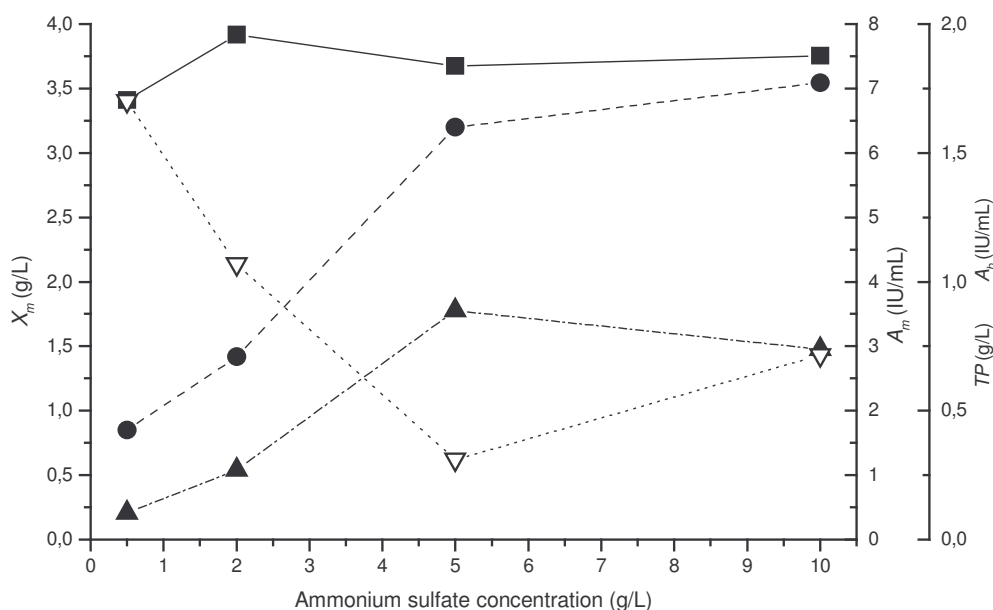


Fig. 5. Effect of ammonium sulfate concentration on the inulinase production in minimal medium. X_m (■); A_m (●); TP (▲); A_b (▽).

Effect of sucrose concentration

Inulinase production was then investigated by a set of four cultivations performed on minimal medium at variable initial sucrose concentration (10-40 g/L), while ammonium sulfate concentration was kept constant at 5.0 g/L. Fig. 6 shows that the highest enzyme activity (15.4 IU/mL) was obtained using 30 g/L sucrose. Biomass production reached 9.1 g/L with 40 g/L sucrose concentration, a value about 2.5 times higher than that obtained at 10 g/L, which could have been due to carbon source limitation at the lowest level. However, biomass yield declined to 0.23 g/g at 40 g/L sucrose concentration; this value, which was about 40% lower than that obtained at 10 g/L, was the likely result of a carbon source overflow through the glycolytic pathway that addressed an appreciable fraction of pyruvate to the production of ethanol (7.26 g/L) and other metabolites. Another possibility is that ethanol could have alternately been formed as the result of oxygen-limited conditions or inhibition of the synthesis of respiratory enzymes (i.e. a sort of Crabtree effect) at high carbon source levels.

On the other hand, the release of total proteins in the medium did not show any noticeable dependence on the concentration of the carbon source. Unexpectedly, the basal level enzyme activity on phase I increased by 7.5 times with the increase of sucrose concentration from 10 to 40 g/L, which suggests the existence of a complex regulation of inulinase synthesis.

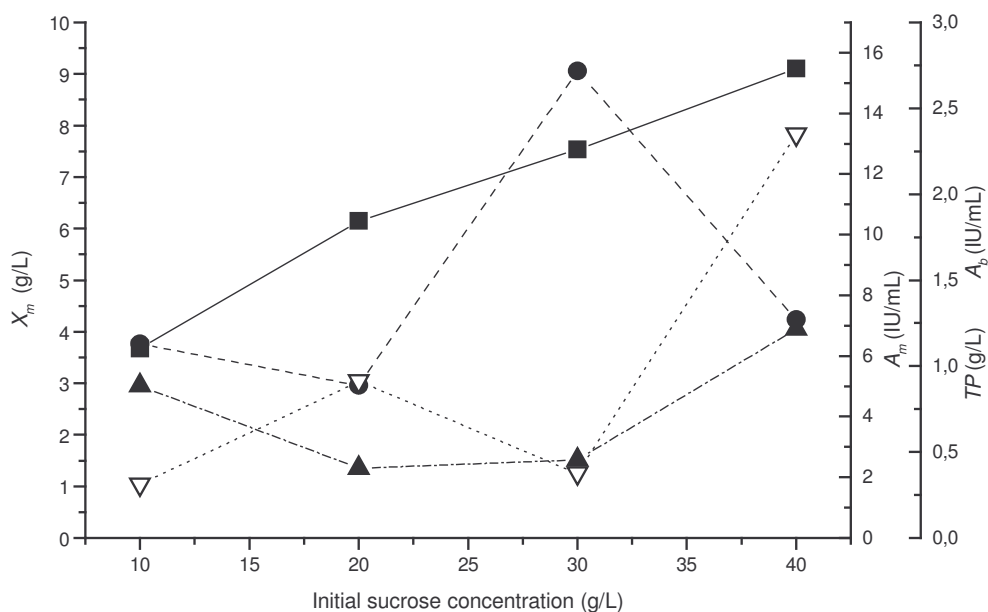


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on the inulinase production in minimal medium. X_m (■); A_m (●); TP (▲); A_b (▽).

These results are comparable to those obtained by Gupta et al., who detected a maximum inulinase activity (7 IU/mL) in *K. fragilis* at a fructan concentration of 15 g/L [10], while the enzyme production in *K. marxianus* CDBB-L-278 decreased from 4.33 to 0.78 IU/mg and from 8.06 to 0.59 IU/mg when glucose and fructose concentrations were increased from 2.5 to 10 g/L, respectively [7]. However, it should be stressed that those results were obtained with different strains, different cultivation media and carbon source.

5.4.2. Cultivations on complex medium

Similar tests were then performed on sucrose-based complex medium containing organic nitrogen (yeast extract and peptone) [12] to study the simultaneous effects of different nitrogen sources and sucrose concentration on inulinase production (Table 2).

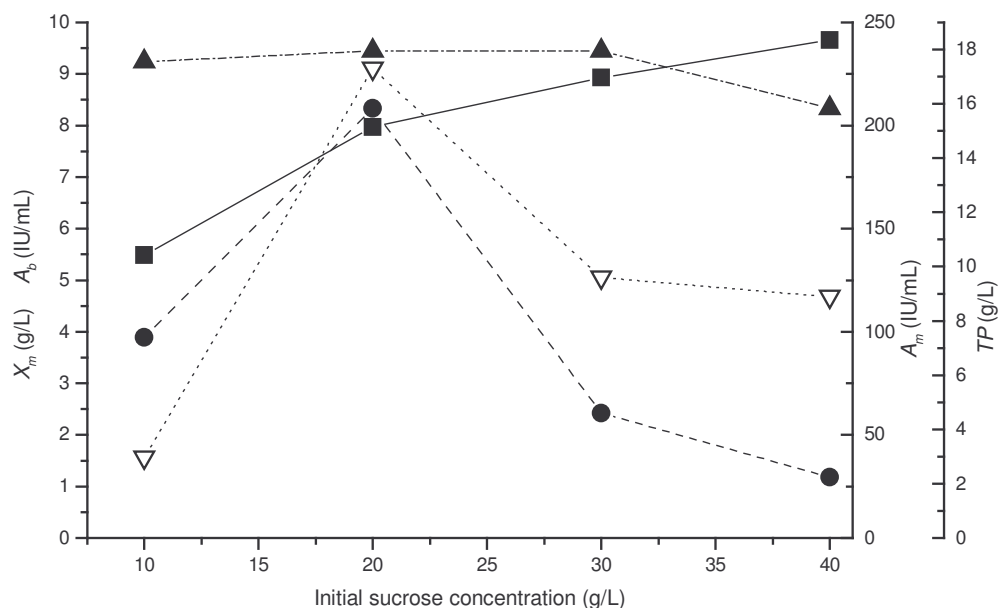


Fig. 7. Influence of sucrose concentration on the inulinase production in complex medium. X_m (■); A_m (●); TP (▲); A_b (▽).

The enzyme activity was more than one order of magnitude higher (208 IU/mL) (Fig. 7) than the one obtained in minimal medium (15.4 IU/mL), probably because of a nitrogen source concentration almost 5-fold higher (about 5 g/L) or of the presence of additional carbon source in the form of amino acids. The same figure also shows a strong effect of sucrose concentration on both the enzyme synthesis and the cell metabolism: the inulinase activity reached a maximum (208 IU/mL) at 20 g/L of sucrose and then remarkably decreased using higher sugar concentration (29.5 IU/mL at 40 g/L), whereas ethanol concentration increased from about 1 to 8 g/L (Table 2). On the other hand, biomass behaved similarly to the cultivations on minimal medium, in that its production increased from 5.4 to 9.7 g/L with the increase of initial sucrose concentration from 10 to 40 g/L.

The basal level inulinase production at the beginning of the fermentation process was remarkably higher (1.6-9.1 IU/mL) than in minimal medium. Although this

observation could have been the result of the use of richer nitrogen sources, it seems to confirm the complexity of the mechanism of inulinase synthesis regulation.

Effect of oxygen availability

Final tests were carried out under different oxygen levels in order to select conditions able to minimize ethanol formation and then to maximize inulinase production. Previous attempt to improve aeration by mechanical means resulted in mechanical stress to the cells due to high shear stress [13]; therefore, tests were performed supplying O₂-enriched air. As shown in Fig. 8, during conventional tests in minimal medium without air enrichment, the dissolved oxygen level fell down rapidly and kept at very low levels during a time depending on the carbon source concentration in the medium.

Fig. 9 shows that air enrichment with O₂ had no significant effect on inulinase production either in minimal or complex medium, and that the little variations observed at the different initial concentrations of sucrose layed within the experimental error of the determination procedure. As a consequence of the increased oxygen level in the medium, ethanol production decreased with respect to fermentations without air enrichment, although it was not completely removed (Tables 1 and 2). These observations are in agreement with the above hypothesis of an unbalance between glycolysis and respiration [30, 31] responsible for ethanol formation under aerobiosis, i.e. a sort of long-term Crabtree effect [31] taken place at high growth rate (time interval between 7 to 9 h in Fig. 4). Besides, biomass production was 1 to 2 g/L higher than without air enrichment, probably because of the reduction of ethanol formation, while no appreciable effect was detected on the basal level inulinase production.

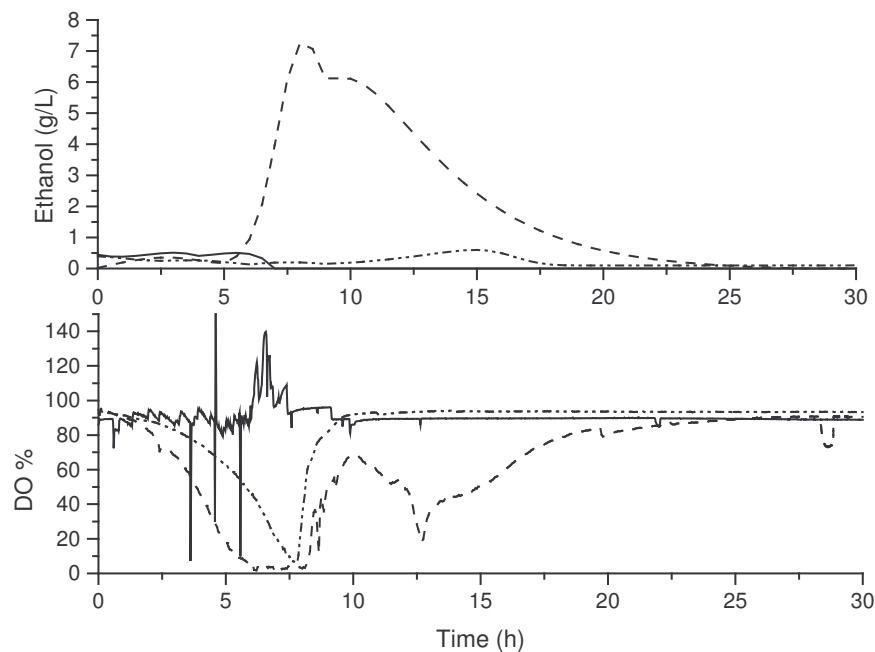


Fig. 8. Time behaviors of dissolved oxygen (DO%) and ethanol concentration during *K. marxianus* ATCC 16045 cultivations on minimal medium performed under different conditions of aeration and carbon source concentration. Sucrose 10 g/L with air supply (— · —); Sucrose 40 g/L with air supply (— —); Sucrose 10 g/L with oxygen enriched air supply (—).

Inulinase production was finally checked in minimal medium under anaerobic conditions ensured by substituting air with nitrogen. Biomass production was about one third of that obtained in aerobiosis, while both basal and maximum inulinase activities were reduced by about 80% (Fig. 9). Contrary to aerobic conditions, the large production of ethanol (7.81 g/L) (Table 1) can actually be ascribed in this case to oxygen limitation.

On the basis of these results, we can conclude that 1.0 vvm air supply without any oxygen enrichment can simultaneously sustain the high ATP requirements either for aerobic growth or inulinase biosynthesis, under the culture conditions used in this work.

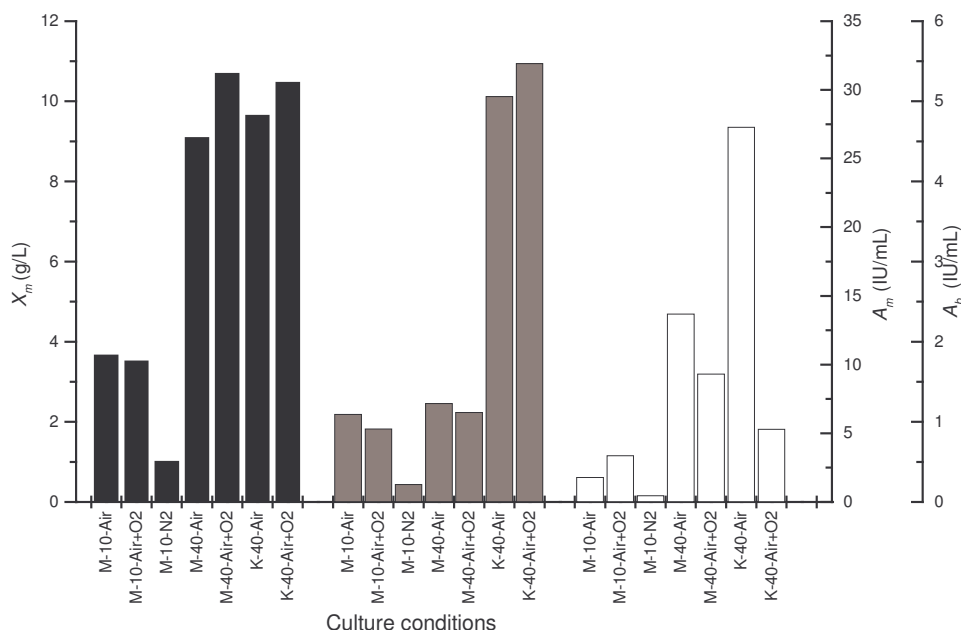


Fig. 9. Effect of air enrichment with oxygen (Air+O₂) and anaerobiosis with nitrogen (N₂) on inulinase production at different sucrose concentrations (10 and 40 g/L) either in minimal (M) or complex medium (K). X_m (■); A_m (■); A_b (□).

5.5. Conclusions

It was shown that *K. marxianus* ATCC 16045 is able to grow and produce extracellular inulinase in minimal medium. The inulinase production on glucose, fructose and sucrose exhibited similar kinetics and occurred in two phases: a former phase simultaneous to the microorganism growth, during which the enzyme was produced at basal levels, and a latter stationary phase, after total consumption of the carbon source, during which inulinase was overproduced by induction.

The effectiveness of inulinase biosynthesis appeared to be dependent on the efficient use and the type of carbon and nitrogen sources as well as their concentrations and oxygen availability. Inulinase activity reached a maximum with an ammonium sulfate level in minimal medium of 5.0 g/L, while under conditions of nitrogen limitation the enzyme was only produced at very low levels at the beginning of the cultivation. The optimum

sucrose concentrations for the production of inulinase in minimal and complex media were 30 and 20 g/L, respectively, at which maximum activities of 15.4 and 208 IU/mL were detected. A long-term Crabtree effect likely limited inulinase production. Similar results obtained with natural and oxygen-enriched air suggested that ethanol formed during most of the cultivations was the likely consequence of an unbalance between glycolysis and respiratory chain under these conditions.

The dramatic increase in inulinase activity on complex medium was likely due to the presence of additional organic nitrogen and carbon sources in peptone and yeast extract.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP (São Paulo-Brazil).

5.6. References

- [1] J.W.D. Grootwassink, S.E. Fleming, Non-specific β -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties, *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 45-53.
- [2] J.W.D. Grootwassink, G.M. Hewitt, Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*, *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 31-41.
- [3] V. Poorna, P.R. Kulkarni, A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional design, *Biores. Technol.* 54 (1995) 315-320.
- [4] R.T. Kushi, O. Hojo, H.C. Trevisan, R. Monti, A. Carvalho, J. Contiero, Estudo da inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, in: *Proceedings of the 11th National Symposium of Fermentations*, São Carlos, SP, Brazil, July 31st-August 2nd, 1996. Sbm/Abeq, São Paulo, 1996.
- [5] S. Parekh, A. Margaritis, Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22 (1985) 446-448.
- [6] R.J. Rouwenhorst, L.E. Visser, A.A. van Der Baan, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken, Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 1131-1137.
- [7] A. Cruz-Guerrero, I. Garcia-Peña, E. Barzana, M. Garcia-Garibay, L. Gomez-Ruiz, *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain, *J. Ferment. Bioeng.* 80 (1995) 159-163.

- [8] R.F. Schwan, R.M. Cooper, A.E. Wheals, Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts, *Enzyme Microb. Technol.* 21 (1997) 234-244.
- [9] G. Noratto, D. Campos, Producción de inulinasa (2,1-β-D-fructan fructanohidrolasa) a partir de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-8281, *Anales Científicos Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Peru)* 45 (2000) 193-210.
- [10] A.K. Gupta, D.P. Singh, N. Kaur, R. Singh, Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*, *Chem. Technol. Biotechnol.* 59 (1994) 377-385.
- [11] F.A.A. Costa, Contribuição ao estudo de produção de invertase extracelular por leveduras, Master Thesis in Food Engineering, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas. 1986, 106p.
- [12] S.J. Kalil, R. Suzan, F. Maugeri, M.I. Rodrigues, Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94 (2001) 257-264.
- [13] B.O. Yépez-Silva-Santisteban, F.F. Maugeri, Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 717-724.
- [14] C. Verduyn, E. Postma, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation, *Yeast* 8 (1992) 501-517.
- [15] D. Vranesick, Z. Kurtanjek, A.M.P. Santos, F. Maugeri, Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*, *Food Technol. Biotechnol.* 40 (2002) 67-73.

- [16] A. Santos, Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Master Thesis in Food Engineering, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, 1998, 86p..
- [17] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426-428.
- [18] C.L. Flores, C. Rodríguez, T. Petit, C. Gancedo, Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (2000) 507-529.
- [19] O. Laloux, J.P. Cassart, J. Delcour, J.V.E. Beeumen, J. Vandenhoute, Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424, *FEBS Lett.* 289 (1991) 64-68.
- [20] J.P. Cassart, J. Östling, H. Ronne, J. Vandenhoute, Comparative analysis in three fungi reveals structurally and functionally conserved regions in the Mig1 repressor, *Mol. Gen. Genet.* 255 (1997) 9-18.
- [21] I. Georis, J.P. Cassart, K.D.E. Breunig, J. Vandenhoute, Glucose repression of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene KIINV1 does not require Mig1p, *Mol. Gen. Genet.* 261(1999) 862-870.
- [22] M.C. Rea, T.M. Cogan, Catabolite Repression in *Enterococcus faecalis*, *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (2003) 159-164.
- [23] G.L. Semanza, HIF-1 mediator of physiological and patophysiological response to hypoxia, *J. Appl. Physiol.* 88 (2000) 1474-1480.
- [24] J.K. Sugai, J.P. Delgenes, Catabolite repression of induction of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*, *Curr. Microbiol.* 31 (1995) 239-244.

- [25] P. Wong, S. Gladney, J.D. Keasling, Mathematical model of the *lac* operon: inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 132 -143.
- [26] J.L.S. Lemos, N.J. Pereira, Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45 (2002) 431-437.
- [27] M.M.C. Meijer, J. Boonstra, A.J. Verkleij, C.T. Verrips, Glucose repression on *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than glucose flux, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24102-24107.
- [28] J.A. Roels, *Energetics and kinetics in biotechnology*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1983.
- [29] B.O. Yépez-Silva-Santisteban, A. Converti, F. Maugeri, Peso relativo da inulinase no balanço de carbono e nitrogênio durante o crescimento de *Kluyveromyces marxianus*, in: *SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, August 2th to 5th, 2005, Recife-PE, Brazil.
- [30] J.I. Castrillo, U.O. Ugalde, Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (1993) 386-393.
- [31] J. Pronk, H.Y. Steensma, J.P. Van Dijken, Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 12 (1996) 1607-1633.

VI. Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balances

Bernardo Onagar Yépez Silva-Santisteban¹, Attilio Converti², Francisco Maugeri Filho^{1*}

Keywords: Carbon source, nitrogen source, inulinase production, *Kluyveromyces marxianus*

Submitted to Food Technology and Biotechnology (October, 2005)

6.1. Summary

Kluyveromyces marxianus ATCC 16045 was cultivated batch wise on minimal medium to overproduce inulinase. Fermented broth was purified by Fast Protein Liquid Chromatography and ultrafiltration and it was obtained pure enzyme fraction. Then, SDS-PAGE electrophoresis allowed calculating molar mass of 59 kDa, and nitrogen determination by the micro-Kjeldhal method allowed evaluating intrinsic inulinase activity of 879 IU/mg. These results were then used to perform material balances of the fermentation process, which suggested that no more than 0.1 % either of carbon or nitrogen initially present in the medium were incorporated in the extracellular inulinase released under different cultivation conditions. The information obtained in this study can be used for future proposal of metabolic models describing inulinase overproduction by this yeast.

