



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEILA LARISSA MEDEIROS MARQUES

**EFEITO DE PULSOS DE RAFINOSE E IRRADIAÇÃO
ULTRA-SÔNICA NA LIBERAÇÃO DA INVERTASE DE
Saccharomyces cerevisiae LIVRE E IMOBILIZADO EM
BUCHA VEGETAL (*Luffa cylindrica*)**

Londrina
2004

LEILA LARISSA MEDEIROS MARQUES

**EFEITO DE PULSOS DE RAFINOSE E IRRADIAÇÃO
ULTRA-SÔNICA NA LIBERAÇÃO DA INVERTASE DE
Saccharomyces cerevisiae LIVRE E IMOBILIZADO EM
BUCHA VEGETAL (*Luffa cylindrica*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Buzato

Londrina
2004

LEILA LARISSA MEDEIROS MARQUES

**EFEITO DE PULSOS DE RAFINOSE E IRRADIAÇÃO
ULTRA-SÔNICA NA LIBERAÇÃO DA INVERTASE DE
Saccharomyces cerevisiae LIVRE E IMOBILIZADO EM
BUCHA VEGETAL (*Luffa cylindrica*)**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Buzato
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis
UNESP – Rio Claro

Prof^a. Dr^a. Maria Antônia P. C. Celligoi
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de Julho de 2004.

DEDICATÓRIA

A Deus, que me concede a vida e a conduz com amor infinito.

Aos meus pais Laureto e Maria do Carmo, pelo amor e incentivo.

Ao meu esposo Valcenir, meu grande amor e companheiro, pela dedicação constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre junto a mim, conduzindo minhas decisões e restaurando minhas forças.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Batista Buzato pela confiança, apoio e liberdade concedida a pensamentos e idéias e por toda a ajuda dispensada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Departamento de Bioquímica da UEL, que muito colaboram para a realização deste trabalho, em especial a Profa. Dra. Lúcia H. M. Vargas.

A minha família, em especial meus pais, por toda confiança, amor, motivação e pelo exemplo de vida que sempre representaram para mim.

Ao meu esposo, a quem tanto amo, pelo carinho, atenção e incentivo.

Aos colegas de curso, especialmente à Raquel, Luciana e Marciane, grandes incentivadoras e que se tornaram minhas grandes amigas.

A todos que colaboraram para a realização e finalização deste trabalho, especialmente o estagiário Evandro, técnico Nelson e funcionária Elda.

MARQUES, Leila Larisa Medeiros. **Efeito de pulsos de rafinose e irradiação ultra-sônica na liberação da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizado em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*)**. 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2004.

RESUMO

A invertase é uma enzima de grande interesse industrial, que catalisa a reação de hidrólise da sacarose, produzindo açúcar invertido. O uso de rafinose e irradiações ultra-sônicas pode proporcionar a liberação quantitativa de enzimas em sua forma ativa, e assim constituir uma ferramenta para a melhoria de processos biotecnológicos. *Luffa cylindrica* é um excelente suporte para a imobilização de células microbianas, exibindo vantagens como baixo custo e resistência a autoclavação. Neste trabalho investigou-se o efeito de pulsos de rafinose e ultra-som, na liberação de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizado em *Luffa cylindrica*. A cultura de células livres foi submetida a pulso de rafinose 2% e irradiada por 2 min, nas taxas de diluição 0,12 e 0,46 h⁻¹. A cultura de células imobilizadas foi submetida a pulso de rafinose e irradiada por 1, 2 e 4 min, em taxa de diluição 0,10 h⁻¹. Em células livres, o pulso de rafinose não alterou a atividade invertásica, entretanto, em células imobilizadas o valor da atividade aumentou de 5,38 para 7,27 U/mg. A aplicação do ultra-som, em cultivo de células livres na taxa de diluição 0,12 h⁻¹, obtiveram os melhores resultados. A atividade variou de 25,08 para 29,38 U/mg, enquanto que o aumento em células imobilizadas foi de 5,22 para 9,70 U/mg, quando sonicadas por 2 min. Esses resultados demonstram que a aplicação de ultra-som, em cultivo contínuo, pode ter um grande potencial de aplicação em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Imobilização. Invertase. *Luffa cylindrical*. Rafinose. *Saccharomyces cerevisiae*. Ultra-som.