6.2. Introduction

Stoichiometric models can be proposed to describe bioprocesses making use of simple material balances based on kinetic results of product formation and substrate uptake. Such a simple tool allowed checking the validity of proposed networks of reactions and provided information on the metabolic routes actually involved in several bioprocesses, namely xylitol production by suspended (1-4) and immobilized yeast cells (5,6), 2,3-butanediol and acetoin production by *Acetobacter Hansenii* (7), and hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* (8,9).

In view of possible use of this methodology to describe the overproduction of an extracellular enzyme, it is needed to include in the network a general and simplified stoichiometric equation describing its formation from limiting substrates. This operation requires knowledge of the intrinsic specific activity of the enzyme expressed as activity units per unit enzyme mass. In the particular case of inulinase overproduction by

Kluyveromyces marxianus, determination of such an activity is hindered by the difficult purification of enzyme solutions and quantification of its mass.

Inulinases from different microbial cultivations have been characterized up to now mainly in terms of molar mass and specific activity referred to total protein content. GrootWassink and Fleming (10) prepared concentrated solutions of *Kluyveromyces fragilis* inulinase using a three-step purification protocol consisting of autolysis, ultrafiltration and precipitation with acetone, which allowed obtaining specific activity of 1338 IU/mg. The resulting inulinase solution contained only three little fractions of contaminant proteins besides the desired enzyme. Manzoni and Cavazzoni (11) obtained concentrated inulinase solutions from *Candida kefir*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces cicerosporus* and *K. fragilis* by 10 kDa ultrafiltration and obtained specific activities in the range 72.3-192.7 IU/mg (11). Azhari *et al.* (12) detected two inulinase fractions (81 and 53 kDa) from *Aspergillus* sp. Finally, Pandey *et al.* (13), reviewing literature data dealing with inulinase production by yeasts and fungi, reported molar masses in the range 53-300 kDa and specific activities in the range 21-350 IU/mg.

However, all these studies made reference to specific inulinase activity referred to mass unit of total protein expressed as albumin. Although very useful for comparison purposes, these relative determinations cannot directly be used for carbon and nitrogen balances to be applied to inulinase synthesis, because its elemental composition is different to albumin. This conclusion is suggested by the work of Rouwenhorst *et al.*, who obtained different values of specific inulinase activity using different methodologies for protein determination (14), among which those of Lowry *et al.* (15) and Bradford (16) and that proposed by the same authors for more accurate determination using total organic carbon analysis (17).

The aim of the present work was to set up an accurate methodology for determination of the intrinsic activity of inulinase from *K. marxianus* as well as to make possible future formulation of a stoichiometric model of its overproduction using kinetic data of substrates (carbon, nitrogen and oxygen sources) uptake and formation of products, including biomass, inulinase, metabolic by-products and carbon dioxide.

6.3. Materials and Methods

6.3.1. Microorganism and fermentations

The microorganism utilized in this study as extracellular inulinase producer, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, was maintained in yeast malt agar at 4 °C. Cryogenic pre-inocula (20 % glycerol at –80 °C) were prepared by 24 h-incubation in 500 mL baffled Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the complex medium described by Kalil *et al.* (18) at 30 °C so as to obtain suspensions with 0.5 optical density.

Batch fermentations were carried out either on minimal (19) or complex medium (18) at the optimum temperature of 30 °C (20), 450 rpm and aeration of 1 vvm in a 3.0-L fermenter, type Bioflow III (New Brunswick Scientific, Edison, NJ), with 2.0 L working volume, after inoculation with biomass from the above suspensions and addition of little amounts of antifoam, type Aratrop (Alcamo Química, Indústria e Comércio Ltda, Sertãozinho, SP, Brazil). A 2N NaOH solution was added to control the pH at its optimum value (3.5) (20). Samples were withdrawn throughout the fermentations to determine the levels of the main metabolites, inulinase, biomass and total proteins. Additional fermentations were also carried out varying the initial sucrose concentration from 10 to 40 g/L, while 5 g/L ammonium sulfate was always used as a nitrogen source.

The effect of aeration was investigated using 1 vvm of O₂-enriched air. For this purpose, a system of valves was used so as to ensure a percentage of O₂ with respect to its solubility in water in the range 90-100 %.

6.3.2. Analytical methods

Cell mass concentration was determined using a UV-VIS spectrophotometer, model DU 640 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), using standard curves relating the optical density at 600 nm to biomass dry weight either in minimal or complex medium. Carbon, hydrogen and nitrogen contents of dry biomass were determined by elemental analysis with a CHN analyzer, Series II 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT). The resulting biomass elemental composition was used to calculate C-mol of biomass.

Concentrations of acetate, ethanol, sucrose, glucose and fructose during fermentations were determined at 40 °C by a HPLC device consisting of 9010 Solvent Delivery System, RI-4 Refractive Index Detector, 9095 Auto-sampler (Varian, Walnut Creek, CA), SPH99 Column Thermostat (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), Millennium Chromatography Manager (Waters, Milford, MA), equipped with an anionic exchange HPX87H column (Biorad Laboratories, Hercules, CA) using a sulfuric acid solution (pH=1.0) as a mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min.

The dissolved oxygen (DO) level was on-line monitored using a polarographic probe (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

The amount of carbon dioxide released during fermentation was determined gravimetrically by collecting the exhausted air from the fermenter in a 1 M KOH solution. The resulting potassium carbonate was precipitated as BaCO₃ by the reaction with a saturated solution of BaCl₂. The BaCO₃ suspension was then filtered through a pre-weighed filter with 0.22 µm pore diameter, and the cake was washed with cold distilled water in the

filtration system and finally dried at 104 °C up to constant weight (approximately 24 h). The carbon dioxide mass was finally calculated from the resulting BaCO₃ dry weight.

The nitrogen content of pure inulinase was determined with the micro-Kjeldhal method, while that of total proteins in the fermented broth according to Lowry *et al.* (15).

6.3.3. Determination of inulinase activity

Inulinase activity was assayed according to Santos (21). The enzyme solution (0.5 mL) was mixed with 4.5 mL of 2 % sucrose in 0.1 M acetate buffer (pH 4.8). The mixture was maintained at 50 °C during 8 or 40 min, depending on the enzyme concentration, and the rate of appearance of reducing sugars was determined by the colorimetric method of 3,5-dinitrosalicylic acid (22). One unit of inulinase activity was defined as the amount of enzyme able to hydrolyze 1 µmol of sucrose per min, under the above conditions.

6.3.4. Inulinase purification and concentration

The fermented broth was produced using 10 g/L of sucrose in minimal medium and was concentrated passing first through a 1 kDa cellulose ultrafilter, model Prep/scale-TFF 1 ft2, cat. N. CDUF001LA (Millipore Corporation, Bedford, MA) and then through a 50 mL stirred cell model 8050 employing a 30 kDa YM30 DIAFLO® Ultrafiltration Membrane (Amicon INC, Beverly, MA). Inulinase was then purified by a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden), using a Q Sepharose FF anion exchange resin and 0.05 M phosphate buffer at pH=6.0 as eluent with 0-0.8 M NaCl gradient, and the resulting fractions with inulinase activity were concentrated with a 10 mL stirred cell model 8010 employing the same ultrafiltration membrane as above.

6.3.5. Determinations of inulinase molar mass and purity degree

Inulinase molar mass and purity degree of the active fractions were determined by SDS-PAGE electrophoresis using a 7.5 % acrylamide/bisacrylamide gel and

Tris/glycine/SDS buffer as eluent. After 30-40 min runs at 150 V, the protein bands were fixed with 25 % isopropanol and 10 % acetic acid and revealed with Coomassie Blue. To determine the molar mass of inulinase we used a high molar mass standard mixture, HMW Calibration Kit (Pharmacia-Biotech: 330, 18.5, 60, 36, 67 kDa). To determine the relative mobility (R_f) of a protein, its migration distance from the top of the separating gel to the center of the protein band was divided by that of the bromophenol blue tracking dye from the top of the separating gel. The R_f values were plotted against the known molar masses for calibration curve.

6.4. Results and Discussion

6.4.1. Intrinsic specific inulinase activity

The presence of only one band for each fraction tested by SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 1) pointed out that purification of the cultivation broth of *K. marxianus* ATCC 16045 by the FPLC system provided a practically purified inulinase preparation from minimal medium. In addition, as shown in Table 1, the molar mass of inulinase was 59 kDa. Rouwenhorst *et al.* (14), determined a subunit molar mass of 64 kDa of the dimeric inulinase for the corresponding monomer produced by *K. marxianus* CS 6556 (14).

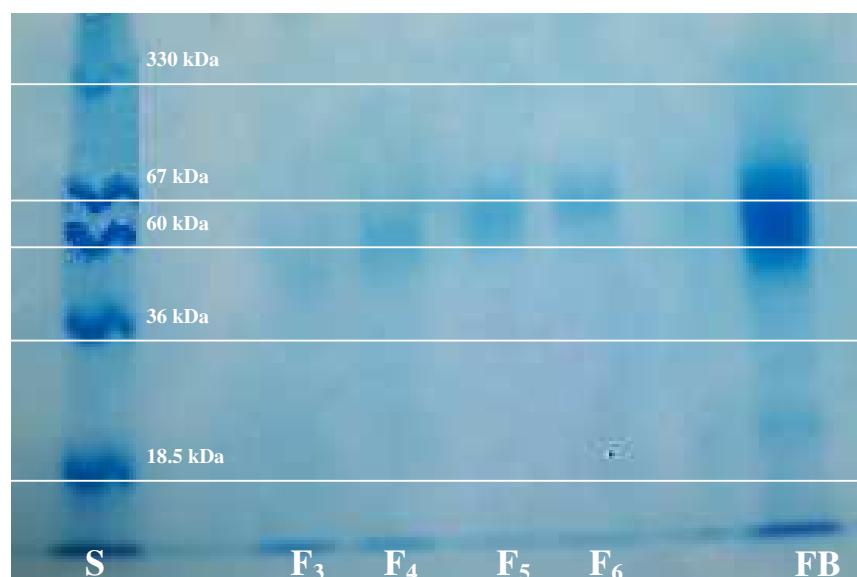


Fig. 1. SDS-PAGE electrophoreses of four fractions of purified inulinase from *K. marxianus* ATCC 16045 (F₃, F₄, F₅ and F₆), fermented broth (FB), and standard enzyme solutions (S)

Table 1. Results of SDS-PAGE electrophoreses performed on inulinase solutions purified by FPLC and ultrafiltration for determination of inulinase molar mass.

Fraction	First determination			Second determination		
	Run (cm)	R _f ^a	MM ^b (kDa)	Run (cm)	R _f ^a	MM ^b
(kDa)						
F3	2.210	0.414	62.1	2.114	0.393	63.9
F4	2.298	0.431	59.5	2.244	0.417	60.0
F5	2.472	0.463	54.7	2.366	0.440	56.5

^aR_f = relative mobility

^bMM = molar mass

The intrinsic specific inulinase activity was then determined relating the mass of inulinase present in the purified solution to the initial activity before purification. The primary structure of the enzyme was reported by Laloux *et al.* (23) from sequencing the *KmINU1* gene responsible for inulinase expression in *K. marxianus*. The elemental

composition of inulinase ($C_{2861} H_{4093} O_{761} N_{694} S_7$) was deduced from this gene sequence and the ratio of 6.23 g of inulinase per g of nitrogen was calculated from this composition. The starting activity contained in 455 mL of the fermented broth was 1692 IU and of the nitrogen content of the corresponding purified enzyme solution was 0.295 mg N. Using these data it was possible to evaluate a protein mass of inulinase present in the sample corresponding to an intrinsic specific activity of 879 IU per mg of inulinase. Although this value is not so far from that obtained by Rouwenhorst *et al.* (14) for *K. marxianus* CS 6551 cultivation on sucrose (1,388 IU/mg) (14), one can recognize as possible causes of variations in such a parameter the different carbon sources used by the above authors (sucrose, inuline or raffinose) as well as the variable degree of glycosylation (14) notoriously linked to the protein, which could have appreciably influenced their inulinase mass estimation from experimental data of carbon content.

6.4.2. Carbon and nitrogen balances

The intrinsic specific inulinase activity was then utilized to calculate the inulinase mass produced in fermentations performed under different conditions (Table 2). As the data of Figure 2 show, inulinase represented only up to 0.1 % of total carbon balance; therefore, its mass could be considered to be negligible in the overall stoichiometric balances. Moreover the specific enzyme production ranged between the orders of magnitude of nmol and μ mol of inulinase per C-mol of biomass and between μ g and mg of inulinase per g of biomass, or sucrose or ammonium sulfate (Table 3).

Table 2. Main experimental results of *K. marxianus* ATCC 16045 cultivations performed under different conditions

Run	1	2	3	4
Sucrose (g/L)	10	10	40	40
Aeration ^a	Air	Air + O ₂	Air	Air + O ₂
$X_{\max}$ (g/L) ^b	3.7	3.5	9.1	11
$A_{\max}$ (IU/mL) ^c	6.4	5.3	7.2	6.1
Total proteins (g/L)	0.89	—	1.22	—
Ethanol (g/L)	0.49	0.50	7.26	2.46

^aAeration performed at 1 vvm

^b $X_{\max}$ = Maximum biomass concentration

^c $A_{\max}$ = Maximum inulinase activity

The carbon material balance was close to 100 % up to the middle exponential phase, and then a progressively increasing fraction was lost (Fig 2a). These losses, (reached 20-30 % of the starting carbon at the end of fermentations), were likely due to either sampling or evaporation of volatile or gaseous products, such as ethanol and carbon dioxide. On the contrary, large variations were observed for nitrogen material balances (from -36 to 19 %) (Fig 2b), which suggests that the method of Lowry *et al.* (15) was inaccurate to determine the level of extracellular proteins in the specific case under investigation.

On the basis of the literature knowledge on the metabolism of this yeast (24), hypotheses were formulated about the main metabolic routes (glycolytic pathway, pentose phosphate pathway, fermentation, pyruvate bypass, tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation) involved in the formation of the main products, and the experimental stoichiometric coefficients listed in Table 3, referred to all the C-containing species, could be used to estimate the corresponding yields of conversion multiplying by their respective molar masses. These results point out that, under all the conditions tested, the main

metabolic products of the overall metabolism of *K. marxianus* were carbon dioxide and biomass, that reached at the end of fermentations $Y_{\text{CO}_2/S} = 0.84\text{-}0.85$ g/g and $Y_{X/S} = 0.16\text{-}0.33$ g/g, respectively. Both results were the consequence of the aerobic conditions needed to stimulate inulinase production. In addition, the fermentations with high initial sucrose level ($S_o = 40$ g/L) exhibited the highest ethanol concentrations (2-7 g/L). Strict aerobic conditions ensured by air enrichment with O_2 did not suppress ethanol formation but only reduced it, hence indicating that the synthesis of this metabolite was mainly the result of an overflow of the carbon source through the glycolysis rather than the product of anaerobic fermentation.

These results also suggest that nitrogen was preferably used for biomass synthesis and only to less extent for the production of extracellular proteins.

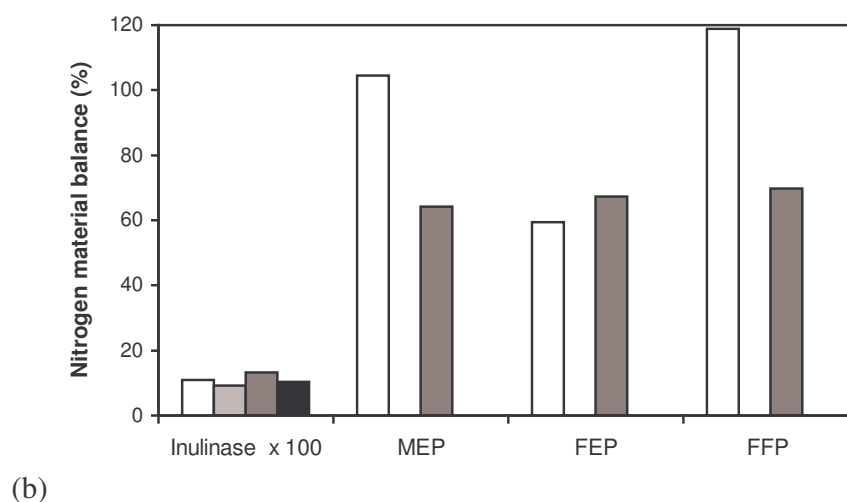
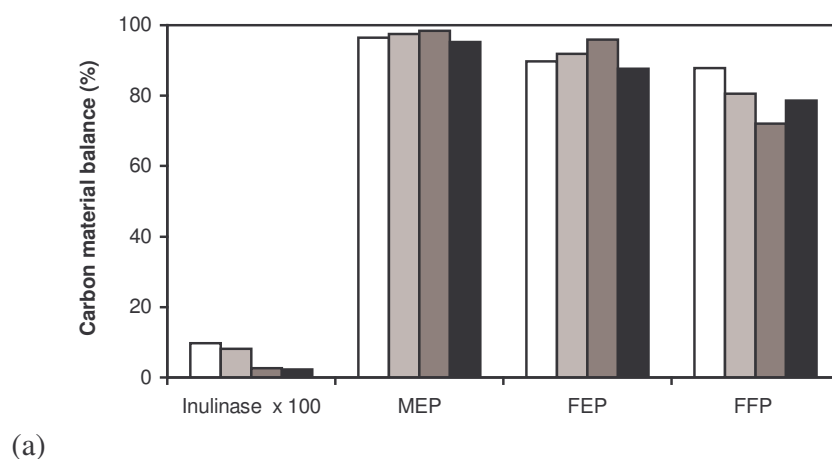


Fig. 2. Inulinase as a carbon and nitrogen destination, and carbon (a) and nitrogen (b) material balances performed during (MEP) the middle exponential phase, (FEP) the final exponential phase and (FFP) the final fermentation phase of *K. marxianus* ATCC 16045 cultivations performed under different conditions. All percentages are related to carbon and nitrogen initial medium content. (□) Initial sucrose concentration = 10 g/L; Air supply: 1 vvm; (■) Initial sucrose concentration = 10 g/L; Air + O₂ supply: 1 vvm; (■) Initial sucrose concentration = 40 g/L; Air supply: 1 vvm; (■) Initial sucrose concentration = 40 g/L; Air + O₂ supply: 1 vvm

Table 3: Stoichiometric coefficients referred to the production of 1 C-mol of biomass (C-mol_x) obtained for *K. marxianus* ATCC 16045 cultivations performed under different conditions*

Run	Substrate		Product								
	Sucrose (mol/ C-mol _x)	Ammonium sulfate (mol/ C-mol _x)	Inulinase (mol x 10 ⁻⁹ / C-mol _x)	Glucose (mol/ C-mol _x)	Fructose (mol/ C-mol _x)	Pyruvate (mol/ C-mol _x)	Glycerol (mol/ C-mol _x)	Acetate (mol/ C-mol _x)	Acetaldehyde (mol/C-mol _x)	Ethanol (mol/ C-mol _x)	CO ₂ (mol/ C-mol _x)
MEP ^a											
1	0.690	0.109	107.45	0.185	0.639	0	0.1851	0	0	0.0685	1.84
2	0.735	0.158	183.86	0.100	0.496	0	0.0221	0.0134	0.0196	0.5441	2.88
3	0.690	-	162.50	0.166	0.543	0	0.0327	0.0392	0	0.2115	2.21
4	0.719	0.233	185.05	0.260	0.583	0	0.0249	0.0115	0.0022	0.0464	1.97
FEP ^b											
1	0.250	0.154	363.53	0	0	0.0000	0.004	0	0	0.011	1.64
2	0.463	0.133	91.65	0	0	0.0039	0.010	0.003	0.087	0.529	3.05
3	0.285	-	1.27	0	0	0.0065	0.000	0.021	0	0.102	1.88
4	0.376	0.122	0,00	0	0	0.0127	0.025	0.003	0.006	0.172	2.48
FFP ^c											
1	0.254	0.095	1063.04	0	0	0	0	0	0	0.011	1.68
2	0.515	0.166	558.93	0	0	0.0048	0.0034	0	0.006	0	3.38
3	0.336	-	1152.59	0	0	0.0108	0	0	0	0	2.22
4	0.356	0.115	347.30	0	0	0.0023	0.0007	0	0	0	2.35

*For conditions of runs 1-4 see Table 2.

^aMEP = Middle exponential phase

^bFEP = Final exponential phase

^cFFP = Final fermentation phase

6.5. Conclusions

The overproduction of inulinase by *K. marxianus* ATCC 16145 cultivation was investigated under different conditions. The intrinsic specific activity of this enzyme was 879 IU/mg. Extracellular inulinase production ranged between the orders of magnitude of nmol and μ mol of enzyme per mol of biomass, sucrose or ammonium sulfate, thus representing no more than 0.1 % either of consumed carbon or nitrogen. Therefore, notwithstanding the very high enzyme activity, its inclusion in a stoichiometric model based on material balances could be considered to be negligible.

Material balances, made under different cultivation conditions to better understand the metabolism of *K. marxianus* ATCC 16045, were satisfactory up to the final exponential phase, whereas significant C loss occurred during the final fermentation phase. Carbon dioxide and biomass syntheses were the main activities responsible for carbon consumption under all the conditions tested, while biomass syntheses and the production of extracellular proteins were so for nitrogen uptake.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP (São Paulo-Brazil).

6.6. References

1. A. Converti, J. M. Domínguez, Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 39-45.
2. A. Converti, P. Perego, A. Sordi, P. Torre, Effect of starting xylose concentration on the microaerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*: the use of carbon material balances. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 101 (2002) 15-29.
3. B. Rivas, P. Torre, J. M. Domínguez, P. Perego, A. Converti, J. C. Parajó, Carbon material and bioenergetic balances of xylitol production from corncobs by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Progr.* 19 (2003) 706-713.
4. F. C. Sampaio, P. Torre, F. M. L. Passos, P. Perego, F. J. V. Passos, A. Converti, Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnol. Progr.* 20 (2004) 1641-1650.
5. W. Carvalho, J. C. Santos, L. Canilha, S. S. Silva, P. Perego, A. Converti, Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochem. Eng. J.* 25 (2005) 25-31.
6. J. C. Santos, A. Converti, W. Carvalho, S. I. Mussatto, S. S. Silva, Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. *Proc. Biochem.* 40 (2005) 113-118.
7. D. De Faveri, P. Torre, F. Molinari, P. Perego, A. Converti, Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 708-719.
8. A. Converti, P. Perego, Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 303-309.

9. A. Converti, P. Perego, M. Del Borghi, Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* 82 (2003) 370-377.
10. J. W. D. GrootWassink, S. E. Fleming, Non-specific b-fructofuranosidase(inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 45-53.
11. M. Manzoni, V. Cavazzoni, Extracellular inulinase from four yeasts. *LWT-Food Sci Technol.* 21 (1988) 271-274.
12. R. Azhari R, A. M. Szlak, E. Ilan, S. Sideman, N. Lotan, Purification and characterization of endo- and exo-Inulinase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11 (1989) 105-117.
13. A. Pandey, C. R. Soccol, P. Selvakumar, V. T. Soccol, N. Krieger, J. D. Fontana, Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81 (1999) 35-52.
14. R. J. Rouwenhorst, M. Hensing, J. Verbakel, A. W. Scheffers, P. van Dijken, Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 3337-3345.
15. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
16. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
17. R. J. Rouwenhorst, J. F. Jnz, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken, Determination of protein concentration by total organic carbon analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 22 (1991) 119-128.

18. S. J. Kalil, R. Suzan, F. Maugeri, M. I. Rodrigues, Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94 (2001) 257-264.
19. C. Verduyn, E. Postma, W.A. Scheffers, J.P. van Dijken, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8 (1992) 501-517.
20. D. Vranesick, Z. Kurtanek, A.M.P. Santos, F. Maugeri, Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (2002) 67-73.
21. A. Santos: Síntese de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Master Thesis in Food Engineering, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil, 86p. (1998).
22. G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (1959) 426-428.
23. O. Laloux, J. P. Cassart, J. Delcour, J. V. E. Beeumen, J. Vandenhoute, Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Letters* 289 (1991) 64-68.
24. C. L. Flores, C. Rodriguez, Petit T, C. Gancedo, Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Review* 24 (2005) 507-529.

VII. Optimization of separation by HPLC of yeast metabolites using experimental design

Bernardo Onagar Yépez Silva Santisteban; Fátima Aparecida Almeida Costa;
Francisco Maugeri Filho

Submitted to Journal of Chromatography A (Dezember, 2005)

7.1. Abstract

For improving the determination of metabolites during yeast growth, HPLC separations of sucrose, glucose, fructose, glycerol, acetate, acetaldehyde and ethanol was optimized using experimental design. The separation was carried out isocratically on an ion exchange/ion exclusion Bio-Rad Aminex HPX-87H column, which is typically used for separating organic acids. Additionally, as reported in the literature, this column can also be used to separate alcohols, aldehydes and sugars. A central composite design, a complete factorial design 2^3 , with three central points and six rotational axial points, was performed, and the use of surface response analysis allows obtaining the best separation condition. The independent variables or factors that were studied are the column temperature, flow rate and pH of the mobile phase. The range of study was between 30 and 60 °C, 0.3 and 0.8 mL/min and 1 and 3, for temperature, flow rate and pH of mobile phase, respectively. The separation was evaluated according to a dependent or response variable, the resolution of adjacent peaks, corresponding to each separated analyt, which was maximized by surface response analysis. Two ways for calculation of the peak resolution were used, one for totally separated peaks and another for overlapped peaks. The overlapped peaks were those of sucrose, glucose and fructose, in the respective elution order, while others analyt peaks were totally separated. The flow rate of mobile phase hardly affected the retention time, nevertheless the temperature and the pH had a significant effect on resolution. The best separation condition was: 40 °C, 0.7 mL/min and mobile phase of H_2SO_4 at pH 1.

7.2. Introduction

Many feel that chromatographic theory is complex and difficult to comprehend. The successful chromatographic separation involves making a compromise between chromatographic resolution, sample capacity, and analysis time or speed. It is possible to

alter the experimental conditions of separation to improve one of these qualities at the expense of the other two. Although more sophisticated optimization techniques exist, it has been generally found that the search for optimum conditions for a separation should be done by varying only one parameter at a time [1].

However, it can be used uni-variable analysis (one parameter at time), experimental design or complete factor combination for evaluating the effect that the independent variable or factor has on the interest response in a process. It is advantageous that experimental design allows minimizing the amount of assays for the same or better results, if it is compared with the others. The type and the number of experimental designs that is needed to be performed, depend mainly on the number of independent variables that is included in the analysis. In the case of 2 or 3 independent variables it is necessary to perform a complete experimental design, contrarily analysis conclusion could be doubtful [2]. Experimental design can be used for the optimization of a process that could be influenced by several factors and when this influence is complex for practical purpose, also when the mechanism of this process is not the aim of the study, for instance, the case of optimization of two separation factors in analysis of organic acids by chromatography [3].

The methodologies more widely used for monitoring metabolites during yeast and fungi growth are gas chromatography (GC), liquid chromatography (HPLC), spectrophotometry, enzymic methods and photometry, as it is shown in table 1.

Table 1. Methodologies most used for determinations of some metabolites during yeast and fungi growth.

Component	Method	Column type or principle method	Source	Microorganism	Reference
Glucose	Enzymatic method	Glucose oxidase	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[4], [5] and [6]
Pyruvate	Enzymatic method	Lactate dehydrogenase, abs 340 nm	Extracellular	<i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[7] and [6]
	HPLC	Spherisorb ODS-2	Extracellular	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[8]
	HPLC	Rezex ROA OOH-0138-KO Detector UV	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[4]
	HPLC	HPX-87H Detector RI and UV	Extracellular	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[5]
	HPLC	HPX-87X detector UV	Extracellular	<i>Aspergillus oryzae</i>	[7]
Glycerol	GC	Carbowax 1500, Chromosorb WAW 80/100	Extracellular	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[9]
	HPLC	Rezex ROA OOH-0138-KO Detector RI	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[4]
	HPLC	HPX-87H Detector RI and UV	Extracellular	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[5]
	HPLC	HPX-87H Detector RI and UV	Extracellular	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[5]
Acetate	Enzymatic method	-	Extracellular	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[9]
	HPLC	Spherisorb ODS-2	Extracellular	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[8]
	HPLC	Rezex ROA OOH-0138-KO Detector UV	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[4]
	HPLC	HPX-87H Detector RI and UV	Extracellular	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[5]
Acetaldehyde	GC	HP INNOWAX Detector FID	Air exahusted	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[10]
	GC	Carbowax 1500, Chromosorb WAW 80/100	Extracelullar	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[9]
	Enzymatic method	-	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[6]
Ethanol	GC	Chromsorb101	Extracellular	<i>Aspergillus oryzae</i>	[7]
	HPLC	HPX-87H Detector RI	Extracellular	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[11]
	GC	HP INNOWAX Detetor FID	Exahusted air	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[10]
	GC	Carbowax 1500, Chromosorb WAW 80/100	Extracellular	<i>Kluyveromyces sp.</i>	[9]
	HPLC	Rezex ROA OOH-0138-KO Detector RI	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[4]
	Enzymatic method for low concentrations	Alcohol oxidase	Extracellular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Kluyveromyces lactis</i>	[4] and [5]
	HPLC	HPX-87H Detector UV	Extracellular	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[5]
	HPLC	HPX-87H Detector UV	Extracellular	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[5]

The procedures for separating compounds such as sucrose, glucose, fructose, glycerol, acetate, acetaldehyde and ethanol, found in factory's brochures indicate the need of the use of three or four kinds of columns, and possibly more than one kind of chromatographic method. Using HPLC with the Bio-Rad Aminex HPX-87H column it is possible to quantify organic acids such as acetic acid, while with a Shodex Sugar SC1011 column we can quantify glucose, fructose and glycerol, as well as the Shodex Sugar KS-

801 is able to separate and quantify glucose, fructose, sucrose and ethanol. However for quantifying acetaldehyde it is necessary GC and we could use the HP INNOWAX column [10], that additionally is able to separate ethanol. For the same aim we could use the Supelchem Carbowax 1500 column [9], that is capable to separate ethanol and glycerol. Another columns, such as Shodex Sugar SH1011, are able to quantify sugars and organic acid simultaneously. The possibility of analysis of this mixture, mentioned above, on only one run represent a significant reduction of chromatographic effort and an easier way to analyze data of microorganism growth.

The Bio-Rad Aminex HPX-87H column is able to separate alcohols, aldehydes, and sugars, besides organic acids, as it is shown in tables 1 and 2. Additionally, it is shown in table 2 that several conditions of separations were reported for the use of this column and it is not clearly stated which are the best conditions.

Timpa and Burks [12] studied the separation of three organic acids (malic, oxalic and citric acid) and two carbohydrates (sucrose and glucose) with a HPX-87H column, where the temperature and elution flow rate were optimized according to an one-at-time factor methodology. Additionally, overlapped peaks of organic acids and carbohydrate were observed. Similarly, this column was used to quantify seven organic acids (galacturonic, quinic, succinic, shikimic and fumaric acid) and three sugars (sucrose, glucose and fructose) in fruit juices [13]. As observed in table 1 and 2, it is possible to conclude that this column has a great potential to simplify the quantifications of metabolites.

The goal of chromatography is to separate components of a sample within a reasonable period of time into separate peaks as they migrate through the column. However, it was observed that some analytes have overlapped peaks, for this reason it is necessary to improve the column separation capability. The resolution (R) is a measure of

separation quality of a chromatographic method, and it is defined in relation to two adjacent peaks.

Table 2. Separation conditions commonly used with Bio-Rad Aminex HPX-87H.

Source	Analytes	Mobile phase	pH	Temp (°C)	Flow rate (mL/min)	Detector
[13]	Sucrose Glucose Fructose Oxalic acid Malic acid Citric acid Galacturonic acid Quinic acid Succinic acid Shikimic acid Fumaric acid	0.005 N phosphoric acid Isocratic elution	-	25	0.4	UV for organic acids RI for sugars
[12]	Sucrose Glucose Malic acid Citric acid Oxalic acid	0.014 N sulfuric acid	2.1	30	0.5	UV and RI
[14]	Malic acid Oxalic acid Succinic acid Citric acid	0.0008 N sulfuric acid	-	75	0.8	UV
[15]	Malic acid	0.01 N sulfuric acid	-	65	0.8	UV/RI indifferently
[16]	D-Xylose Xylitol	0.01 N sulfuric acid	-	60	0.7	RI
[17]	Sucrose Fructose Glucose Ascorbic acid Dehydroascorbic acid 5-Hydroxymethylfurfural Furfural Dimethylhydroxyfuranone 2-furoic acid 2-acetylfuran Furfuryl alcohol	0.005 M sulfuric acid: acetonitrile 16:84 (v/v)	-	25	0.5	RI and PAD

The aim of the present work is to optimize the separation of a mixture of sugars, aldehydes, alcohols and organic acids that are common metabolites in culture medium of yeasts and fungi, using Bio-Rad Aminex HPX-87H column in a HPLC equipment. The experimental design methodology was used with the purpose of optimization.

7.3. Material and Methods

7.3.1. Liquid chromatography and sample

The concentrations of acetate, ethanol, sucrose, glucose, glycerol, acetaldehyde and fructose during fermentations were determined by a HPLC device consisting of 9010 Solvent Delivery System, RI-4 Refractive Index Detector, 9095 Auto-sampler (Varian, Walnut Creek, CA), SPH99 Column Thermostat (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), Millenium Chromatography Manager (Waters, Milford, MA), equipped with an anionic exchange/ion exclusion HPX87H 300mm x 7.8 mm column (Biorad Laboratories, Hercules, CA). The resin ionic form in this column is hydrogen, the support is sulfonated divinyl benzenestyrene copolymer, the particle size is 9 mm, the maximum pressure is 1500 psi, the maximum temperature is 65 °C, the typical mobile phase is sulfuric acid diluted solution (0.005M H₂SO₄), the standard flow rate is around 0.6 mL/min, and finally the pH range is between 1 to 3. It was used an injection volume of sample of 98 µL.

The separation tests were performed with a cocktail solution containing sucrose, glucose, fructose, glycerol, sodium acetate, acetic acid, ethanol and acetaldehyde as it is shown in table 3, pure solution were used to identify the retention time of each studied analyt.

Table 3. Cocktail solution and its composition

Analyt	Concentration (g/L)
Sucrose	1.0
Glucose	1.0
Fructose	1.0
Glycerol	1.0
Acetic acid	1.0
Ethanol	1.0
Acetaldehyde	0.5
Sodium acetate	0.5
Ethyl acetate	0.5

7.3.2. Experimental design

The experimental design was performed as a central composite design (CCD), a factorial design with three variation factors at two levels (2^3), plus three central points and six axial points, as it is shown in table 4. This kind of design allows diminishing the number of assays to 17. The studied variation factors or independent variables were column temperature, pH and flow rate of mobile phase. The real values were defined as a function to the range of column operation, as it was described in the last item, and shown in table 4. The dependent variable or response was the resolution between two adjacent peaks and it was calculated by two ways. When the peaks were overlapped it was calculated as shown by equation 1, on the other hand if they did not, it was used the equation 2, both of them reported by Snyder *et al.* [18] and Johnson and Stevenson *et al.* [1].

$$R_2 = \frac{T_2 - T_1}{\frac{W_1 + W_2}{1.18}} \quad (1)$$

where:

T_1 and T_2 are retention time of each overlapped adjacent peaks;

W_1 and W_2 are width of the base, at the middle of their height, of each overlapped adjacent peaks.

$$R_1 = \frac{t_2 - t_1}{\frac{w_1 + w_2}{2}} \quad (2)$$

where:

t_1 and t_2 are the retention time of each adjacent peaks totally separated;

w_1 and w_2 are the width of the base of each peaks totally separated.

Table 4. Factorial design 2^3 (CCD), coded and real values.

Assay	Temperature		Flow rate		pH	
	coded	real	coded	real	coded	real
1	-1	36	-1	0.4	-1	1.4
2	1	54	-1	0.4	-1	1.4
3	-1	36	1	0.7	-1	1.4
4	1	54	1	0.7	-1	1.4
5	-1	36	-1	0.4	1	2.6
6	1	54	-1	0.4	1	2.6
7	-1	36	1	0.7	1	2.6
8	1	54	1	0.7	1	2.6
9	-1.68	30	0	0.55	0	2.0
10	1.68	60	0	0.55	0	2.0
11	0	45	-1.68	0.3	0	2.0
12	0	45	1.68	0.8	0	2.0
13	0	45	0	0.55	-1.68	1.0
14	0	45	0	0.55	1.68	3.0
15	0	45	0	0.55	0	2.0
16	0	45	0	0.55	0	2.0
17	0	45	0	0.55	0	2.0

The chromatograms were printed, the data of W_i and w_i were obtained in cm with a paquimeter and then transformed to min according to the chromatogram scale. The time retention (T_i and t_i) was reported by an integrator system.

All the data were treated with the aid of STATISTICA 5.0 by Statsoft Inc. (USA), and the effects of each factor were calculated and evaluated in function of their significance. Then the ANOVA was constructed for validate the empiric model that define the response as a function of factors. Next, the response surface was drawn for analyzing the influence of each factor and reaching the best separation conditions.

7.4. Results and Discussion

7.4.1. Chromatogram profile

A typical profile of a chromatogram is shown in Fig 1, where the order of elution is sucrose, glucose, fructose, glycerol, acetate, acetaldehyde and ethanol, respectively. It was observed that the analyts with overlapped peaks were only sucrose, glucose and fructose, in this order. Glucose and fructose peaks are apparently symmetric peaks, and on the contrary,

the sucrose peaks are asymmetric. The other analytes are symmetric and, as it was verified in all tested conditions, they were always eluted as totally separated peaks. On the other hand, the ethyl acetate was never detected on tested conditions, possibly because HPX-87H is unable to separate this component.

As a result of these observations, the problem was practically summarized in the maximization of the resolution between the following pairs of peaks: sucrose and glucose, and glucose and fructose. For this reason, the statistical analyses are shown in detail only for these pair of peaks, in terms of effect tables, model, ANOVA tables and response surfaces. For the others analytes only the main effects were shown and the corresponding best separation conditions in paragraphs below.

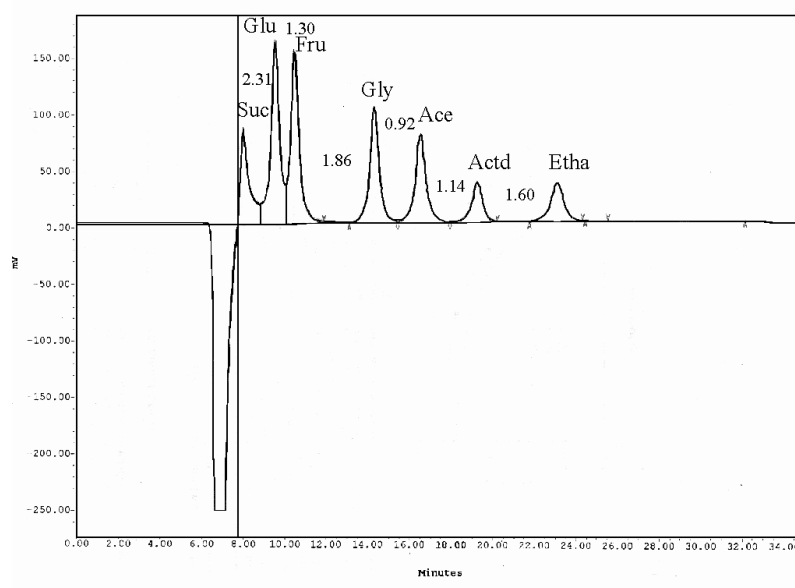


Figure 1. Chromatogram profile, resolutions, and elution order for sucrose, glucose, fructose, glycerol, acetate, acetaldehyde and ethanol, using 45°C, 0.55 mL/min and pH 1. Overlapped peaks were only observed between sucrose, glucose and fructose.

7.4.2. Factorial design 2³

The table 5 shows the resolution as a function of different separation conditions by varying the column temperature, pH and flow rate of the mobile phase, on the following ranges: 30 to 60°C, 1 to 3 and 0.3 to 0.8, respectively.

The resolution coefficient between sucrose and glucose varied from 1.1 to 2.3 as a function of the separation conditions, as shown in table 5. As a result of the statistical analyses, the table 6 shows that the temperature is the only factor that significantly influences, this resolution, at 95% of confidence. The temperature has a negative effect on resolution and this effect could be represented by the model described in equation (3) and validated by ANOVA in table 7. In this table, the F-test for evaluating the prediction capacity of the model is shown, and it was observed that the F-ratio for regression was 5 times higher than the F-tabulated ($F_{0,95, 2, 22}$). No lack of fit was observed for this model.

Figure 2 depicts the response surface for the effect of temperature, pH and flow rate on sucrose-glucose resolution, and the response surface analysis allowed defining 40°C as the optimum temperature for separation of this pair of analyts. A peak resolution of about 2.1 was obtained for this chromatographic condition. Related to pH and flow rate, it was observed that these factors didn't significantly affect the result, so that any value for them could be used within the range used in this work.

Table 5. Factorial design 2³ CCD: Variation factors at real values and pair of peak resolution as responses (R_{ij}), where i and j are adjacent analyts.

Temperature °C	Flow rate mL/min	pH	$R_{suc/gluc}$	$R_{gluc/fru}$	$R_{fru/glyc}$	$R_{glyc/acet}$	$R_{acet/actd}$	$R_{actd/etha}$
36	0,4	1,4	2,177	1,304	1,841	1,015	1,003	1,622
54	0,4	1,4	1,252	1,165	1,962	0,872	1,195	1,557
36	0,7	1,4	1,974	1,176	1,734	0,899	0,959	1,536
54	0,7	1,4	2,136	1,266	1,806	0,904	1,088	1,408
36	0,4	2,6	2,006	1,218	1,924	0,926	1,208	1,528
36	0,4	2,6	2,107	1,233	1,993	0,953	1,217	1,888
36	0,4	2,6	2,111	1,320	2,000	1,003	1,273	1,933
54	0,4	2,6	1,890	1,142	2,198	0,969	1,888	2,041
54	0,4	2,6	1,140	1,073	2,182	0,983	1,888	1,948
54	0,4	2,6	1,148	1,081	2,253	0,962	1,807	1,942
36	0,7	2,6	2,166	1,270	1,741	0,948	1,092	1,579
36	0,7	2,6	2,108	1,283	1,689	0,934	1,062	1,513
36	0,7	2,6	2,166	1,270	1,690	0,980	1,110	1,586
54	0,7	2,6	1,583	1,118	1,904	0,796	1,283	1,413
54	0,7	2,6	1,167	1,164	1,883	0,773	1,247	1,567
54	0,7	2,6	1,283	1,121	1,854	0,752	1,237	1,619
30	0,55	2	2,257	1,323	1,841	0,993	1,080	1,640
60	0,55	2	0,449	1,014	2,035	0,911	1,628	1,623
45	0,3	2	1,615	1,164	2,119	1,057	1,583	1,886
45	0,8	2	2,224	1,245	1,791	0,925	1,091	1,443
45	0,55	1	2,306	1,301	1,863	0,917	1,140	1,597
45	0,55	3	2,221	1,225	1,874	0,909	1,127	1,519
45	0,55	2	2,118	1,286	1,889	0,907	1,082	1,304
45	0,55	2	2,016	1,195	1,865	0,906	1,128	1,513
45	0,55	2	1,994	1,237	1,865	0,896	1,136	1,518

Table 6: Main significant effects on the resolution between sucrose and glucose ($R_{suc/glu}$).

Factor	Effect	Standard error	t(10)	p
Mean	2,05258	0,06865	29,89913	4,1E-11
T	-0,76343	0,094529	-8,07611	1,08E-05
T ²	-0,52916	0,122449	-4,3215	0,00151

$$R_{Suc/gluc} = 2.052 - 0.38 \times T - 0.26 \times T^2 \quad (3)$$

$\pm 0.068 \quad \pm 0.047 \quad \pm 0.061$

Table 7: ANOVA for validation of the model that describes the effect of temperature on the resolution between sucrose and glucose ($R_{\text{suc}/\text{glu}}$) from factorial design CCD 2³.

Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	<i>F</i> -test
Regression	4,040	2	2,020	28,20 ^a
Residual	1,576	22	0,072	1,49
Lack of fit	1,094	12	0,091	1,89 ^b
Purê error	0,482	10	0,048	
Total	5,616	24		

R-squared: 0.72; $F_{0,95, 2, 22} = 5,71$

^a *F*-ratio (regression/residual).

^b *F*-ratio (lack of fit/pure error).

The glucose-fructose resolution coefficient varied from 1.01 to 1.32 as a function of the separation conditions. It is shown in table 8 that the temperature and pH have a negative effect on the response at 95% of confidence, while the corresponding temperature effect is higher than that of the pH. Temperature and pH effects can be represented by the model shown in equation (4). This model was validated by the ANOVA in table 9 using *F*-test, where the *F*-ratio for regression was 15 times higher than the *F*-tabulated ($F_{0,95, 3, 21}$) and no lack of fit was observed.