MARQUES, Leila Larisa Medeiros. **Effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge.** 2004. 75f. Dissertation (Master's Degree Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2004.

ABSTRACT

The enzyme invertase is of great interest to industry because it catalyzes the sucrose hydrolysis reaction producing invert sugar. The use of raffinose and ultrasound irradiation can release large amounts of enzymes in their active form and thus it is a tool to improve biotechnological processes. *Luffa cylindrica* is an excellent support to immobilize microbial cells, showing advantages such as low cost and resistance to autoclaving. This study investigated the effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release from free *S. cerevisiae* and *S. cerevisiae* immobilized in *Luffa cylindrica*. The free cell culture was submitted to 2% raffinose pulse and irradiated for 2 minutes at dilution rates of 0.12 and 0.46 h⁻¹. The immobilized cell culture was submitted to raffinose pulse and irradiated for 1, 2 and 4 minutes, at 0.10 h⁻¹ dilution rate. In free cells, the raffinose pulse did not alter the invertase activity but in immobilized cells, the value of the activity increased from 5.38 to 7.27 U/mg. Ultrasound application in free cell culture at the 0.12 h⁻¹ dilution rate gave the best results. The activity varied from 25.08 to 29.38 U/mg while the increase in immobilized cells was from 5.22 to 9.70 U/mg when sonicated for 2 minutes. These results showed that ultrasound application in continuous culture may have great potential for application in biotechnological techniques.

Keywords: Immobilization. Invertase. *Luffa cylindrica*. Raffinose. *Saccharomyces cerevisiae*. Ultrasound.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 INVERTASE	12
3.1.1 Estrutura e localização	12
3.1.2 Propriedades catalíticas	13
3.1.3 Controle da biossíntese por repressão catabólica.....	13
3.1.4 Algumas aplicações da invertase	14
3.2 RAFINOSE	15
3.3 ULTRA-SOM.....	16
3.3.1 Ondas sonoras	16
3.3.2 Influência do ultra-som em processos biotecnológicos	17
3.3.3 Utilização do ultra-som em biotecnologia	18
3.4 FERMENTAÇÃO CONTÍNUA.....	21
3.5 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS.....	23
3.5.1 Imobilização de células em materiais lignocelulósicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAIS	28
4.1.1 Microrganismo	28
4.1.2 Meios de cultura	28
4.1.2.1 Meio de Manutenção	28
4.1.2.2 Meio de Fermentação.....	29
4.1.3 Fermentador contínuo	29
4.1.4 Equipamento de ultra-som	30
4.1.5 <i>Luffa cylindrica</i>	31
4.2 MÉTODOS	31
4.2.1 Preservação do microrganismo	31

4.2.2 Preparo do inoculo	31
4.2.3 Condições de cultivo	32
4.2.4 Determinação do $\mu_{m\acute{a}x}$	32
4.2.5 Imobilização	32
4.2.6 Fermentação	33
4.2.7 Coleta de amostras	33
4.2.8 Determinação da atividade invertásica	33
4.2.9 Determinação de açúcares redutores e totais	34
4.2.10 Determinação de proteínas totais.....	34
4.2.11 Pulso de rafinose.....	35
4.2.12 Tratamento com ultra-som	35
4.2.13 Dosagem da produção de etanol	35
4.2.14 Determinação de biomassa.....	36
4.2.15 Determinação de pH.....	36
4.2.16 Viabilidade	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 DETERMINAÇÃO DO $\mu_{m\acute{a}x}$	37
5.2 FERMENTAÇÃO CONTÍNUA COM CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS.....	38
5.3 ARTIGO 1: EFFECT OF RAFFINOSE AND ULTRASOUND PULSES ON INVERTASE RELEASE BY FREE AND IMMOBILIZED <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> IN LOOFA (<i>LUFFA CYLINDRICA</i>) SPONGE	43
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	67
ANEXO A – Instruções para preparação e encaminhamento de artigo científico para publicação na revista World Journal of Microbiology & Biotechnology	68
ANEXO B – Comprovante de submissão do Artigo I.....	74

1 INTRODUÇÃO

A enzima invertase de levedura é de grande interesse industrial, pois é usada na produção de xarope a partir de sacarose e melado, que possui importante aplicação na indústria de alimentos, bem como, é utilizada em sensores na determinação de sacarose.