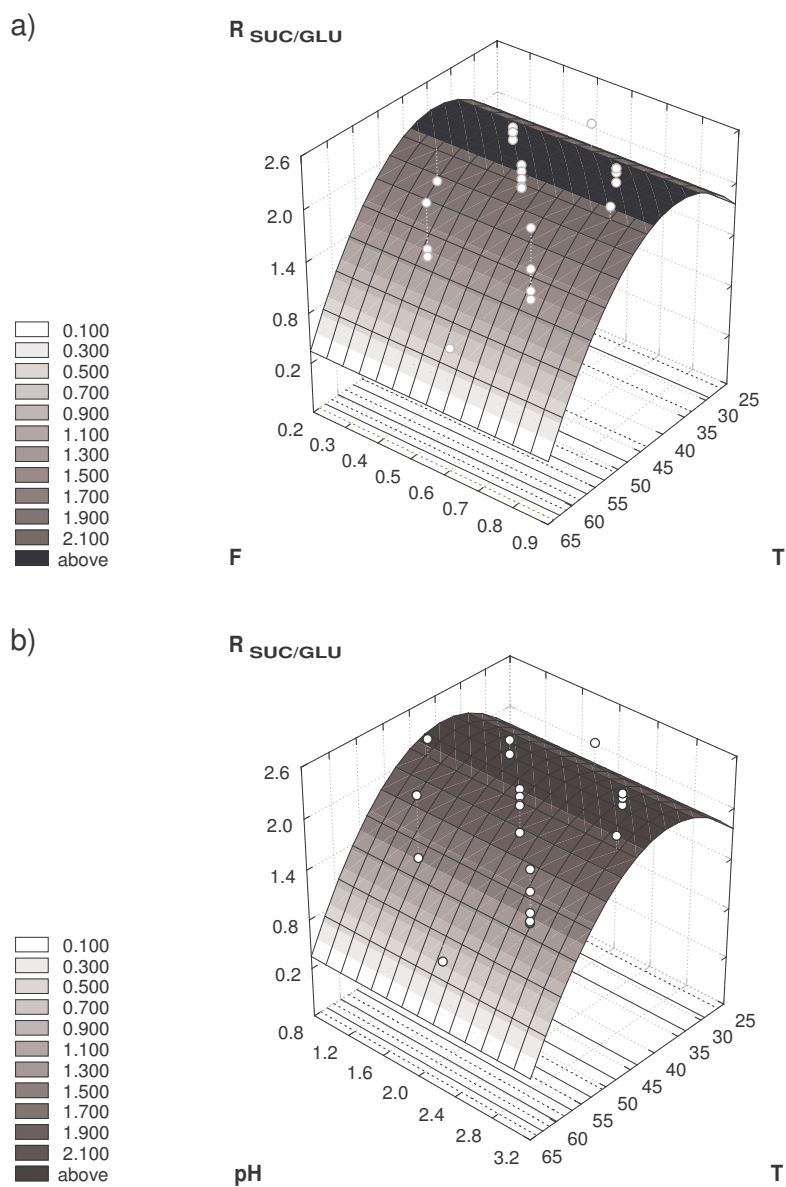


Figure 2. Response surfaces from factorial design CCD 2^3 for the resolution between sucrose and glucose ($R_{\text{suc/glu}}$) as a function of pH, temperature (T) and flow rate.(F).

Table 8: Main significant effects on the resolution between glucose and fructose ($R_{\text{glu/fru}}$).

Factor	Effect	Standard error	t(10)	p
Mean	1,2353	0,0121	102,2758	0,0000
T	-0,1353	0,0164	-8,2684	0,0000
T ²	-0,0491	0,0213	-2,3117	0,0434
pH	-0,0400	0,0175	-2,2893	0,0451

$$R_{\text{glu/fru}} = 1.235 - 0.068 \times T - 0.025 \times T^2 - 0.02 \times \text{pH} \quad (4)$$

$\pm 0.012 \quad \pm 0.008 \quad \pm 0.011 \quad \pm 0.009$

Table 9: ANOVA for validation of the model that describes the effect of temperature and pH on the resolution between the resolution between glucose and fructose ($R_{glu/fru}$) from factorial design CCD 2³.

Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	<i>F</i> -test
Regression	0,11394	3	0,11394	44,85 ^a
Residual	0,053267	21	0,00254	0,72
Lack of fit	0,038833	11	0,00353	2,45 ^b
Pure error	0,014433	10	0,00144	
Total	0,168378	24		

R-squared: 0.64; $F_{0,95, 3, 21} = 3,072$

^a *F*-ratio (regression/residual).

^b *F*-ratio (lack of fit/pure error).

In figure 3 it could be observed that the glucose-fructose resolution is higher at 32 °C of temperature and at pH 1 (Table 10), the lowest pH. However the corresponding resolution at 40 °C was lightly lower if it is compared to the response obtained at 32° C. In order to enhance both sucrose-glucose and glucose-fructose resolutions, simultaneously, the best conditions of separation were defined as 40°C and pH 1. It is shown in figure 4 that the main effect of flow rate was the run time of chromatographic analysis. According to this result it was establish that a satisfactory flow rate was 0.7 mL/min, which will decrease the run time of about 20 min and will allow a satisfactory resolution between all analyt pairs.

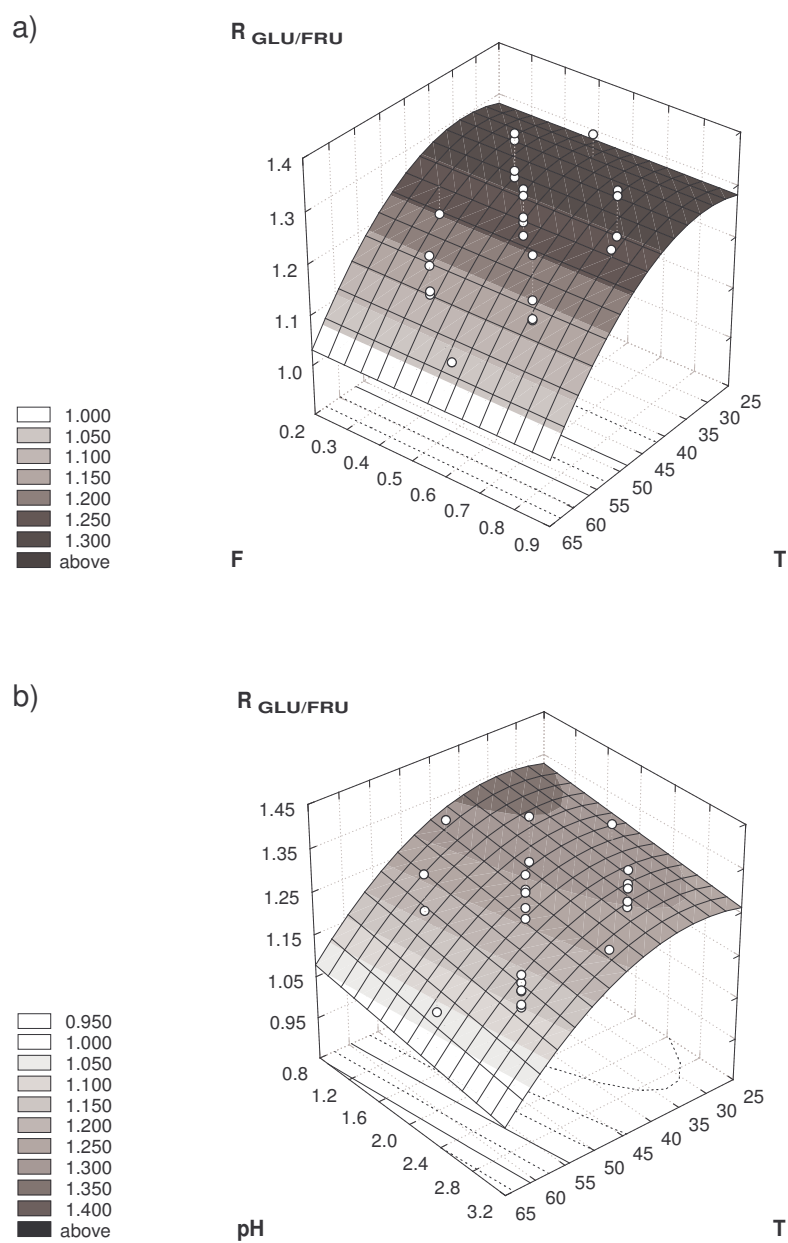


Fig. 3. Response surface from factorial design CCD 2^3 for the resolution coefficient between glucose and fructose ($R_{glu/fru}$) as a function of pH, temperature (T) and flow rate (F).

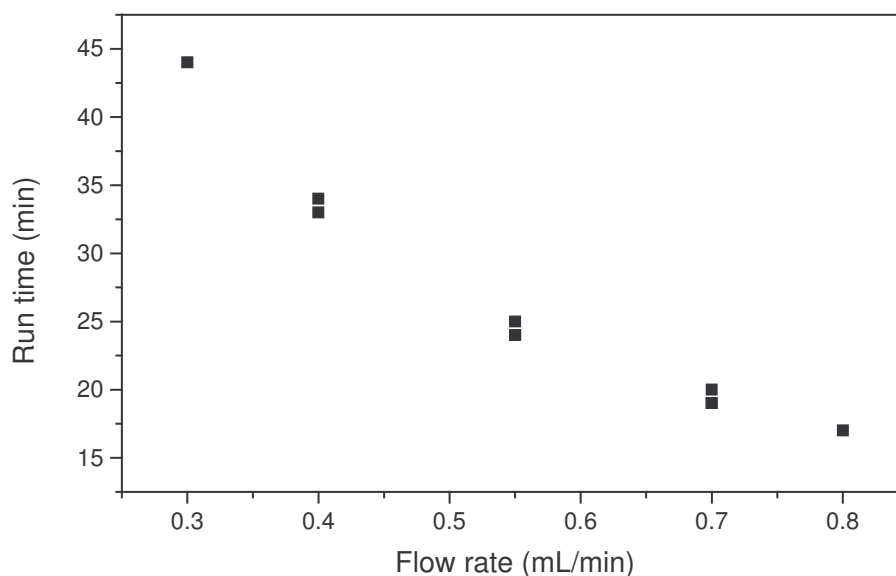


Fig 4. Run time as a function of flow rate of mobile phase.

The temperature, flow rate and pH effects on the resolutions of all pairs of the studied analyts are summarized in table 10 and it can be observed that all factors are significant on those responses, although in different ways. The best conditions for maximum resolution of each pair of analyts were significantly variable, for example the best temperature for the separation of fructose and glycerol was 60°C, in contrast to 30°C for the separation of glycerol and acetate. A similar case was observed related to the pH and flow rate conditions. However, the adopted criterion of maximizing the resolution of sucrose-glucose and glucose-fructose overlapped peaks doesn't jeopardize the separation of other peaks, as it is described below. This mean that using 40°C, pH 1 and 0.7 mL/min as a separation condition will maximize the resolution for sucrose-glucose and glucose-fructose pairs, while the other pair resolutions will be satisfactory.

Table 10. Temperature (T), flow rate (F), pH and their interactions effects over resolutions from factorial design 2³ CCD, optimum conditions for each pair of analyts (*) in respective order of elution. (-) indifferent.

Analyts pairs	Main effects at 95% of confidence									
	T	F	pH	T x F	T x pH	F x pH	Lack of fit	T*	F*	pH*
Suc/glu	-0.763	0	0	0	0	0		40	-	-
Glu/fru	-0.135	0	-0.04	0	0	0		32	-	1
Fru/gly	0.140	-0.209	0.070	0	0.060	-0.086		60	0.3	3
Gly/ace	-0.073	-0.074	0	-0.053	0	-0.029	+	30	0.8	1
Ace/actd	0.295	-0.248	0.189	-0.181	0.111	-0.139	+	30	0.8	1
Actd/etha	0	-0.276	0	0	0	0		40	0.3	1

7.4.3. Chromatogram profile as a resolution function

The chromatogram profiles are exemplified in figure 5, and it is important to point out that in all tested conditions the peaks corresponding to fructose-glycerol, glycerol-acetate, acetate-acetaldehyde and acetaldehyde-ethanol pairs appear totally separated on chromatograms, although the corresponding resolutions were significantly affected, as it is shown in figure 5. However, the resolution of sucrose-glucose and glucose-fructose pairs were greatly affected. In figure 5, by comparing a and b cases, it can be seen that the increase of flow rate from 0.4 to 0.7 mL/min improved the resolutions for sucrose-glucose and glucose-fructose peaks. With the resolution coefficient increasing from 1.14 to 1.58 and 1.07 to 1.12, respectively. However, if a and b are compared to c and d, it can be observed that the increase of the temperature from 45 to 54°C, and simultaneously, the increase of pH from 2 to 2.6, resulted in a decrease of the peak resolutions for those pairs. By comparing figures 5d and figure 1, it can be observed an improvement on the resolution for the sucrose-glucose pair with a decrease of the pH to 1. It was also observed that the tested conditions affected the symmetry and height of sucrose peak. The height of glucose and fructose peaks were slightly altered.

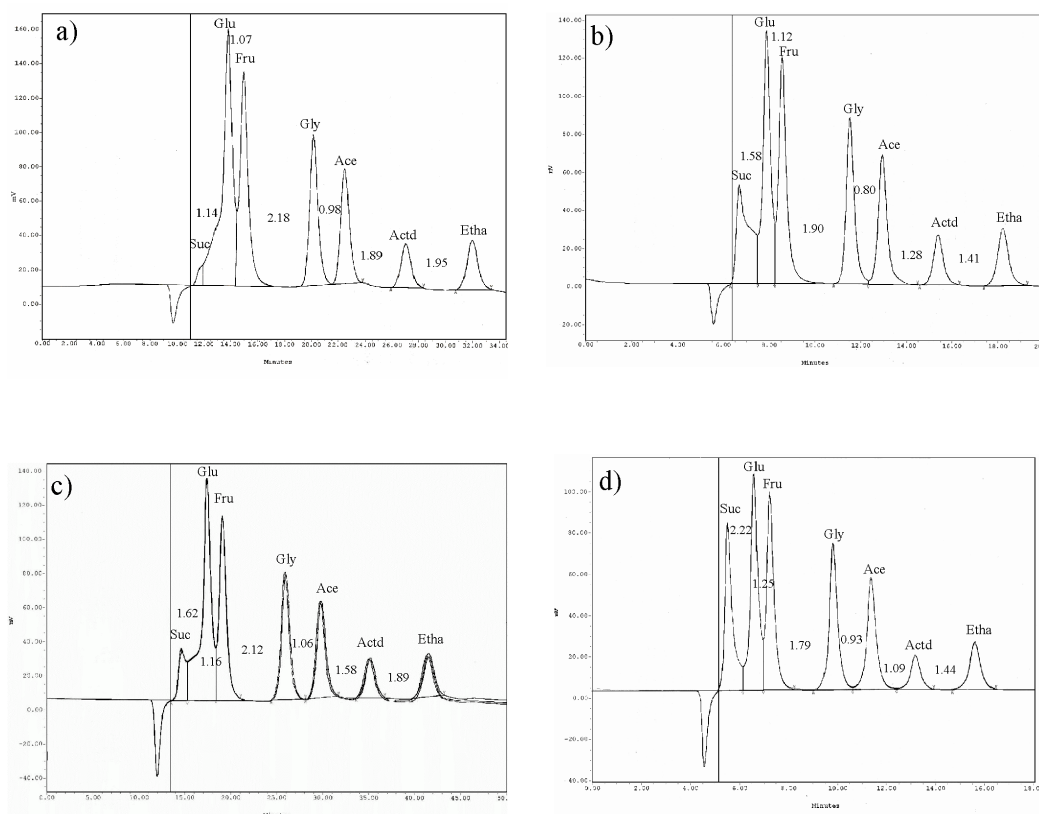


Fig.5. Chromatogram profile as a function of separation conditions and respective resolutions between pair of peaks. As examples are shown the following conditions: a) 54°C, 0.4 mL/min and pH 2.6; b) 54°C, 0.7 mL/min and pH 2.6; c) 45°C, 0.3 mL/min and pH 2; d) 45°C, 0.8 mL/min and pH 2.

7.5. Conclusion

The conditions of separation of a mixture of sucrose, glucose, fructose, glycerol, acetate, acetaldehyde and ethanol were optimized using experimental design and response surface analysis. Only the separation of sucrose-glucose and glucose-fructose pairs of analyts were necessary to optimize, for the reason that in all tested conditions the separations of all others analyts were satisfactory. The best conditions for the separation are 40°C for the column temperature, pH 1 and 0.7 mL/min for the mobile phase. The important changes in chromatograms were consequence of different separation conditions.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP (São Paulo-Brazil).

7.6. References

- [1]. JOHNSON EL; STEVENSON R. **Basic Liquid Chromatography**, Varian Associates, Palo Alto, CA. 1992.
- [2]. RODRIGUES MI; IEMMA AF. Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamento. 1° Ed.-Campinas, SP. Casa de Pão Editora, 2005.
- [3]. QIU J; JIN X. Development and optimizations of organic acids analysis in tobacco with ion chromatography and suppressed conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 950:81-88, 2002.
- [4]. FLIKWEERT MT; van DIJKEN JP, PRONK JT. Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess, **Applied Environmental Microbiology**, v. 63:3399-3404, 1997.
- [5]. KIERS J; ZEEMAN AM; LUTTIK M; THIELE C; CASTRILLO JI; STEENSMA HY; van DIJKEN J; PRONK J. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359, **Yeast**, v. 14:459-469, 1998.
- [6]. POSTMA E; SCHEFFERS WA; van DIJKEN JP. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066, **Yeast**, v. 5:159-165, 1989.
- [7]. CARLSEN M; SPOHR AB; NIELSEN J; VILLADSEN J. Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49: 266-276, 1996.
- [8]. POLO MC; BARAHONA F; CÁCERES I. Dosage par chromatographie liquide haute performance des principaux acides organiques du vin, **Connais Vigne Vin**, v.20:175-187, 1986.
- [9]. CASTRILLO JI; UGALDE UO. Patterns of energy-metabolism and growth-kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40:386-393, 1993.
- [10]. MEDEIROS ABP; PANDEY A; FREITAS RJS; CHRISTEN P; SOCCOL CR. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation using factorial design and response surface methodology, **Biochemical Engineering Journal**, v. 6:33-39, 2000.

- [11]. PINHEIRO R; BELO I; MOTA M. Air pressure effects on biomass u\yield of two different *Kluyveromyces* strains, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26:756-762, 2000.
- [12]. TIMPA JD; BURKE JJ Monitoring organic acids and carbohydrate in cotton leaves by high performance liquid chromatography, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 34(5):910-913, 1986.
- [13]. CHINNICI F; SPINABELLI U; RIPONI C; AMATI A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion exclusion liquid chromatography, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18:121-130, 2005.
- [14]. PICHA D. Organic acid determination in sweet potatoes by HPLC, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 33:743-745, 1985.
- [15]. McFEETERS RF; THOMPSON RL; FLEMING HP. Malic acid analysis in cucumber juices and fermentations brines in the presences of interfering fructose, **Journal of Food Science**, v. 58(4):832-834, 1993.
- [16]. SAMPAIO FC; SILVEIRA WB; CHAVES-ALVES MV; PASSOS MFL; COELHO JLC. Screening of filamentous fungi for production of xylitol from D-xylose, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34:325-328, 2003.
- [17]. YUAN JP; CHEN F. Simultaneous separations and determinations of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection, **Food Chemistry**, v. 64:423-427, 1999.
- [18]. SNYDER LR; GLAJCH JL; KIRKLAND J. **Practical HPLC method development**, John Wiley & Sons Ed. New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 260 p, 1988.

VIII. Influência dos parâmetros de engenharia de processo na produção de inulinase em cultivos contínuos por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045

Bernardo Onagar Yépez Silva Santisteban; Francisco Maugeri Filho

Será submetido à revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

8.1. Resumo

Diferentes condições de crescimento foram obtidas variando velocidades de agitação (50-1200 rpm), tipo de impulsor (pás inclinadas e turbina de disco) e taxa de diluição ($0,01$ - $0,36 \text{ h}^{-1}$) num sistema contínuo com o intuito de descrever situações de estresse mecânico durante o crescimento de *Kluyveromyces marxianus*. O estresse mecânico foi definido como a perda da viabilidade do microrganismo e/ou a diminuição da produção de inulinase, e correlacionado com parâmetros de engenharia de processos tais como tensão de cisalhamento (τ), potência dissipada (P/V), coeficiente global de transferência de oxigênio (K_La) e taxa de diluição (D). Usando uma taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$, velocidades de agitação entre 50 e 1200 rpm com um impulsor de pás inclinadas não foi observado estresse mecânico, relativo à viabilidade celular. Contrariamente, observou-se estresse mecânico relativo à produção da enzima, pois ela variou em função da velocidade de agitação, sendo que a melhor produção de inulinase ($3\text{-}4 \text{ UI/g}$ biomassa) foi obtida a 450 rpm. Usando uma taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ e variando a velocidade de agitação de 800 a 1200 rpm com duas turbinas de disco observaram-se ambos os tipos de estresse mecânico. Usando uma agitação de 1200 rpm com duas turbinas de disco e variando a taxa de diluição de $0,01$ a $0,03 \text{ h}^{-1}$ foi observado estresse mecânico pela diminuição da viabilidade, mas o incremento da taxa de diluição provoca uma diminuição do estresse. sendo que com $0,22 \text{ h}^{-1}$ foi obtida a melhor produção de inulinase. Com uma taxa de diluição de $0,36 \text{ h}^{-1}$ foi observado o início do arraste dos microrganismos do biorreator. O estresse mecânico em *K. marxianus* foi detectado em situações de inanição e por tempos prolongados de exposição à tensão de cisalhamento. Alguns fatores foram definidos para descrever a influência dos parâmetros de engenharia de processo e fisiológicos nas principais variáveis deste processo. Observou-se que a transferência de oxigênio, a potência dissipada, a tensão de cisalhamento

e a taxa de diluição influenciam fortemente as características do processo de produção de inulinase.

8.2. Introdução

Os mais importantes parâmetros de engenharia em bioprocessos estão relacionados com a agitação e aeração, além daqueles relacionados com a taxa de alimentação no caso de sistemas contínuos. Dentro daqueles relacionados com agitação têm-se a tensão de cisalhamento, a potência dissipada por unidade de volume, o tempo de circulação e o tempo de mistura. O coeficiente global de transferência de oxigênio (K_La) é o principal parâmetro relacionado com a aeração, e a taxa de diluição é aquele relacionado com a alimentação de sistemas contínuos. A taxa de diluição, parâmetro de engenharia relacionado à alimentação de sistemas contínuos, tem além desta conotação aquela de ser um parâmetro importante da fisiologia do microrganismo.

O estresse mecânico pode ser definido como a junção de todos os efeitos mecanicamente originados, os mesmos que afetam negativamente o objetivo principal do processo em estudo [1]. Os parâmetros de agitação estão intimamente ligados ao estresse mecânico em bioprocessos [1]. Dentre destes parâmetros, a tensão de cisalhamento (τ) é aquele mais amplamente citado na literatura no estudo do estresse mecânico, estando relacionado ao estresse mecânico de células animais [2][3] e vegetais [3][4][5], bactérias [6][7][8], algas [1], protozoários [1], e fungos filamentosos [1]. A potência dissipada do sistema também tem sido estudada em relação ao estresse mecânico de fungos filamentosos em associação com o tempo de circulação, permitindo obter correlações que permitiram um aumento de escala satisfatório [9][10][11]. Um outro parâmetro menos estudado tem sido o tempo de mistura relativo, o mesmo que corresponde a uma razão entre o tempo de mistura e o tempo de circulação [12]. Conclui-se que a combinação de parâmetros fisiológicos e de

engenharia parece ser um procedimento útil na obtenção de um fator mais complexo que permita caracterizar satisfatoriamente o biorreator em relação ao bioprocesso em estudo.

Os parâmetros de aeração tais como o K_{La} , aparecem sendo muito importantes nos bioprocessos nos quais uma biossíntese está envolvida, tal é o caso de produção de enzimas [13][14][15][16][17][18].

Através do estudo da taxa de diluição em sistemas contínuos é possível evitar a repressão catabólica, um mecanismo de regulação da produção da inulinase aceito amplamente na literatura [19][20].

A importância dos parâmetros de engenharia na produção de inulinase tem sido recentemente demonstrada, sendo que o incremento da tensão de cisalhamento parece limitar os benefícios do incremento do K_{La} provocado pelo aumento da velocidade de agitação, num sistemas de batelada simples para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* [18]. No estudo do cultivo de *K. marxianus* para a produção da inulinase, podemos definir dois tipos de estresse mecânico: primeiro, a morte celular que provoque, como consequência, a diminuição da produção de enzima, e segundo o efeito sobre algum mecanismo de biossíntese ou liberação da enzima sobre a célula viva, que tenha a mesma consequência. O primeiro tipo será monitorado através da viabilidade celular, enquanto que o segundo pela produção da enzima.

O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de estresse mecânico durante o crescimento de *K. marxianus* fazendo variações nas velocidades de agitação, tipo de impulsor e taxa de diluição, estudar a influência de parâmetros de engenharia de processo e fisiológicos no processo de produção da inulinase, além de obter fatores por combinação destes parâmetros que permitam descrever diferentes aspectos deste bioprocessos, na tentativa de encontrar uma ferramenta auxiliar para a interpretação dos resultados em sistemas transientes.

8.3. Material e Métodos

8.3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, mantido em meio YM (yeast malt Agar) a 4°C. Em meio mínimo foram preparados pré-inóculos criogênicos (conservados a -70°C) com 20% glicerol, a 30 °C, de modo que o mesmo apresente uma densidade ótica de 0.5 a um comprimento de onda de 600 nm. Para a preparação do inóculo, os pré-inóculos criogênicos foram transferidos para dois erlenmeyers trialetados contendo 100 mL de meio segundo Kalil et al. [21], e incubados por 24 horas a 150 rpm e 30 °C.

8.3.2. Sistema contínuo

O sistema de fermentação constituiu de um sistema contínuo de tanque agitado mono-estágio. Foi usada uma cuba estéril de um fermentador Bioflo III (New Brunswick Scientific-Edison, N.J., EEUU) de 3 L com volume útil de 2 L, adaptada ao sistema Biostat®B (B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemanha), contendo meio mínimo [22] e inoculada só com biomassa, obtida do inóculo por centrifugação. Para o preparo deste meio, as soluções de vitaminas e minerais foram preparadas separadamente. A solução de vitaminas foi esterilizada por microfiltração e a de minerais em autoclave a 121°C por 30 min.

Inicialmente foi feita uma batelada simples com meio mínimo contendo 10 g/L de sacarose até o consumo total do substrato ou durante 24 h, após o qual iniciou-se a alimentação com meio mínimo, usando diferentes taxas de diluição e velocidade de agitação. A taxa de diluição foi fixada pela vazão de alimentação, utilizando-se uma bomba peristáltica de rotação intermitente. O caldo fermentado foi recolhido através de uma bomba peristáltica acionada por um sensor de nível. A vazão do sistema e o volume útil do biorreator foram medidos diariamente para verificar a taxa de diluição. O pH foi mantido

constante em 3,5 por adição de NaOH 3 N e a temperatura a 30°C. A formação de espuma foi controlada por adição constante de antiespumante FG-10 Dow Corning® (D'Altomare Química, SP, Brasil). A taxa de aeração foi mantida em 1 vvm, embora em alguns casos precisou ser maior ou até usar ar enriquecido com oxigênio para manter o oxigênio dissolvido (%OD) em níveis superiores a 20%. O sistema foi mantido durante três tempos de residência ou mais para assegurar que o estado estacionário tenha sido atingido. A pureza do sistema foi controlada por observação constante no microscópio.

8.3.3. Perturbações tipo degrau

Foram aplicadas perturbações tipo degrau, alterando a velocidade de agitação (50-250, 250-450, 450-650, 650-850, 800-1000, 850-1200 e 1000-1200 rpm) ou taxa de diluição (0,01-0,03, 0,03-0,1 e 0,22-0,36 h⁻¹). Antes e depois das perturbações foram tiradas amostras após dois ou três tempos de residência. Também foram testados dois tipos de sistemas de agitação: duas turbinas de disco e um impulsor de 3 pás inclinadas.

8.3.4. Amostragem e análises

Amostras de 10 mL de caldo fermentado foram retiradas na saída do fermentador em tubos de ensaio imersos em banhos de gelo. As amostras foram congeladas após separação da biomassa por centrifugação a 6000 x g.

A biomassa em base seca foi determinada nas amostras de caldo fermentado diluídas suficientemente com água destilada. Para isto foi feita a leitura da absorbância a 600 nm com um espectrofotômetro modelo DU 640 (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU) e com o auxílio de uma curva padrão. A curva foi elaborada usando meio mínimo para uma faixa de concentração de 0,05 a 1 g biomassa/L. A viabilidade celular e as contagens de células vivas e mortas foram determinadas com o uso de câmara de Neubauer e solução de

azul de metileno. O oxigênio dissolvido (OD) foi medido através de um eletrodo polarográfico (Mettler Toledo, Greifense, Suíça).

A concentração de acetato, glicerol, acetaldeído, piruvato, etanol, sacarose, glicose e frutose nas amostras foram determinadas em HPLC (9010 Solvent Delivery System, RI-4 Refractive Index Detector, 9095 Auto-sampler, Varian, Walnut Creek, CA; SPH99 Column Thermostat, Spark Holland, Emmen, The Netherlands; Millennium Chromatography Manager, Waters, Milford, EEUU), equipado com uma coluna de troca aniônica HPX87H (Biorad Laboratories, Hercules, EEUU) a 40°C e como fase móvel uma solução de ácido sulfúrico a pH 1,0 a uma vazão de 0,7 mL/min.

A atividade enzimática foi determinada pela liberação de açúcares redutores e uma unidade de enzima (UI) foi definida como a quantidade de inulinase capaz de hidrolizar um micromol de sacarose por minuto [23].

8.3.5. Potência, K_{La} e tensão de cisalhamento

A potência consumida (P) pelo sistema foi calculada usando um gráfico do número de potência (NPo) vs número de Reynolds (NRe), determinado experimentalmente para o sistema usado, com ajuda de um torquímetro (Experimental Agitator Model ELB, Bench Scale Equipment Co, Dayton, EEUU). O coeficiente global de transferência de oxigênio (K_{La}) foi estimado usando uma correlação empírica, entre o K_{La} (h^{-1}) e a velocidade de agitação (rpm), e que também usando o método de borbulhamento, para o sistema em estudo. Foi conferido que os valores obtidos de K_{La} tiveram uma correlação linear com os valores obtidos usando a correlação de Richard (K_{La} vs $(P/V)^{0,4}$ vs $N^{0,5}$). A tensão de cisalhamento foi determinada segundo Yépez Silva-Santisteban e Maugeri [18].

8.4. Resultados e discussão

8.4.1. A velocidade de agitação com impulsor de pás inclinadas

A aplicação de velocidades de agitação crescentes de 50 a 1200 rpm, no sistema contínuo de tanque agitado com um impulsor de três pás inclinadas, produziu os resultados apresentados nas figuras 1 a 5, onde são mostrados os dados de concentração de biomassa, viabilidade, oxigênio dissolvido, metabólitos e velocidade de agitação. A taxa de diluição usada foi $0,1 \text{ h}^{-1}$, aproximadamente um quinto da máxima velocidade específica de crescimento obtida para este microrganismo ($0,48 \text{ h}^{-1}$).

Na figura 1 é observado o perfil das variáveis observadas para o incremento da velocidade de agitação de 50 a 250 rpm. O aumento da agitação teve como consequência um incremento de cerca 1 g/L, correspondendo a um aumento de 67 %, na concentração de biomassa no biorreator, passando de 1,5 a 2,5 g/L de biomassa. Ambas velocidades de agitação foram insuficientes para manter as leituras de OD no mínimo de 20 % e também para manter uma leitura estável. Com o intuito de aumentar a concentração de oxigênio no meio, foi aumentada a taxa de aeração de 1 a 2 vvm, inclusive foi usado ar enriquecido com O_2 em proporções variáveis. As leituras observadas variaram dentre 1 a 30% com 50 rpm e de 10 e 70 % com 250 rpm. É evidente que a qualidade da mistura em 50 rpm foi muito baixa e que o incremento da concentração de biomassa com o degrau até 250 rpm foi, possivelmente, uma consequência da melhora na qualidade da transferência de oxigênio.

Observa-se, na mesma figura, que a viabilidade da biomassa foi alta em ambas velocidades de agitação ficando ao redor de 98 %. A contagem de células vivas seguiu a tendência da biomassa e aumentou de 3 até $4,5 \times 10^8$ células/mL, e o de células mortas se manteve na faixa de $1,7 \times 10^7$ células/mL. Pode-se observar também que no meio foram acumulados alguns metabólitos tais como etanol, acetato e acetaldeído, chegando até 2,5 g/L com 50 rpm e diminuindo até 2 g/L com 250 rpm. O acetato e o acetaldeído se

mantiveram no nível de 0,4 g/L e 0,2 g/L respectivamente. Isto permite confirmar que o nível de aeração, tanto com 50 rpm como com 250 rpm, não foi suficiente para que estes compostos fossem metabolizados.

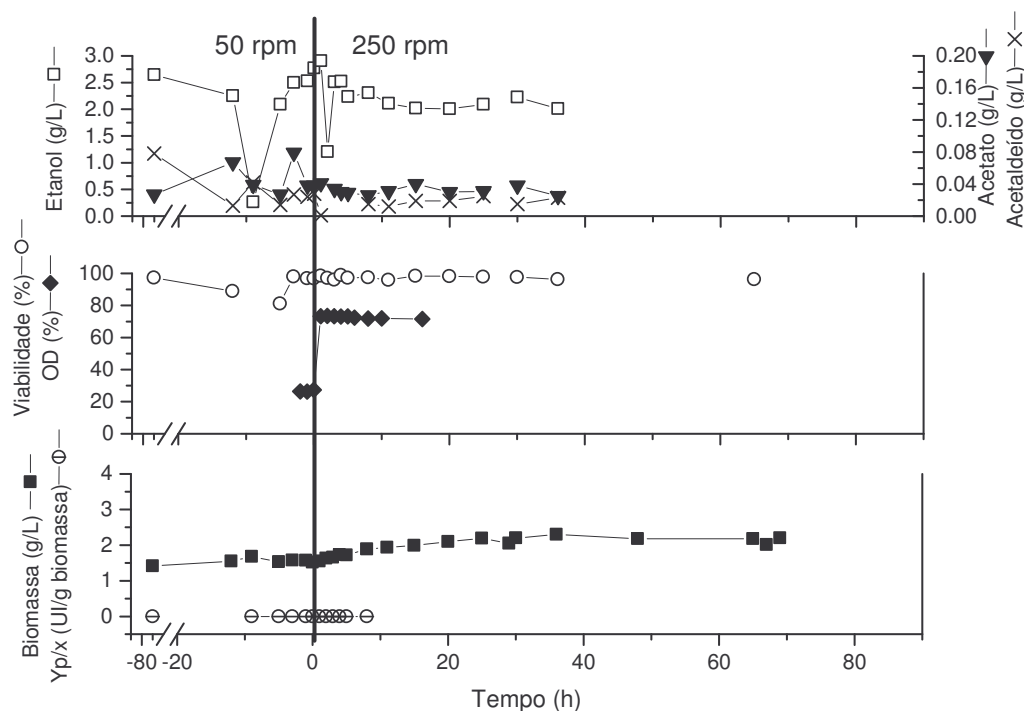


Fig. 1. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade, OD, etanol, acetato e acetaldeído durante a perturbação tipo degrau de agitação de 50 até 250 rpm num sistema contínuo com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ com um impulsor de 3 pás inclinadas. Foi necessário usar ar enriquecido com O_2 e a taxa de aeração variável para tenta manter leituras maiores que 20%.

Na figura 1 também observa-se que não houve produção de inulinase nestas condições indicando que o nível de oxigenação não foi suficiente para a síntese da enzima, ou provavelmente a presença de metabólitos pode ter provocado a repressão catabólica da produção da enzima.

A figura 2 mostra o efeito da velocidade de agitação de 250 a 450 rpm. Foi observado uma duplicação da concentração da biomassa até 4 g/L. Observa-se também que com 450 rpm as leituras de OD foram mais estáveis e estiveram numa faixa de 40 a 50 %,

mais estreita se comparada com 250 rpm. Aparentemente o incremento da biomassa está relacionado com a melhora na transferência de oxigênio no tanque agitado devido ao aumento da velocidade de agitação.

Como pode-se observar a viabilidade se manteve alta ao redor de 98 % sendo que o incremento da velocidade de agitação não provocou morte celular. Isto contrasta com o observado por Yépez Silva-Santisteban e Maugeri [18]. Os autores observaram morte celular atingindo a viabilidade de 90 % após de 10 h de exposição a 450 rpm com o mesmo tipo de impulsor. A contagem de células vivas e mortas seguiu a tendência do incremento da biomassa.

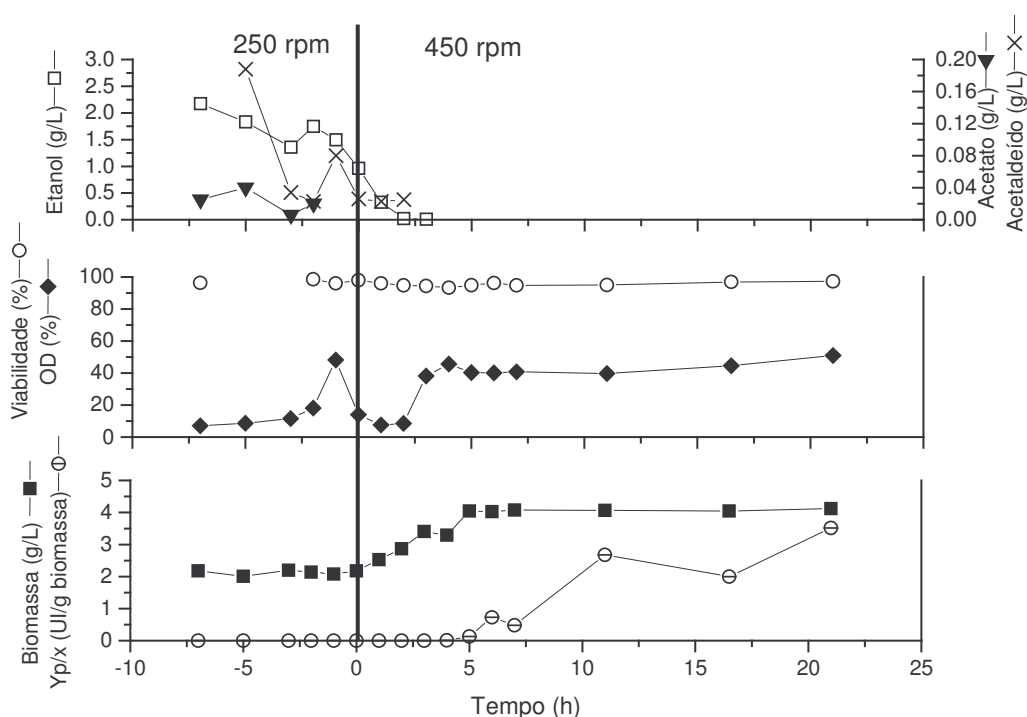


Fig. 2. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade, OD, etanol, acetato e acetaldeído durante a perturbação tipo degrau de agitação de 250 até 450 rpm num sistema contínuo com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ com um impulsor de 3 pás inclinadas. A taxa de aeracao se manteve variavel para manter a OD % maior que 20%.

Na figura 2 pode-se observar que o incremento de 250 até 450 rpm permitiu o consumo de todos os metabólitos. Observou-se que esta característica se mantém com os sucessivos incrementos do rpm, sugerindo que 450 rpm é a condição de suficiente oxigenação a qual evita o acúmulo de metabólitos. Após o degrau para 450 rpm a produção da enzima apresentou um aumento significativo passando de zero até 3 UI/g de biomassa. O incremento da produção da enzima coincide com o consumo total dos metabólitos, podendo ser uma evidência da importância da repressão catabólica na produção da enzima, ou também da importância do nível de oxigenação na mesma. Uma característica observada da produção da inulinase em todos os sistemas contínuos estudados foi a de praticamente não atingir estado estacionário, apesar da biomassa e da concentração de alguns metabólitos estarem em estado estacionário. Aparentemente a produção da inulinase é muito sensível a alguns fatores que não foram considerados, por este motivo as comparações foram realizadas considerando as tendências médias das curvas de produção de enzima.

Na figura 3 se observa o efeito do degrau de 450 a 650 rpm. Contrariamente aos degraus anteriores não houve aumento da concentração de biomassa no reator. Como não houve acúmulo de substrato, nem metabólitos no caldo fermentado, a melhora da transferência de oxigênio no sistema, consequência deste degrau, não teve efeito sobre a biossíntese, evidenciando, assim, que a capacidade oxidativa do microrganismo atingisse seu máximo. As leituras de OD se incrementaram até 70 % e se mantiveram mais estáveis. A viabilidade celular também permaneceu alta e em níveis iguais (98%) às condições anteriores, embora fosse esperado que com o aumento da agitação a tensão de cisalhamento aumentasse e provocasse morte celular. As tendências das contagens de células vivas e mortas também se apresentaram invariáveis durante este degrau. Nestas condições foram observadas os níveis mais altos de produção da enzima, de aproximadamente 3 a 4 UI/g de biomassa.

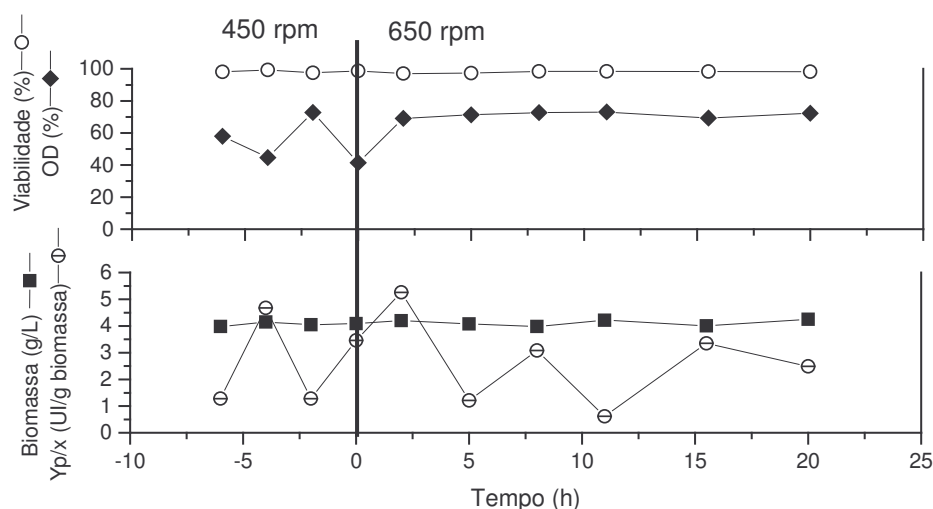


Fig. 3. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de agitação de 450 até 650 rpm num sistema contínuo com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ com um impulsor de 3 pás inclinadas. A taxa de aeração foi mantida a 1 vvm.

A figura 4 apresenta o efeito do degrau de 650 a 850 rpm. Semelhante ao caso anterior, a concentração de biomassa se manteve praticamente constante durante o degrau variando entre 4 e 4,2 g/L. A viabilidade celular foi de 97 % o que contraria o resultado esperado, pois considerando-se que 850 rpm provoca uma tensão de cisalhamento muito maior que aquela provocada por 450 rpm obtida por Yépez Silva-Santisteban e Maugeri [18], como sendo a máxima num sistema de batelada simples para a produção de inulinase. Também foi observado que o incremento da velocidade de agitação até 850 rpm provocou o aumento do OD a níveis de saturação. A produção da inulinase diminuiu em relação a 650 rpm atingindo níveis de, no máximo, 1 UI/g de biomassa, podendo ser considerado que tensões de cisalhamento superiores a 0,32 Pa provocam estresse mecânico relativo a produção da inulinase.

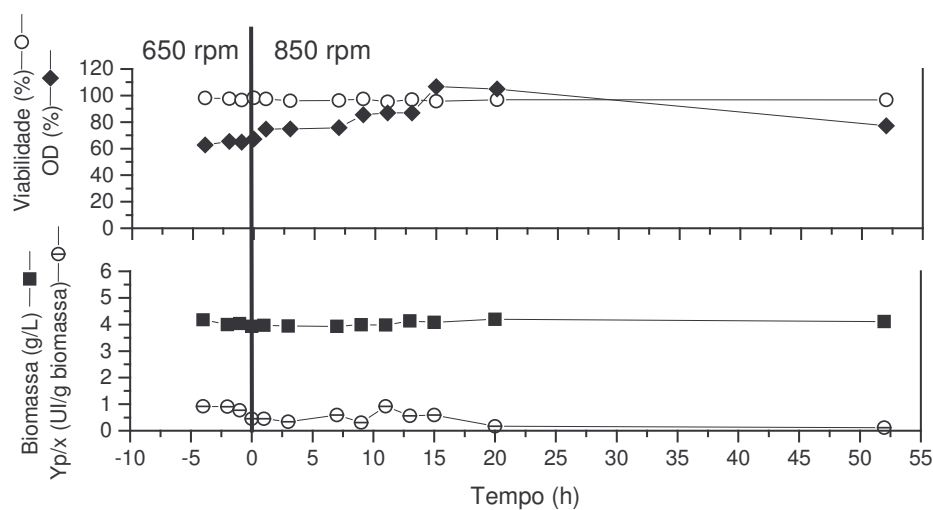


Fig. 4. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de agitação de 650 até 850 rpm num sistema contínuo com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ com um impulsor de 3 pás inclinadas. A taxa de aeração foi mantida em 1 vvm.