Assim, têm sido propostas diferentes metodologias para aumentar a liberação de invertase no meio de cultivo. O uso de indutores enzimáticos e irradiações ultra-sônicas têm mostrado resultados positivos na produção, por células microbianas, de diversas enzimas de interesse industrial.

A rafinose é um trissacarídeo que pode ser utilizado como fonte de carbono por *S. cerevisiae*, pois a invertase cliva a molécula de rafinose em melibiose e frutose. A rafinose pode agir como indutor na biossíntese de invertase em células de *S. cerevisiae*.

O ultra-som são ondas mecânicas longitudinais que provocam grande distúrbio em um cultivo microbiano, pois favorecem a transferência de massa e fornecem grande quantidade de energia, através da cavitação acústica. O uso de irradiações ultra-sônicas de baixa intensidade pode influenciar reações catalisadas por enzimas e proporcionar a liberação de enzimas em sua forma ativa.

A fermentação contínua apresenta vantagens em relação ao cultivo em batelada, como produtividade maior, é excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica, possui maior facilidade de controle de processo e menor necessidade de mão-de-obra.

A imobilização de células exibe algumas vantagens quando comparada com um cultivo de células livres. A velocidade da reação pode ser acelerada, o valor da produtividade específica alcançada pode ser maior, além de, na fermentação contínua, uma alta taxa de diluição pode ser usada, sem provocar lavagem de células.

Dentre os suportes utilizados na imobilização de células microbianas, o uso de *Luffa cylindrica* é altamente promissor, pois apresenta baixo custo, alta porosidade, resistência a autoclavação e variação de pH e temperatura.

Neste contexto, o presente trabalho investigou o efeito de pulsos de rafinose e irradiação ultra-sônica, na liberação de invertase por células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e immobilizadas em *Luffa cylindrica*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito de pulsos de rafinose e irradiação ultra-sônica na liberação de invertase, em células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver a fermentação do *S. cerevisiae* em processo contínuo testando taxas de diluição.

Imobilizar células de *S. cerevisiae* em bucha vegetal, em fermentação contínua.

Avaliar o efeito do pulso de rafinose na atividade invertásica, durante a fermentação.

Avaliar o efeito da irradiação ultra-sônica na atividade invertásica e na viabilidade celular em cultivos de *S. cerevisiae* livre e imobilizada, no decorrer da fermentação.

Acompanhar o processo fermentativo através das dosagens de proteínas totais, açúcares redutores, açúcares totais e etanol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INVERTASE

A invertase (β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose (α -D-glucose ligada a β -D-frutose por ligação glicosídica do tipo α -1,2), dissacarídeo este, que desvia o plano da luz polarizada para a direita (+66,5). Os produtos da hidrólise são D-glucose (+52,5°) e D-frutose (-92°) mistura esta, que desvia o plano da luz polarizada para a esquerda (-20°) (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

3.1.1 Estrutura e localização

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz uma invertase intracelular e outra extracelular (MOMENEO et al., 1989). A invertase intracelular ocorre na forma não-glicosilada, de um dímero de 115kDa, e a forma glicosilada consiste em uma mistura de dímeros, tetrâmeros e octâmeros com alto conteúdo de manoses, que é secretada no espaço periplasmático da célula da levedura. A forma glicosilada contém manoses N- e O-ligadas na proporção 40/1. Essa glicosilação tem a função de estabilizar a invertase, protegendo-a da desnaturação térmica, da agregação, da ação de alguns solventes e parece possuir a função de auxiliar no “dobramento” da cadeia polipeptídica nascente e estabilizar a conformação da glicoproteína madura. A invertase extracelular possui um peptídeo sinalizador que permite a secreção desta enzima (SAEKI; OKUYAMA; MORI, 1998; KERN, et al., 1993; KERN, et al., 1991; MOMENEO et al., 1989).

Quanto à cadeia polipeptídica, as invertases extracelular e intracelular são praticamente idênticas, diferindo apenas em um único sítio, onde uma prolina 390 foi substituída por uma alanina (REDDY; JOHNSON; BIEMANN, 1988). As invertases externas possuem fosfato ligado covalentemente, variando de

sete a vinte e sete resíduos de fosfato por mol de enzima, estando a maior parte ligada a manose. Colonna, Cano e Lampen (1975), não encontraram relação entre o conteúdo de fósforo e a atividade enzimática, mas as mais fosforiladas são mais acídicas, apresentando valores mais baixos de ponto isoelétrico.

3.1.2 Propriedades catalíticas

Algumas invertases catalisam a hidrólise além da sacarose, também da rafinose, inulina e estaquiose. Neste grupo encontra-se a maioria das invertases de leveduras, bactérias e vegetais (LAMPEN, 1971).

Em *S. cerevisiae*, a sacarose é hidrolisada extracelularmente pela invertase, porém alguns trabalhos relatam que este açúcar também é levado diretamente para o interior das células, pelo transportador codificado pelo gene AGT1, que possui alta afinidade por este açúcar. Cepas que possuem este transportador crescem mais rapidamente em sacarose do que cepas sem este transportador (STAMBUK e BATISTA, 2003; MWESIGYE e BARFORD, 1996).

A invertase apresenta atividade ótima entre os valores de pH igual a 3,5 e 5,5, quando hidrolisam soluções de sacarose que variam de 1 a 15%. A temperatura ótima de reação varia de autor para autor, podendo ser de 23°C a 30°C. A determinação da temperatura ótima depende, principalmente, do grau de purificação da enzima. Os extratos brutos, por exemplo, são mais estáveis a temperaturas elevadas do que as preparações purificadas. Outro fator de grande influência na temperatura de reação é a concentração de substrato (DRAETTA, 1972). Ela pode ser inibida por iodo, etanol, NaCl e por íons de metais pesados, tais como Hg^{2+} , Ag^{+} , Cu^{2+} (ZECH e GÖRISCH, 1995; WHITAKER, 1972).

3.1.3 Controle da biossíntese por repressão catabólica

A expressão do gene da invertase (SUC 2) é controlada pela presença de monossacarídeos, como glucose e frutose, este mecanismo regulatório

é denominado de repressão catabólica do carbono. Quando o *S. cerevisiae* cresce em um meio contendo uma mistura de glucose e outro açúcar fermentescível como a sacarose, galactose ou maltose, a glucose é metabolizada primeiro, enquanto outros açúcares serão metabolizados quando a glucose for exaurida (HERWIG et al., 2001; DYNESEN et al., 1998; D'AMORE; RUSSEL; STEWART, 1988). DYNESEN et al., (1998), sugerem que a hexoquinase PII, que promove a fosforilação da glucose e frutose "in vivo", está envolvida no desencadeamento da repressão catabólica. O sinal que inicia a repressão por glucose é desconhecido, mas parece ser influenciado pelo nível de glucose 6-fosfato, sugerindo o envolvimento da glucose extracelular ou intracelular, ou ainda, do fluxo de glucose no disparo da repressão.

3.1.4 Algumas aplicações da invertase

Ledoux e Dubourdiu (1999) isolaram e identificaram uma manoproteína (um fragmento de invertase) liberada pelo *S. cerevisiae*, depois das fermentações alcoólicas, que seria responsável por melhorar a estabilidade de proteínas no vinho branco envelhecido e de seus sedimentos. Normalmente, para este propósito utiliza-se a bentonita, porém altas doses desta substância podem promover uma redução das propriedades organolépticas do vinho branco seco.

Segundo Balasundaram e Pandit (2001), a invertase pode ser usada como catalisador para a produção do xarope invertido de sacarose e melão, também pode ser usada na produção de etanol a partir do melão e mais recentemente, a invertase pode ser imobilizada para a determinação contínua de sacarose.

A conversão enzimática de açúcares em gás hidrogênio pode ser um método promissor para a produção de um combustível alternativo. Woodward e Orr (1998) investigam a utilização da sacarose para a produção de hidrogênio utilizando as enzimas invertase, glucose desidrogenase, hidrogenase e glucose isomerase, além de cofatores como o NADP⁺/NADH. Conseguiu-se a produção de 1,34 moles de H₂/mol de sacarose utilizada.