Com o intuito de se atingir o estresse mecânico, a velocidade de agitação foi aumentada a 1200 rpm sendo que esta velocidade é a limite do sistema de agitação usado. A figura 5 mostra o efeito do degrau de 850 a 1200 rpm. Observa-se que concentração de biomassa se manteve constante, a níveis semelhantes aos experimentos anteriores (aproximadamente 4,2 g/L). A viabilidade celular também se apresentou alta e constante durante o degrau, da mesma forma que as contagens de células vivas e mortas. Os níveis de OD se mantiveram altos, na faixa de 80 a 100 %. De forma similar aos testes anteriores, a produção de inulinase caiu a um patamar de 0,5 UI/g de biomassa.

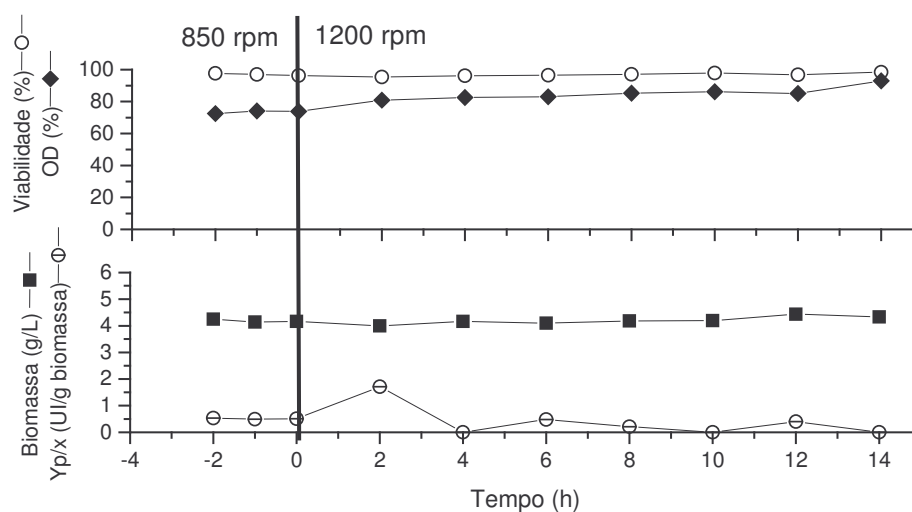


Fig. 5. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de agitação de 850 até 1200 rpm num sistema contínuo com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ com um impulsor de 3 pás inclinadas. A taxa de aeração se manteve em 1 vvm.

As quedas sucessivas na produção da inulinase, com o aumento da velocidade de agitação, sugere que houve estresse mecânico, embora não tenha sido observada uma queda da concentração de biomassa, implicando um mecanismo complexo, no qual os parâmetros de engenharia de processo relacionados como a velocidade de agitação, geram de alguma forma, a diminuição da expressão do gene da enzima ou dificultam o mecanismo de liberação da mesma.

Estes resultados levaram a uma análise mais detalhada do efeito da tensão de cisalhamento no sistema em batelada e no sistema contínuo. Em um sistema em batelada as células estão expostas à tensão de cisalhamento durante toda a fermentação. No trabalho de Yépez Silva-Santisteban e Maugeri [18] num sistema de batelada simples, o tempo de fermentação foi de 72 h. Os mesmos autores descreveram como diferentes tipos de impulsor têm diferentes tensões de cisalhamento, motivo pelo qual foi testado o sistema com duas turbinas de disco ao invés de um impulsor de pás inclinadas como nos

experimentos descritos anteriormente. Os mesmos autores têm observado que a tensão de cisalhamento tem um efeito sobre a viabilidade do microrganismo que depende do tempo de fermentação ou do tempo de exposição das células à condição de estresse. Situações mais drásticas de tensão de cisalhamento têm um efeito sobre a viabilidade em tempos menores. Analisando também a exposição do microrganismo à tensão de cisalhamento num sistema contínuo, podemos concluir que o tempo de exposição do microrganismo a uma situação de estresse mecânico, como a gerada pela tensão de cisalhamento, é o tempo de residência do sistema. De tal forma, se diminuir a taxa de diluição aumenta-se o tempo de residência do sistema. Por este motivo também foram feitos testes a diferentes taxas de diluição, sendo que nos testes apresentados até este item o tempo de residência foi de 10 h, e passou-se a testar tempos de 100 h a 2,7 h.

8.4.2. A velocidade de agitação com duas turbinas de disco

Após os resultados do estudo da velocidade de agitação com impulsor de pás inclinadas (item anterior), o mesmo estudo de degrau foi realizado com duas turbinas de disco, mas a taxa de diluição foi diminuída a $0,01 \text{ h}^{-1}$ com a finalidade de aumentar o tempo de exposição ao estresse mecânico, aumentando a diversidade de condições estudadas. A figura 6 apresenta os resultados obtidos com este sistema pelo incremento da velocidade de agitação de 800 a 1000 rpm e de 1000 a 1200 rpm.

Na mesma figura observa-se que, mesmo tendo aumentado drasticamente o tempo de residência (100 h), a 800 rpm a viabilidade celular no sistema esteve muito próxima de 100 %, sendo que a biomassa aparentemente estabilizou em 3,25 g/L nesta condição, quase 1 g/L menor que nos testes com tempo de residência de 10 h ($D=0,1 \text{ h}^{-1}$) e impulsor de 3 pás inclinadas.

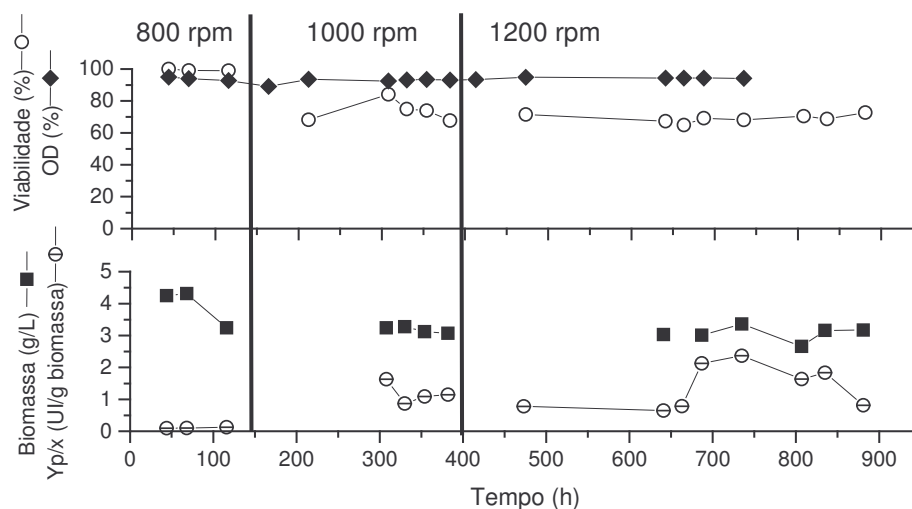


Fig. 6. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de agitação de 800 a 1200 rpm num sistema contínuo com taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ com duas turbinas de disco. A taxa de aeração foi mantida em 1 vvm.

O incremento em degrau da velocidade de agitação até 1000 rpm trouxe como consequência uma significativa diminuição da viabilidade celular de 100 a 70 % e uma ligeira diminuição da concentração de biomassa no biorreator até 3 g/L (Fig. 6). Também ocorreu um aumento significativo da contagem de células mortas após este degrau, sendo que a leitura de OD manteve-se praticamente constante a níveis muito próximos da saturação (97 %). Já que a velocidade de crescimento específica é tão baixa ($0,01 \text{ h}^{-1}$), a demanda de oxigênio é baixa.

O subsequente aumento da velocidade de agitação de 1000 a 1200 rpm manteve a concentração de biomassa a níveis de 3 g/L e o OD a 97 %. A viabilidade estabilizou-se em valores muito próximos de 70 %. A contagem de células mortas aumentou ligeiramente a 35×10^8 células/mL, em relação aos resultados do teste com 1000 rpm (Fig. 6). A produção da inulinase aumentou de 0,2 a quase 1,5 UI/g de biomassa em média, pelo incremento da agitação de 800 a 1200 rpm.

Analisando-se os resultados obtidos e comparados com os resultados da literatura em batelada simples [3], surge a hipótese de que o estresse mecânico se manifesta com maior facilidade em condições de carência de fonte de carbono e por grandes tempos de exposição à tensão de cisalhamento. Com taxas de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$ ou 100 h de tempo de residência, conforme as condições nos experimentos apresentados neste item, a alimentação de fonte de carbono é bastante baixa e provavelmente o meio no biorreator é deficiente em fonte de carbono, representando uma situação de inanição.

Com o intuito de verificar esta hipótese, foram realizados os próximos experimentos aumentando a taxa de diluição na forma de degraus.

8.4.3. A taxa de diluição

Na figura 7, pode-se observar o efeito do degrau da taxa de diluição de $0,01$ a $0,03 \text{ h}^{-1}$, o que corresponde a 100 e 33 h de tempo de residência, respectivamente. O degrau provocou um incremento da concentração de biomassa de 2,75 a 3,25 g/L, isto porque a maior taxa de alimentação de meio permitiu, mais disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, uma maior biossíntese. O incremento da concentração de biomassa também foi seguido pelo incremento da contagem de células vivas e paralelamente uma ligeira diminuição da contagem de células mortas. A viabilidade celular também aumentou de 70 a 80 % como conseqüência do incremento do aumento da velocidade específica de crescimento. O OD teve uma ligeira tendência à queda de 95 a 92 %, indicando um aumento da atividade metabólica no sistema. O incremento da taxa de diluição provocou um ligeiro aumento da produção da inulinase de cerca de 1 UI/g de biomassa. Não foram detectados metabólitos acumulados no caldo fermentado, sendo isto um indício de que a capacidade oxidativa da levedura não foi superada pelo aumento da vazão de alimentação.

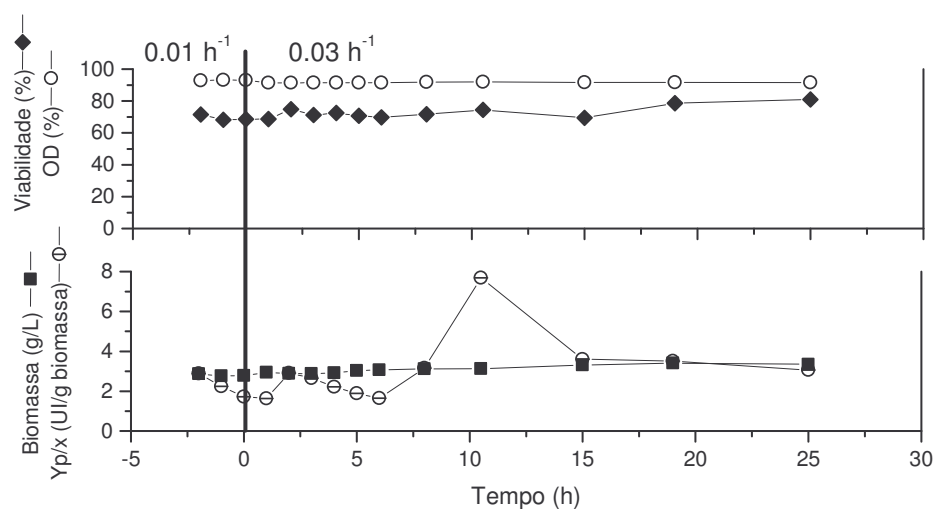


Fig. 7. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de taxa de diluição de 0,01 a 0,03 h^{-1} num sistema contínuo a 1200 rpm com duas turbinas de disco. A taxa de aeração foi mantida em 1 vvm.

Na figura 8 observa-se que o aumento da taxa de diluição de 0,03 a 0,1 h^{-1} manteve a concentração de biomassa constante. No entanto, ocorreu um aumento da viabilidade celular de 80 % a 90 % aproximadamente, e provocou uma queda no oxigênio dissolvido, sinal de incremento na atividade metabólica. A produção da inulinase variou desde 0.5 até 3 UI/g de biomassa, coincidindo com a ausência de metabólitos no caldo fermentado.

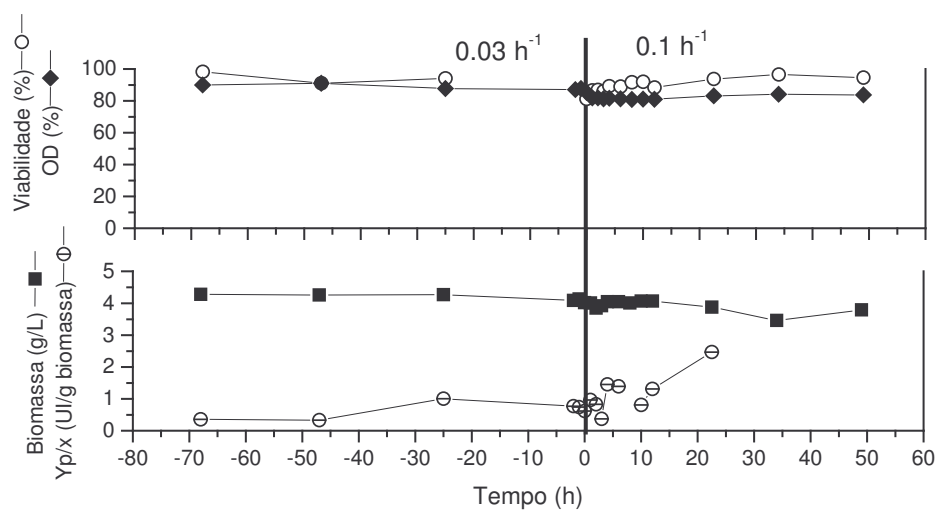


Fig. 8. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de taxa de diluição de $0,03$ a $0,1 \text{ h}^{-1}$ num sistema contínuo a 1200 rpm com duas turbinas de disco. A taxa de aeração foi mantida em 1 vvm .

Na figura 9 observa-se o efeito do degrau da taxa de diluição de $0,1$ a $0,22 \text{ h}^{-1}$, com 10 e $4,5 \text{ h}$ de tempo de residência, respectivamente. Observa-se que a biomassa manteve-se constante, numa média de $3,2 \text{ g/L}$. Ocorreu, no entanto, uma diminuição do OD de 80 a 72% devida a maior atividade metabólica apresentada com maiores taxas de diluição ou velocidades específicas de crescimento. A viabilidade celular se manteve em valores altos (98%). A produção da enzima com taxa de diluição de $0,22 \text{ h}^{-1}$ foi a máxima atingida em sistema contínuo, chegando a 18 UI/g de biomassa, este fato também coincide com a ausência de metabólitos no caldo fermentado.

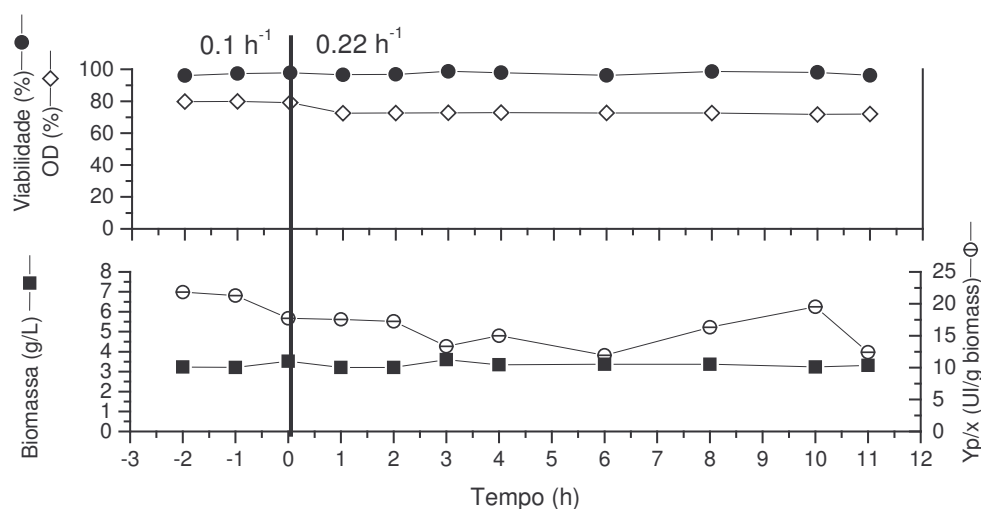


Fig. 9. Biomassa, $Y_{p/x}$, viabilidade e OD durante a perturbação tipo degrau de taxa de diluição de 0,1 a 0,22 h^{-1} num sistema contínuo a 1200 rpm com duas turbinas de disco. A taxa de aeração foi mantida em 1 vvm.

A figura 10 apresenta o efeito da perturbação degrau da taxa de diluição de 0,22 h^{-1} e 0,36 h^{-1} , que correspondem a 4,5 e 2,8 h de tempo de residência, respectivamente. A velocidade específica de crescimento observada nos experimentos em batelada esteve na faixa de 0,3 a 0,4 h^{-1} . A concentração de biomassa mostra uma tendência a diminuir, e sendo assim a velocidade específica de crescimento máxima no sistema seria menor que 0,36 h^{-1} . A contagem de células vivas também mostra uma tendência a diminuir. O OD se manteve constante ao redor de 80% e a viabilidade muito perto de 100%. A produção da enzima, em contraste ao experimento anterior, foi afetada drasticamente, chegando a não produzir enzima. Este fato coincide como o acúmulo de metabólitos tais como glicose, frutose, etanol, glicerol e piruvato, o mesmo que pode ser motivo da repressão da síntese de inulinase.

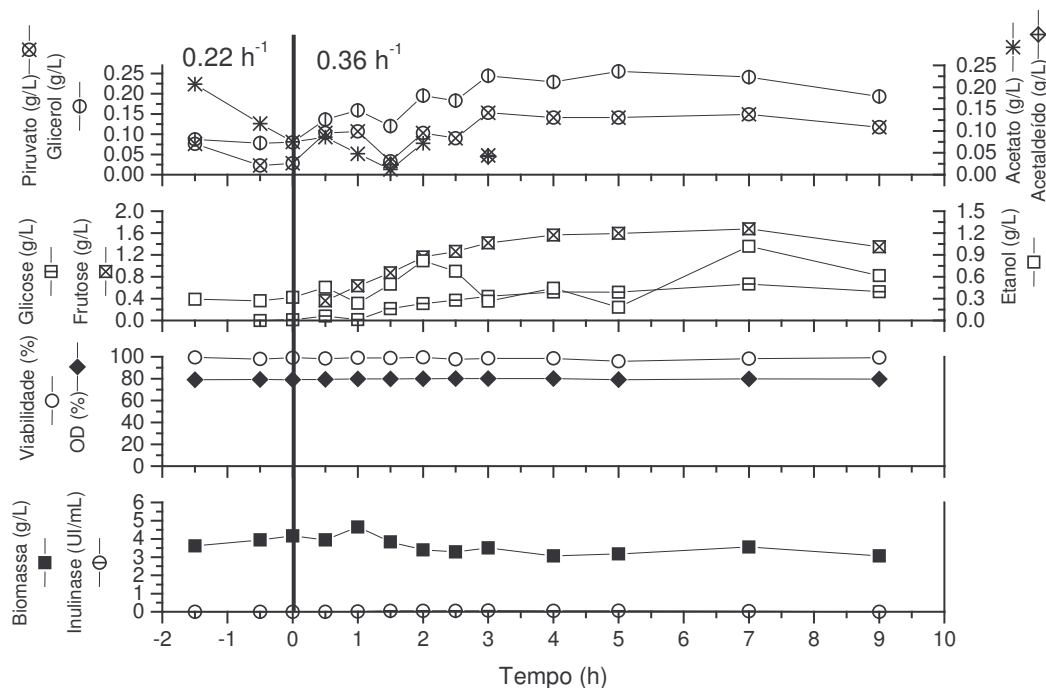


Fig. 10. Biomassa, inulinase, viabilidade, OD, glicose, frutose, etanol, acetato, piruvato, glicerol e acetaldeído durante a perturbação tipo degrau de taxa de diluição de 0,22 a 0,36 h^{-1} num sistema contínuo a 1200 rpm com duas turbinas de disco. A taxa de aeração se manteve em 1 vmm.

Analisando-se todos os resultados obtidos neste estudo confirma-se a hipótese lançada no item anterior e conclui-se que o estresse mecânico, manifestado com perda de viabilidade, acontece só em situações de falta drástica de fonte de carbono e tempos de exposição à tensão de cisalhamento, superiores a 33 h. Desta forma existe uma grande diferença na conduta do estresse mecânico num sistema contínuo em relação a batelada simples, pois no sistema contínuo, desde que exista uma alimentação de meio, existe uma velocidade de crescimento que aumenta a resistência das células à tensão de cisalhamento, não só porque a população está constantemente se multiplicando, mas porque provavelmente, a atividade metabólica conseqüente da efêmera presença de substrato, impeça o processo de morte provocado pela tensão de cisalhamento.

Em relação à produção da inulinase, pode ser concluído que, mantendo constante a tensão cisalhamento em 0,6 Pa, correspondente a 1200 rpm com duas turbinas de disco, a velocidade específica de crescimento condiciona a melhor condição de produção da inulinase, fato que está fortemente relacionado à presença de metabólitos que podem agir como repressores de sua síntese. Cabe ressaltar que a uma velocidade específica de crescimento de $0,36 \text{ h}^{-1}$ a capacidade oxidativa do microrganismo perde eficiência, provocando o acúmulo de substratos e metabólitos e, conseqüentemente, a repressão da biossíntese da inulinase. O aumento da alimentação do sistema pode provocar sobre-fluxos de substratos em determinadas vias metabólicas, o que por sua vez pode acarretar o acúmulo de metabólitos extracelulares.