Pesquisas estão sendo realizadas, utilizando parte da seqüência de aminoácidos da invertase, para o desenvolvimento de uma vacina de baixo custo e segura contra a hepatite B (SCHREUDER et al., 1996).

3.2 RAFINOSE

A rafinose ou β -D-frutofuranosil-O- α -galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosídeo, é um trissacarídeo que por hidrólise ácida libera D-galactose, D-glucose e D-frutose.

A rafinose pode ser utilizada como fonte de carbono por *S. cerevisiae*, pois a enzima invertase cliva a molécula de rafinose em melibiose e frutose. (PARASCANDOLA; ALTERIIS; SCARDI, 1993; MERCK INDEX, 1989).

Parascandola, Alteriis e Scardi (1993) testaram alguns meios de cultura para investigar o efeito de rafinose como indutora da enzima invertase. Este açúcar pode atuar como indutor, devido sua estrutura ser semelhante à sacarose, bem como ausência de glicose livre entre seus produtos de hidrólise. Desta forma, verificou-se um aumento na atividade quando utilizou-se rafinose a 2% no meio de cultura.

Brandão et al., (2002) investigaram a atividade da invertase sob condições de crescimento repressivas e não repressivas. Para isto, as células de *S. cerevisiae* foram crescidas em diferentes fontes de carbono: glucose, frutose, galactose e rafinose. O maior valor de atividade de invertase foi obtido quando utilizou-se a rafinose como fonte de carbono.

3.3 ULTRA-SOM

3.3.1 Ondas sonoras

Ondas mecânicas ou acústicas surgem quando as partículas, do qual o meio é composto, são excitadas com energia e começam a vibrar. Estas partículas podem transferir parte desta energia às partículas adjacentes, que também começam a vibrar e transmitir energia na forma de uma onda (WILLIANS, 1983). A onda é um fenômeno natural que tem por finalidade a transferência de energia de um ponto a outro, através do movimento de partículas.

As ondas sonoras do tipo mecânicas longitudinais podem se propagar em sólidos, líquidos e gases (OKUNO; CHOW; CALDAS, 1986). A transferência de energia de uma onda é influenciada pelo tamanho e número de moléculas por unidade de volume (a densidade do material) e também, pela natureza e magnitude das interações do complexo intermolecular. Assim, as propriedades físicas do meio têm um profundo efeito na propagação da onda em diferentes materiais.

O ouvido humano detecta uma grande faixa de sons propagados pelo ar, com frequência entre 16 Hz a 16 kHz. As ondas mecânicas longitudinais com frequências abaixo de 16Hz são chamadas de infra-som e acima de 16kHz, ultra-som (WILLIANS, 1983).

Em processos biotecnológicos, utilizando ondas ultra-sônicas emprega-se comumente frequência, amplitude e intensidade. A seguir são apresentadas definições destes termos (CHISTY, 2003; VARGAS, 2001).

A frequência (f) de uma onda é o número de comprimentos de onda que passam por um determinado ponto, por unidade de tempo. Se a unidade de tempo for segundo, a unidade para frequência será ciclos por segundo, conhecida como Hertz (Hz).

A amplitude (A) de uma onda é o deslocamento vertical máximo da onda acima (ou abaixo) de seu valor original inalterado. A amplitude determina a força da onda, pois a potência transferida por uma onda, no meio onde esta se propaga, é em função de sua amplitude.

A intensidade (I) é a razão do fluxo de energia, através de um plano imaginário por unidade de área orientada em perpendicular à direção de propagação da onda. Assim, as unidades de intensidade são Watts por metro quadrado ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$), ou miliwatts por centímetro quadrado ($\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). A intensidade do ultra-som é diretamente relacionada com a amplitude das ondas ultra-sônicas.

3.3.2 Influência do ultra-som em processos biotecnológicos

O ultra-som pode destruir células microbianas, e talvez este efeito possa desencorajar pesquisas sobre os efeitos benéficos do ultra-som em processos biotecnológicos (GUERRERO; LÓPEZ-MALO; ALZAMORA, 2001). Assim, o ultra-som pode aumentar o transporte difusional tanto dentro como fora da célula, e desta maneira influenciar na velocidade de reações e rendimento de metabólitos.

A aplicação de ultra-som em processos biotecnológicos interfere na temperatura, provoca a cavitação e favorece a transferência de massa.

O ultra-som provoca aumento da temperatura. Em processos biotecnológicos constitui efeito negativo, uma vez que provoca a desnaturação de biomoléculas, bem como, perda da viabilidade celular. Os processos biotecnológicos ocorrem, geralmente, em condições isotérmicas.

O outro efeito observado é a cavitação. O termo cavitação é usado para descrever a formação de cavidades ou bolhas no meio líquido, contendo quantidades variáveis de gás ou vapor (OKUNO; CHOW; CALDAS, 1986). Este fenômeno pode produzir radicais livres que são formados, provavelmente, pelas descargas elétricas geradas através do vapor d'água no interior das cavidades, ou pela dissociação térmica provocada pelo colapso das bolhas geradas pela cavitação.

Existem dois tipos de cavitação, a transitória e a estável (SINISTERRA, 1992).

A cavitação transitória é um fenômeno que envolve gás e vapor. As bolhas sofrem vibrações irregulares e implodem. A cavitação transitória é indesejável em processos biotecnológicos, uma vez que causa um aumento da temperatura e pressão que, certamente, desintegraria as células ou desnaturaria enzimas.

A cavitação estável é um fenômeno envolve a formação de bolhas, e estas vibram de forma regular por muitos ciclos acústicos. As bolhas induzem ao seu redor uma microcorrenteza que age nas células, enzimas ou microcristais. Este tipo de cavitação é importante na aplicação do ultra-som em biotecnologia.

O uso do ultra-som também favorece a transferência de massa pelo aumento do movimento do meio líquido. Há três diferentes locais onde este processo ocorre: na camada de meio circundante, na membrana e/ou parede celular, e no citosol.

Na camada circundante, a bolha de gás vibratória gera ao redor dela movimento circulatório de líquido referido como microcorrenteza. Este fato favorece o fluxo de reagentes para o sítio ativo de enzimas ou para a célula e de produtos de reação para o meio, aumentando o número de renovação, conseqüentemente, aumentando a velocidade do processo. A irradiação ultra-sônica num nível de intensidade apropriada provoca microcorrenteza nas células, com rotação de organelas e movimentos circulares dos vacúolos. Esses efeitos podem produzir aumento nas funções metabólicas da célula que são úteis em biotecnologia (SINISTERRA, 1992).

3.3.3 Utilização do ultra-som em Biotecnologia

Inúmeros métodos têm sido utilizados para obtenção de produtos microbianos intracelulares. Entre estes, o ultra-som vem sendo empregado, pois apresenta baixo custo de operação, não requer equipamento sofisticado, nem treinamento técnico extensivo (BARTON; BULLOCK; WEIR, 1996).

O ultra-som pode induzir a transferência de material genético em células animais e vegetais e aumentar a produtividade de processos biológicos (CHISTRY, 2003). Lin et al., (2002) demonstraram que o uso de ultra-som de baixa intensidade aumentou a produção de metabólito secundário em cultura de células vegetais. Schläfer et al., (2000) sugeriram que o uso de ultra-som de baixa energia em biorreatores pode apresentar redução de custos na indústria biotecnológica, especialmente em processos de tratamento de águas residuais.

Radel et al., (2000) avaliaram a viabilidade de células de leveduras irradiadas com ultra-som de alta frequência. Estes autores demonstraram que as células apresentaram mudanças morfológicas, perda de viabilidade e aumento da quantidade de material intracelular no espaço extracelular.

Em culturas de células microbianas, a aplicação de ultra-som de baixa intensidade aumenta o crescimento, mas o ultra-som de alta frequência causa rompimento da parede celular, sendo utilizado como bactericida (MATSUURA et al., 1994).

O efeito das irradiações ultra-sônicas de alta intensidade de romper células e desativar enzimas é grande em meio aquoso, entretanto, este efeito diminui em condições bifásicas (SINISTERRA., 1992).