Nos testes apresentados neste trabalho, não foi variada a concentração de substrato na alimentação, mas especula-se que usando diferentes concentrações de substrato e mantendo a mesma taxa de diluição os resultados podem ser diferentes. Sabe-se que a velocidade específica de crescimento de um microrganismo é definida pela concentração de substrato no caldo fermentado, e que variando a concentração de substrato na alimentação varia a concentração de biomassa no sistema. Trabalhar com maiores concentrações de biomassa pode implicar em maior produção de inulinase, desde que é a biomassa que libera a enzima, sempre quando não exista uma situação de repressão.

8.4.4. Potência, K_La , taxa de diluição e tensão de cisalhamento: correlações para descrever o processo

Alguns parâmetros de engenharia de processos tais como a potência consumida (P/V), o coeficiente de transferência de oxigênio (K_La) e a tensão de cisalhamento (τ), relacionadas às características geométricas e operacionais do sistema de agitação e aeração de um fermentador, foram estudadas com o intuito de descrever as principais variáveis do processo de produção de inulinase. Outra variável relacionada ao regime de alimentação do

sistema contínuo, tal como a taxa de diluição, também foi estudada. A taxa de diluição é uma característica importante do sistema de alimentação de um bioreator contínuo, pois está intimamente ligada às condições fisiológicas do processo, em razão de que, num sistema contínuo, ela equivale à velocidade específica de crescimento do microrganismo.

Na figura 11 (a, b e d), pode-se observar uma boa correlação entre τ e K_{La} com a produção de biomassa, inulinase, viabilidade e oxigênio dissolvido nos experimentos com taxa de diluição $0,1 \text{ h}^{-1}$ e velocidade de agitação variável, apresentados nos itens 8.4.1 e 8.4.2. Nota-se que a produção de biomassa e inulinase atingem valores máximos ($4,2 \text{ g biomassa /L}$ e $3 \text{ UI/g de biomassa}$) em valores de K_{La} e τ iguais a 135 h^{-1} e $0,3 \text{ Pa}$, respectivamente. Estas observações concordam com a tendência relatada por Yépez Silva-Santisteban e Maugeri [18] em relação à influência do K_{La} e tensão de cisalhamento para a produção de inulinase em bateladas simples. Já a P/V não apresentou uma tendência muito definida (Fig. 11c).

Entretanto, os experimentos com taxa de diluição variável, em uma mesma velocidade de agitação, correspondentes ao item 8.4.3, foram alinhados num mesmo nível destes parâmetros (P/V , τ e K_{La}) e são pontos destacados dentro de numa elipse na figura 11 (a, b, c e d) no entanto, estes parâmetros não foram capazes de estabelecer diferenças entre as variáveis de condições de crescimento e de produção de enzima, que caracterizam estes pontos.

Na figura 11e, pode-se observar como a taxa de diluição não foi capaz de diferenciar as variáveis estudadas com taxas de diluição de $0,01$ e $0,1 \text{ h}^{-1}$, sendo os pontos correspondentes alinhados como se mostra em destaque dentro das elipses.

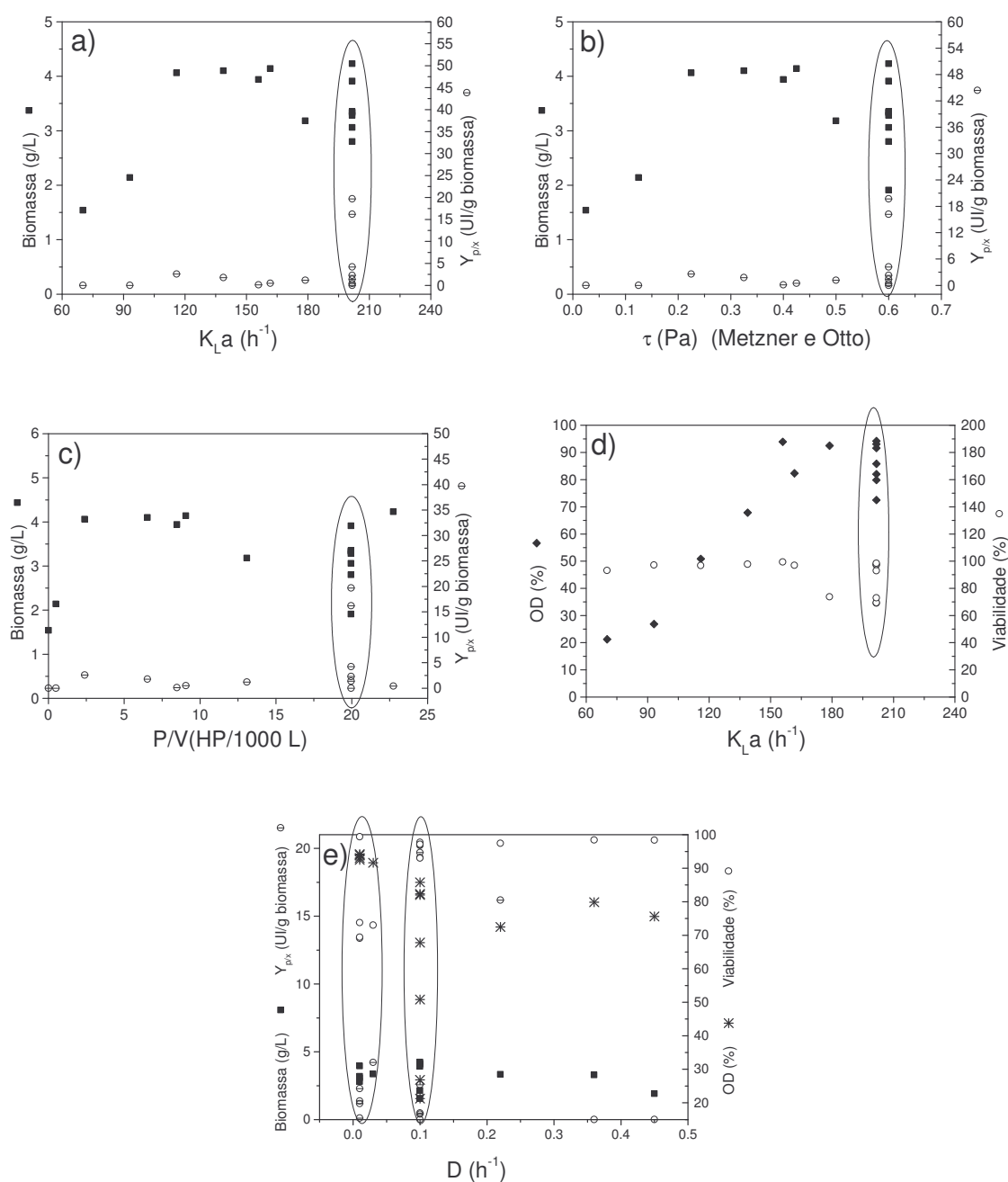


Fig.11. Influência da tensão de cisalhamento (τ), coeficiente de transferência de oxigênio (K_La) e consumo de potência por 1000 L (P/V) no processo em estudo. Produção de biomassa e de inulinase em diferentes condições de: a) K_La . b) τ e c) P/V. d) Níveis de OD e viabilidade com diferentes condições de K_La . e) Produção de biomassa e de inulinase, viabilidade, e OD para diferentes taxas de diluição (D). Os pontos correspondem às velocidades de agitação entre 50-1200 rpm, taxa de diluição entre 0,01 e 0,36 h^{-1} , e os dois tipos de impulsos estudados: de 3 pás inclinadas e turbina de disco.

Portanto, foi necessário incluir a taxa de diluição, em combinação com um ou mais destes parâmetros de engenharia de processo, para poder diferenciar melhor as condições impostas no bioreator. Foram testadas todas as possibilidades de combinação destes parâmetros e observou-se sua capacidade de diferenciar as condições impostas no reator e sua correlação com as principais variáveis do processo.

Na figura 12, pode-se observar as combinações que foram capazes de descrever as principais variáveis do processo de produção de inulinase. Assim, uma combinação do coeficiente de transferência de oxigênio, da tensão de cisalhamento e da taxa de diluição reunidas no fator $K_L a * \tau / D$ (Figura 12 a) descreveu claramente a produção de biomassa em diferentes condições impostas no meio, sendo que numa condição descrita por 600 Pa para este fator é produzida a concentração máxima de biomassa de aproximadamente 4 g/L. Outros fatores tais como τ / D e P / F , sendo este último a divisão de P / V por D e F a vazão de alimentação do sistema, descreveram também a produção de biomassa, embora com correlações menos claras que o anterior.

Ainda na figura 12 (a, b e c), no caso da produção da inulinase, pode-se observar como os fatores $K_L a * \tau / D$, τ / D e P / F a descreveram de uma forma semelhante, contudo ela foi descrita de melhor forma pela combinação do coeficiente de transferência de oxigênio e da taxa de diluição no fator $K_L a * D$ (Figura 12 d). Um valor 5 (h^{-2}) deste fator descreve uma produção máxima de 6 UI/g de biomassa, embora se observe dois pontos fora da correlação que, para valores maiores (entre 20 e 40 h^{-2}) deste fator, descrevem uma produção de inulinase de até 20 UI/g de biomassa. Provavelmente, estas condições estão caracterizadas por algum parâmetro que não está sendo considerado neste estudo. Pode-se observar também que este fator não permite uma boa correlação com a produção de biomassa.

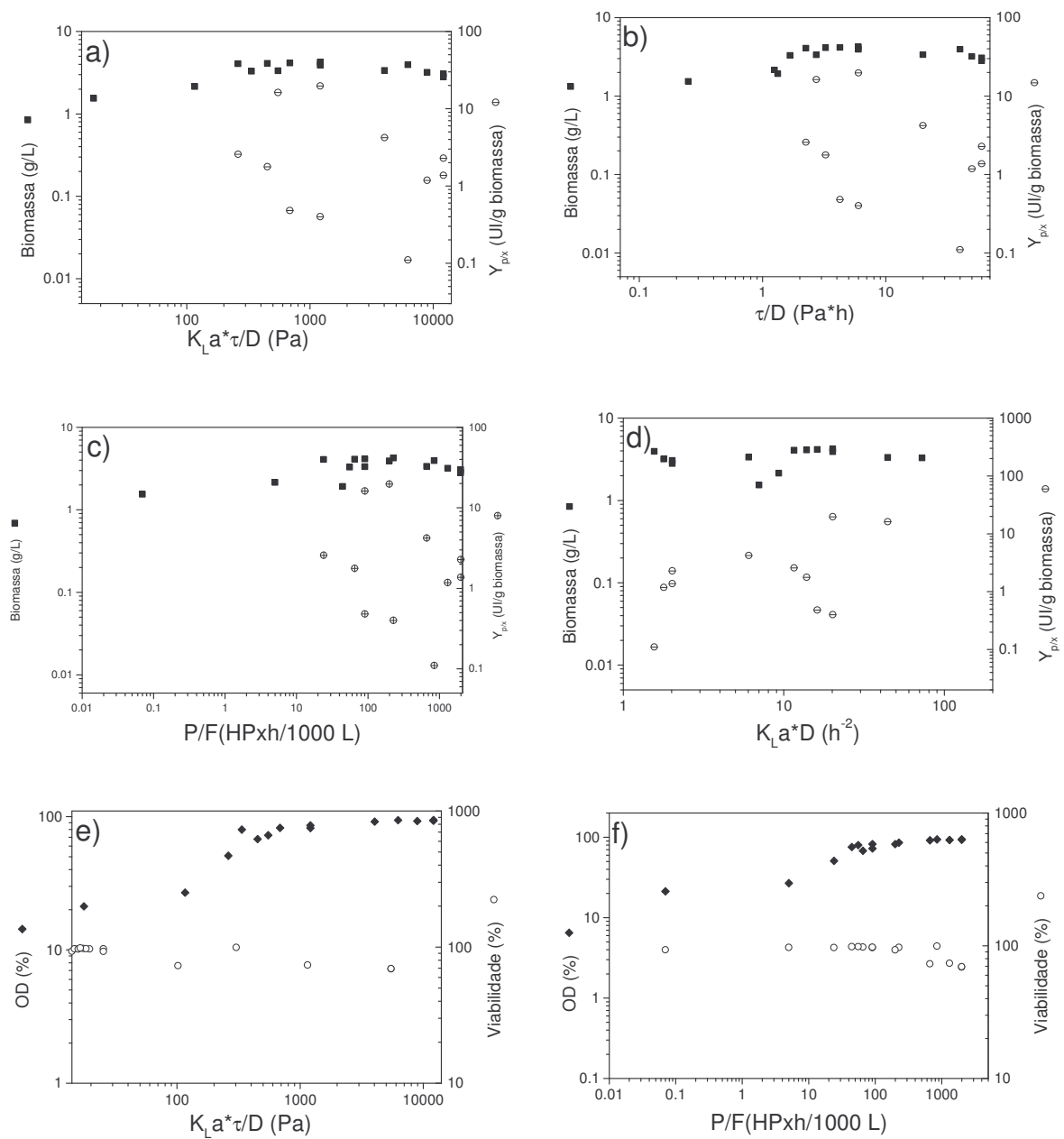


Fig 12. Combinações entre o coeficiente de transferência de oxigênio ($K_L a$), tensão de cisalhamento (τ), consumo de potência (P/V) e taxa de diluição (D) para a descrição das principais variáveis do processo através de correlações empíricas. Os pontos correspondem a velocidades de agitação entre 50-1200 rpm, taxa de diluição entre 0,01 e 0,36 h⁻¹, e os dois tipos de impulsores estudados: de 3 pás inclinadas e turbina de disco.

Em relação à viabilidade celular, foi observado que o fator $K_L a \cdot \tau / D$ apresentou a melhor correlação para esta resposta (Figura 12 e). Isto significa que não só a tensão de cisalhamento, como foi observada por Yépez Silva Santisteban e Maugeri [18] para sistema em batelada simples, mas também a transferência de oxigênio e a velocidade de crescimento do microrganismo devem ser consideradas na definição e escalonamento de um processo de produção de inulinase. Observa-se que valores deste fator de 6000 (Pa) provocam uma perda de viabilidade celular considerável, chegando até 70% de células viáveis. A importância de manter a viabilidade celular alta no sistema deve-se ao fato de, apenas as células viáveis, sintetizarem a enzima. No caso do oxigênio dissolvido o melhor parâmetro foi P/F (Figura 12 f), e um valor deste fator superior a 40 HP*h/1000L caracterizam aos sistemas contínuos de produção de inulinase com valores de oxigênio dissolvido superiores a 80 %. Entretanto valores inferiores deste fator podem apresentar até 20% de OD, sendo nestas condições não foi observado produção de enzima.

8.5. Conclusões

O estresse mecânico, relativo à perda de viabilidade, não foi observado com uma taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$, num sistema com um impulsor de 3 pás inclinadas a 1200 rpm. No entanto, isto foi observado em sistemas com taxas de diluição menores que $0,03 \text{ h}^{-1}$, operando a 1200 rpm, e com taxa de diluição de $0,01 \text{ h}^{-1}$, operando a velocidades de agitação superiores a 1000 rpm, ambos os sistemas com duas turbinas de disco.

O estresse mecânico, manifestado como perda de viabilidade, em *Kluyvermyces marxianus* se apresenta em condições de inanição caracterizadas pela exposição do microrganismo à tensão de cisalhamento por um tempo de residência maior a 33 h, combinado com uma tensão de cisalhamento de no mínimo 0,6 Pa. Desta forma, este tipo

de estresse mecânico em sistemas contínuos se apresenta com uma tensão de cisalhamento muito maior que a observada em sistemas em batelada.

O estresse mecânico relativo à produção da inulinase, foi observado com tensões de cisalhamento superiores a 0,32 Pa, quando foi usado um sistema com taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$, o que equivale a um tempo de residência de 10 h, e um impulsor de 3 pás inclinadas. O mesmo sistema, com tensões de cisalhamento menores que 0,32 Pa, se caracterizou pelo baixo nível de OD, sendo este o motivo para a baixa produção da enzima.

Foram definidos fatores a partir da combinação de um ou mais parâmetros de engenharia de processos e fisiológicos, tais como o coeficiente de transferência de oxigênio (K_La), tensão de cisalhamento (τ), consumo de potência (P/V) e taxa de diluição (D). Estes fatores permitiram a descrição da produção de biomassa, inulinase, oxigênio dissolvido e viabilidade de um sistema contínuo para a produção da inulinase em função das condições do processo relacionadas com estes parâmetros. O fator $K_La*\tau/D$ foi o melhor para descrever a produção da biomassa e a viabilidade celular. A produção da inulinase foi melhor descrita pelo fator K_La*D , parecendo ser que tanto a transferência de oxigênio como a velocidade específica de crescimento são parâmetros consideravelmente mais importantes que a tensão de cisalhamento. Por outro lado, o nível de oxigênio dissolvido foi descrito pelo fator P/F.

8.6. Referências Bibliográficas

- [1]. Märkl H, Bronnenmeier R, Mechanical Stress and microbial production, In: Fundamental of Biochemical Engineering: Byotechnology, Volume Editor: H. Brauer VCH, 1985, v 2, cap 18.
- [2]. Smith CG, Greenfield PF, Randerson DH, A technique for determining the shear sensitivity of mammalian cells in suspension culture, Biotechnology Techniques, 1987, 1 (1) 39-44.
- [3]. Merchuk JC, Shear effects on suspended cells, In: Advances in Biochemical engineering Biotechnology, Managing Editor: A. Fiechter, 1991, v 44.
- [4]. Dunlop EH, Namdev PK, Rosenberg MZ, Effects of fluid shear forces on plant cell suspensions, Chemical Engineering Science, 1994, 49 (14), 2263-2276.
- [5]. Kieran PM, O'Donnell HJ, Malone DM, MacLoughlin PF, Fluid shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*, Biotechnology and Bioengineering, 1995, v 45, 415-425.
- [6]. Wu WT, Hsu YL, Ko YF, Yao LL, Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production, Applied Microbiol Biotechnology, 2002, 58, 175-177.
- [7]. Saito I, Honda H, Kawabe T, Mukumoto F, Shimizu M, Kobayashi T, Comparison of biotin production by recombinant *Sphingomonas sp.* under various agitation conditions, Biochemical Engineering Journal, 2000, 5, 129-136.
- [8]. Baig S, Ahmad HS, Effects of agitator configuration and rotational speed on the production of extracellular polysaccharide by *Xanthomonas cucurbitae* PCSIR B-52, Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 79 (6), 572-578.
- [9]. Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR, Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity, Biotechnology and Bioengineering, 1996, 52 (6), 672-684.
- [10]. Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR, Dependence of *Penicillium chrysogenum*, growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity, Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59 (6), 762-775.
- [11]. Amanullah A, Blair R, Nienow AW, Thomas CR, Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*, Biotechnology and Bioengineering, 1999, 62 (4), 434-446.
- [12]. Papagianni M, Matthey M, Kristiansen B, Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in stirred tank and a tubular loop bioreactor, Biochemical Engineering Journal, 1998, 2, 197-205.

- [13]. Pessoa A, Vitolo M, Hustedt H, Use of K_La as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 57 (8), 669-709.
- [14]. Bhattacharya SK, Dubey AK, Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*, *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20, 355-360.
- [15]. Syu MJ, Chen YH, A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Chemical Engineering Journal*, 1997, 65(3), 237-247.
- [16]. Chen JY, Wen CM, Chen TL, Effects of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62 (3), 311-316.
- [17]. Feng Y, He Z, Ong SL, Hu J, Zhang Z, Ng WJ, Optimizations of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum b-mannanase production, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32, 282-289.
- [18]. Yépez-Silva-Santisteban BO, Maugeri FF, Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36, 717-724.
- [19]. Hensing MCM, Vrouwenvelder JS, Hellinga C, van Dijken JP, Pronk JT, Use of chemostat data for modelling extracellular-inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high-cell-density fed-batch process, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 79 (1), 54-58.
- [20]. Rouwenhorst RJ, Visser LE, Van Der Baan AA, Scheffers WA, Van Dijken JP, Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54 (5), 1131-1137.
- [21]. Kalil, SJ, Maugeri Filho F, Rodrigues MI. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Appl. Biochem. Biotech.* 2001, 94, 257-264.
- [22]. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation, *Yeast* 8 (1992) 501-517.
- [23]. Santos A, Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Campinas, 1998. 86p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPESP

IX. Conclusões gerais

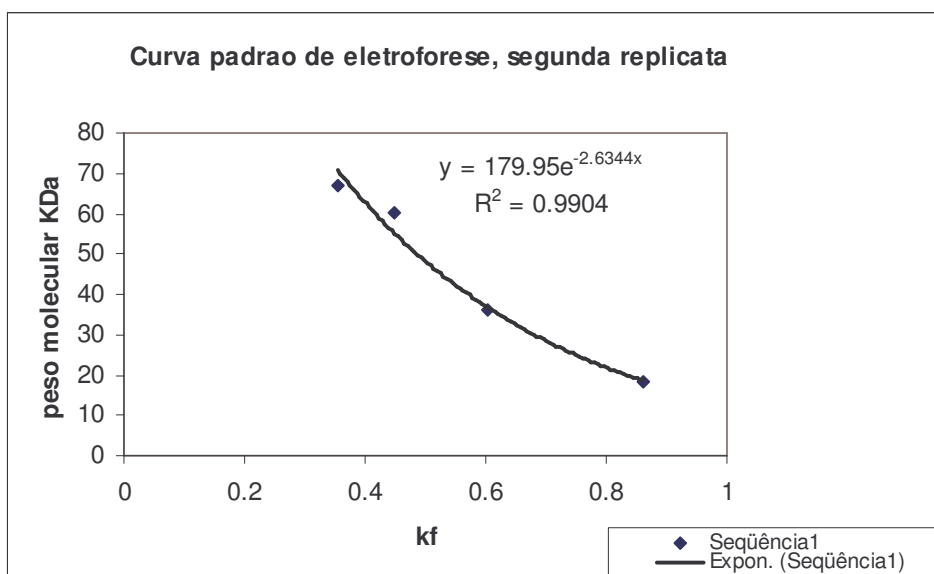
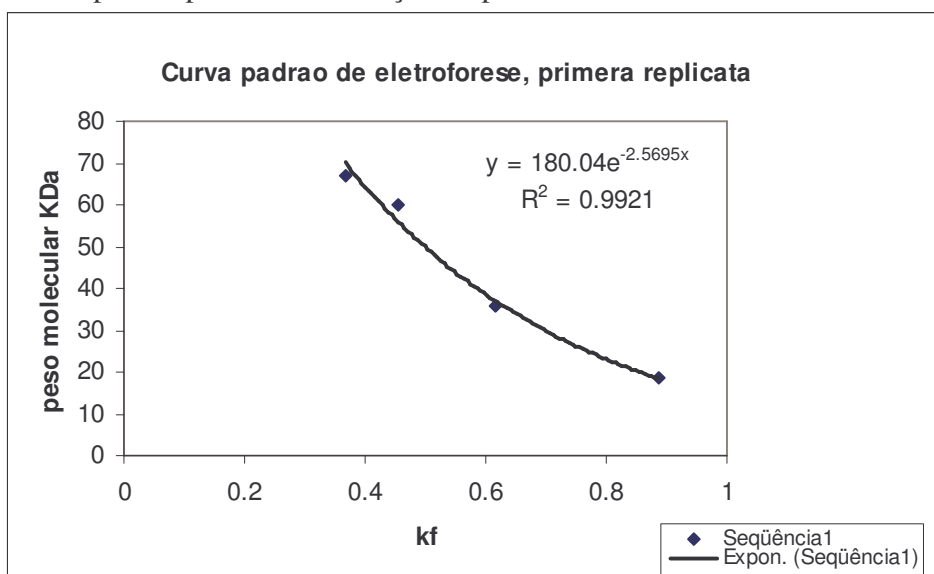
A sensibilidade dos microorganismos à tensão de cisalhamento é um aspecto importante a ser caracterizado, pois varia consideravelmente entre diferentes cepas, inclusive podendo-se transformar num fator limitante em um processo de otimização ou mesmo em um processo de aumento de escala. Particularmente, a transferência de oxigênio e a taxa de diluição, aliados à tensão de cisalhamento devem ser consideradas para escalonamentos de processos de produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 em sistemas de bioreatores contínuos.

X. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar a modelagem metabólica da produção de inulinase para poder caracterizar o efeito dos parâmetros de engenharia de processos.
- Estudar a relação da morfologia da célula com o processo de biossíntese da inulinase.

Anexo I: Informação complementar ao Capítulo VI

Curvas padrão para a determinação do peso molecular em eletroforese SDSPage.



Metodologia de eletroforese SDS-Page usada no Capítulo VI

O procedimento para eletroforese foi seguido como se descreve a seguir, começando pela formulação dos tampões, passando pela formulação dos géis e pela técnica de revelação e terminando na descrição dos padrões.

Eletroforese:

-Tampão SDS de Eletroforese (5x): Tris-base 15.1 g, glicina 72 g, SDS 5 g, água destilada qsp 1000 mL, não ajustar o pH.

-Tampão de corrida (5x) (25 mM Tris, 192 mM glicina, 1 % SDS, pH8.3): Tris-base 9 g, glicina 43.2 g, SDS 3 g, água destilada qsp 600 mL, armazenar a 4 °C. Deixar a temperatura ambiente antes de usar se ocorrer precipitação. Diluir 60 mL com 240 mL de água destilada.

-Solução 0.5 M Tris-Cl, pH 6.8: Tris-base 6 g, água destilada 60 mL, ajustar o pH para 6.8 com HCl 6 N e completar com água destilada até 100 mL, armazenar a 4°C até por um mês.

-Tampão de amostra SDS (1x) (62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8, glicerol 10 %, SDS 2 %, mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0.05% (p/v)): 0.5 M Tris-Cl pH 6.8 1 mL, glicerol 0.8 mL, 1% azul de bromofenol 0.4 mL, 10 % SDS 1.6 mL, mercaptoetanol 0.4 mL, adicionar água destilada até 8 mL se for necessário, armazenar em alíquotas de 0.5 mL a - 70°C.

-Solução 4x 1.5 M Tris-Cl/0.4% SDS, pH 8.8: Tris base 91 g, água destilada 300 mL, ajustar o pH até 8.8 com HCl, adicionar água destilada até 500 mL. Filtrar a solução em filtro de 0.45 µm, adicionar 2 g de SDS, armazenar a 4 °C por até um mês.

-Solução de persulfato de amônio 10%(p/v): 100 mg de persulfato de amônio, adicionar água destilada até 1 mL, preparar diariamente.

-Solução de acrilamida 30% / bisacrilamida 2.67 %: acrilamida 87.6 g, bisacrilamida 2.4 g, água destilada qsp 300 mL, armazenar a 4°C no escuro por até um mês.

-Formulação do gel de separação e de concentração SDS-Page 7.5%: Solução acrilamida/bisacrilamida 2.5 mL, água 4.85 mL, 4x Tris-Cl /SDS pH 8.8 2.6 mL, persulfato de amônio 10% 150 µL, temed 10 µL, dando um volume total de 10 mL.

-As amostras e padrões foram preparados misturando 15 µL de amostra ou padrão e 10 µL de tampão de amostra.

-As corridas duraram entre 30 e 40 min, usando uma voltagem de 150 V.

Revelação rápida com Azul de Coomassie, sensibilidade 0.1-1 µg proteína/ banda de 1 cm de gel:

-Solução de fixação rápida (25% isopropanol, 10% ácido acético): isopropanol 250 mL, ácido acético 100 mL, água deionizada qsp 1000 mL.

-Revelador de azul de Coomassie rápido (0.06 % azul de Coomassie G-250, 10% ácido acético): azul de Coomassie G-250 0.6 g, ácido acético 100 mL, água deionizada qsp 1000mL.

-Colocar o gel numa vasilha com solução de fixação e agitar levemente por 15 min.

-Substituir a solução de fixação pelo revelador de azul de Coomassie, agitar levemente per noite até quando as bandas forem visíveis.

-Substituir o revelador por água destilada e agitar levemente até eliminar o excesso de revelador.

Padrões: foi usado um padrão de alto peso molecular (HMW Calibration Kit-Pharmacia Biotech) o mesmo que estava composto por cinco proteínas: tiroglobulina, ferritina, catalase, lactato desidrogenase e albumina (669, 440, 232, 140, 67 KDa respectivamente), as mesmas que numa eletroforese desnaturante como a SDS-Page reportam pesos moleculares de 330, 18.5, 60, 36, 67 KDa respectivamente.

Curvas padrões: foram feitas relacionando o peso molecular dos padrões com o k_f , definido este ultimo como:

$$k_f = \frac{\text{corrida da banda (cm)}}{\text{corrida de referencia (cm)}}$$

As medidas das corridas foram feitas com paquímetro.

Anexo II: Informação complementar ao Capítulo VII

Detalhes da análise estatística da otimização das condições em HPLC dos pares de picos não detalhados no Capítulo VII.

Resolução Frutose-glicerol
Tabela de Efeitos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Media	1,88284	0,00991	190,04031	0,00000	1,86077	1,90492
T	0,14011	0,01488	9,41902	0,00000	0,10697	0,17326
F	-0,20915	0,01488	-14,05969	0,00000	-0,24229	-0,17600
F ²	0,04133	0,01743	2,37077	0,03923	0,00249	0,08017
pH	0,07048	0,01434	4,91590	0,00061	0,03853	0,10242
TxpH	0,06042	0,01727	3,49918	0,00573	0,02195	0,09889
FxpH	-0,08608	0,01727	-4,98545	0,00055	-0,12455	-0,04761

Modelo:

$$R_{\text{Frut/glice}} = 1.883 + 0.0706T - 0.1046F + 0.0207F^2 + 0.0352pH + 0.0302TxpH - 0.043FxpH$$

+/-0.0099 +/-0.0074 +/-0.0074 +/-0.0087 +/-0.0072 +/-0.0086 +/-0.0086

ANOVA

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	0,3431	6	0,05718	31,94
Resíduos	0,0323	18	0,00179	1,84
Falta de ajuste	0,0226	8	0,00282	2,91
Erro Puro	0,0097	10	0,00097	
Total	0,5546	24		

%variação explicada

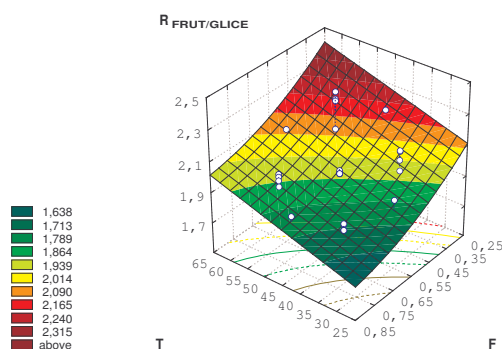
94,18

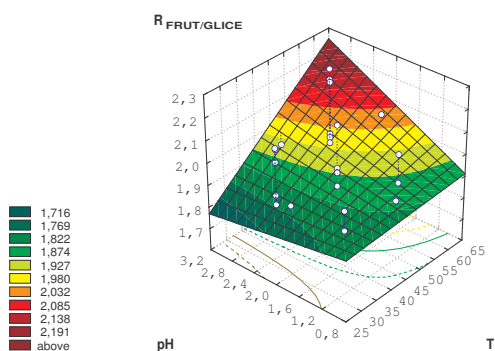
$F_{0,95, 6, 18} = 2,66$

Coeficiente de correlação

0,9705

Superfície de resposta





Resolução Glicerol-acetato
Tabela de Efeitos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Media	0,90569	0,00729	124,26696	0,00000	0,88945	0,92193
T	-0,07268	0,01004	-7,24243	0,00003	-0,09504	-0,05032
F	-0,07401	0,01112	-6,65508	0,00006	-0,09878	-0,04923
F ²	0,04157	0,01300	3,19752	0,00953	0,01260	0,07053
TxF	-0,05311	0,01165	-4,55927	0,00104	-0,07906	-0,02715
FxpH	-0,02887	0,01291	-2,23701	0,04925	-0,05763	-0,00011

Modelo:

$$R_{\text{Glice/acet}} = 0.9057 - 0.0363T - 0.037F + 0.0208F^2 - 0.0266TxF - 0.0144FxpH$$

$$+/-0.0073 \quad +/-0.00502 \quad +/-0.0056 \quad +/-0.0065 \quad +/-0.00582 \quad +/-0.0065$$

ANOVA

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	0,072053	5	0,01441	7,62
Resíduos	0,036021	19	0,00189	3,5
Falta de ajuste	0,030594	9	0,00034	0,63
Erro Puro	0,005427	10	0,00054	
Total	0,122718	24		

%variação explicada

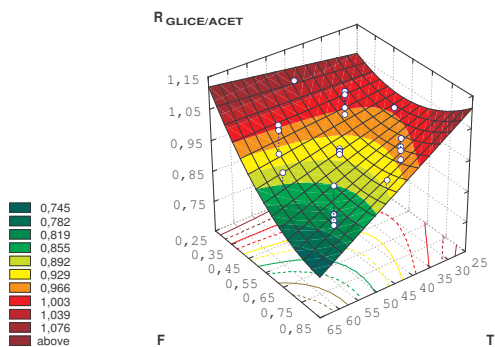
70,65

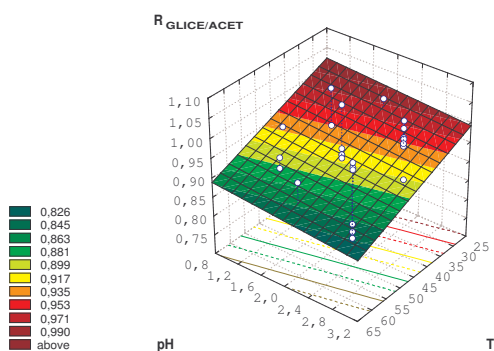
$F_{0,95, 5, 19}=2,74$

Coefficiente de correlação

0,8405

Superfície de resposta





Resolução Acetato-Acetaldeído
Tabela de Efeitos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Media	1,11040	0,01424	77,96696	0,00000	1,07867	1,14213
T	0,29505	0,01577	18,71157	0,00000	0,25991	0,33018
T ²	0,14703	0,01889	7,78394	0,00001	0,10495	0,18912
F	-0,24751	0,01577	-15,69697	0,00000	-0,28265	-0,21238
F ²	0,13472	0,01889	7,13220	0,00003	0,09263	0,17681
pH	0,18877	0,01525	12,37473	0,00000	0,15478	0,22275
TxF	-0,18064	0,01652	-10,93685	0,00000	-0,21744	-0,14384
TxpH	0,11088	0,01830	6,05848	0,00012	0,07010	0,15166
FxpH	-0,13879	0,01830	-7,58324	0,00002	-0,17957	-0,09801

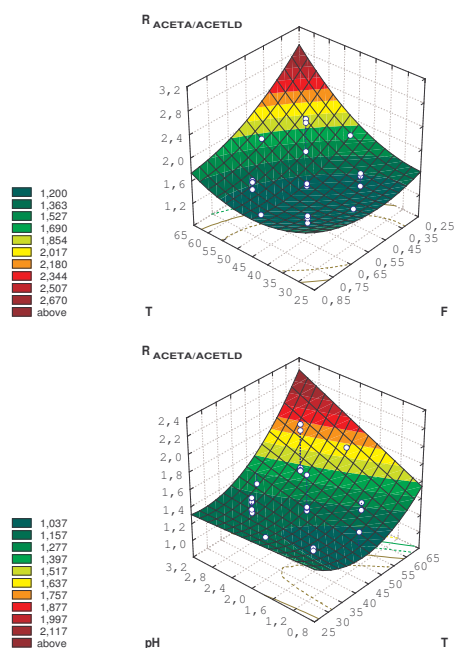
Modelo:

$$R_{\text{Acet/acetld}} = 1.11 + 0.148T + 0.0735T^2 - 0.124F + 0.0674F^2 + 0.0944pH - 0.0903TxF \\ + 0.0554TxpH - 0.0694FxpH \\ \text{with standard errors: } \begin{matrix} \pm 0.014 & \pm 0.0079 & \pm 0.0094 & \pm 0.0079 & \pm 0.0094 & \pm 0.0076 & \pm 0.0083 \\ & & & & & \pm 0.0092 & \pm 0.0092 \end{matrix}$$

ANOVA

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	1,173004	8	0,14663	15,94
Resíduos	0,147273	16	0,0092	8,44
Falta de ajuste	0,136361	6	0,02273	20,83
Erro Puro	0,010912	10	0,00109	
Total	1,772195	24		
%variação explicada		91,69	$F_{0,95, 8, 16} = 2,59$	
Coeficiente de correlação		0,9575		

Superfície de resposta



Resolução Acetaldeído-etanol
Tabela de Efeitos

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Media	1,62888	0,02535	64,25800	0,00000	1,57240	1,68537
F	-0,27582	0,05460	-5,05168	0,00050	-0,39747	-0,15416

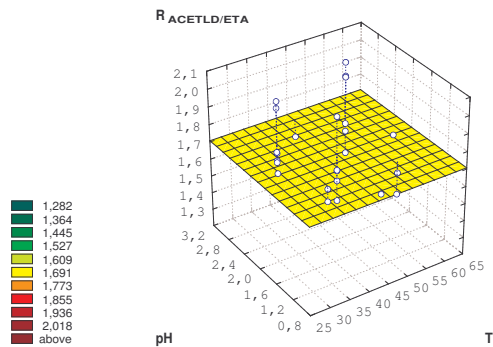
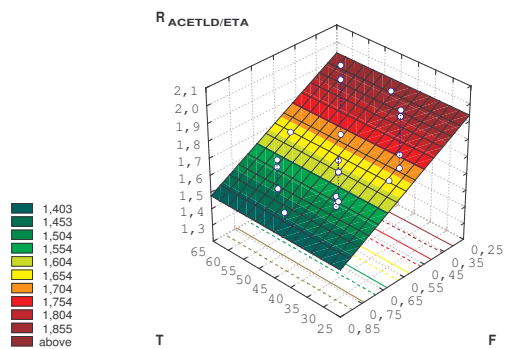
Modelo:

$$R_{Glic/frut} = 1.629 - 0.138T \\ \pm 0.025 \quad \pm 0.027$$

ANOVA

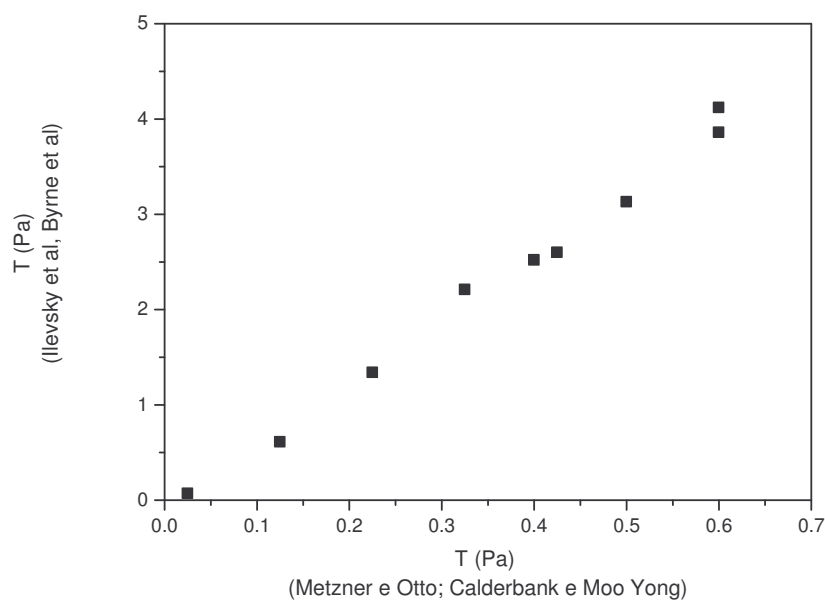
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	0,409956	1	0,40996	25,52
Resíduos	0,504753	23	0,02195	1,37
Falta de ajuste	0,344108	13	0,02647	1,65
Erro Puro	0,160645	10	0,01606	
Total	0,914709	24		
%variação explicada		44,82	$F_{0,95, 1, 23} = 4,28$	
Coefficiente de correlação		0,6695		

Superfície de resposta

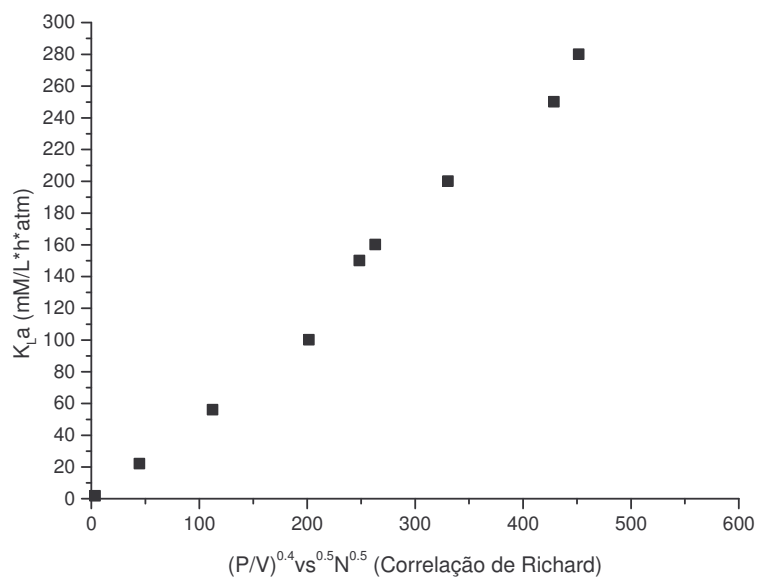


Anexo III: Informação complementar ao Capítulo VIII

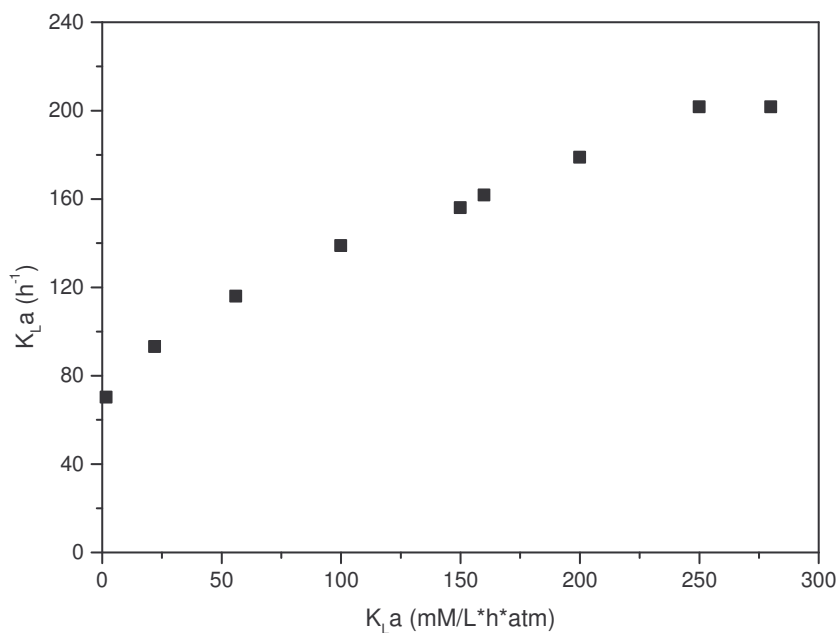
Correlação linear entre a tensão de cisalhamento calculada pelos dois métodos usados no Capítulo IV. Os pontos correspondem a todas as condições estudadas no Capítulo VIII.



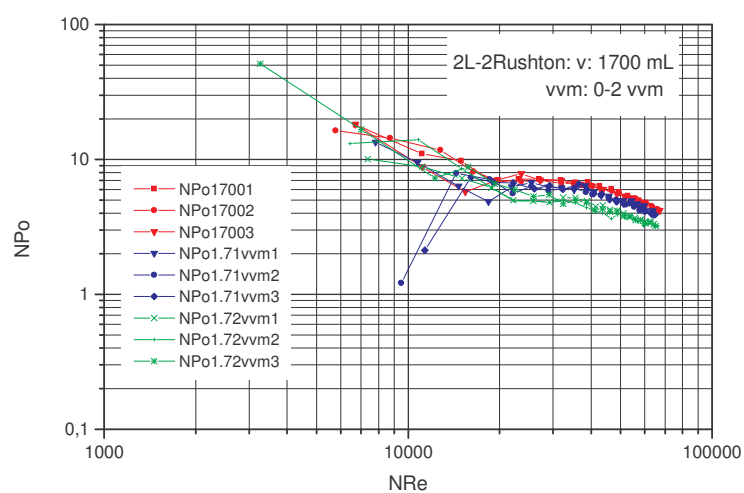
Cálculo do K_{La} pela correlação de Richard. Os pontos correspondem a todas as condições estudadas neste capítulo.



Correlação linear entre o K_{La} calculado pelo método empírico (Yépez Silva-Santisteban 2001) e pela correlação de Richard.



Curvas de potência em função da velocidade de aeração (0-2 vvm) para um sistema com duas turbinas de disco e um volume útil do fluido de 1700 mL, usadas para o cálculo da potência dissipada.



Curvas de potência em função da velocidade de aeração (0-2 vvm) para um sistema com um impulsor de três pás inclinadas e um volume útil do fluido de 1700 mL, usadas para o cálculo da potência dissipada.