Segundo Bucalon e Palma (1987), a sonicação de suspensão de células de *S. cerevisiae* a 20kHz de frequência ($I = 10W.cm^{-2}$) durante 30 minutos na ausência de luz, produziu peróxido de hidrogênio em nível suficiente para promover a oxidação de grupos hidroxila e tiol alquílico de compostos orgânicos liberados pela ruptura das células. A temperatura foi mantida a 4°C para evitar a decomposição do peróxido de hidrogênio e para controlar a taxa de reações sonoquímicas. Estes autores concluíram que a qualidade do extrato celular de *S. cerevisiae* obtido pela sonicação, não é adequado para a maioria das finalidades fisiológicas e bioquímicas, visto que, a natureza química do material biológico foi mudada pela cavitação.

Bucalon e Palma (1989) sugerem que células de *S. cerevisiae* irradiadas a 20 kHz de frequência, intensidade de $2,5W.cm^2$ durante 15 minutos a 4°C, que a sonicação, causou rompimento da camada de solvatação ao redor das células e promoveu influxo de metabólitos para o espaço periplasmático.

Lanchun et al., (2003) observaram que a estimulação do ultra-som em cultura de *S. cerevisiae*, numa frequência de 24 kHz e 2W de potência, altera a permeabilidade da membrana, acelerando assim a transferência de substâncias e impulsionando a atividade e síntese enzimática.

Os efeitos do ultra-som em processos fermentativos foram avaliados por Matsuura et al., (1994). Estes autores observaram aumento no crescimento celular de *S. cerevisiae* em fermentação alcoólica, quando aplicadas ondas ultra-sônicas de frequência 43kHz com intensidade de $30mWcm^{-2}$. Sugere-se que a

irradiação ultra-sônica também acelera a formação de etanol e outros componentes por diminuição do dióxido de carbono dissolvido.

Bucalon e Palma (1990) observaram aumento da atividade da fosfatase ácida e ATPase, como consequência da sonicação em suspensão de células de *S. cerevisiae*. A irradiação de células com frequência de 1,8mHz e intensidade de 200mWcm⁻² causou suave ativação dessas enzimas. Entretanto, grande ativação ocorreu quando foi aplicado numa frequência de 20kHz e intensidade de 10Wcm⁻² durante 15 minutos, sugerindo que a ativação foi causada por ionização e/ou alterações conformacionais dessas enzimas, provocadas pelo ultra-som.

Os efeitos do ultra-som na atividade de α -amilase e glucoamilase sobre o amido e/ou glicogênio, e de invertase de levedura de panificação sobre a sacarose foram avaliados por Barton, Bullock e Weir (1996). Observou-se aumento da atividade dessas enzimas e redução da inibição da invertase causada por altas concentrações de sacarose. Acredita-se que a aplicação do ultra-som pode levar à diminuição das formas inativas de substrato para invertase, considerando que podem ser quebradas as pontes de hidrogênio entre sacarose e a água, e também entre sacarose e sacarose. Sakakibara et al., (1996) também encontraram aumento na atividade de invertase de *Candida sp* com tratamento ultra-sônico, e efeitos inibitórios reduzidos em altas concentrações de sacarose. A enzima apresentou 15% de inativação em sonicação de 4 horas, quando a energia aplicada foi de $8,5 \times 10^3 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ao passo que perdas insignificantes ocorreram em intensidades menores. O aumento da atividade pelo ultra-som foi cerca de 30% da condição controle, em pH 4 e a 25°C.

O ultra-som também tem sido empregado para extração e liberação de enzimas intracelulares, como a invertase de *Aspergillus niger* (VARGAS et al., 2004), de *Phaffia rhodozyma* (PERSIKE et al., 2002), e de *S. cerevisiae* (BALASUNDARAM e PANDIT, 2001), assim como, a β -galactosidase de cepas de *Lactobacillus* (WANG e SAKAKIBARA, 1997) e glicose oxidase de *A. niger* (ISHIMORI; KARUBE; SUZUKY, 1982).

Vargas, Campos e Celligoi (2003) avaliaram o tempo de sonicação na liberação de invertase por *S. cerevisiae*. O ultra-som foi utilizado numa frequência de 20Khz, amplitude 40 e intensidade 0,62WmL⁻¹, por diferentes tempos. A

irradiação ultra-sônica promoveu aumento na liberação da invertase 3,45 vezes maior que no controle, sem rompimento celular até 5 minutos.

O processo ultra-sônico é utilizado para produção de glucose a partir do amido e também ativação da β -galactosidase na produção de iogurte com baixa concentração de lactose. Com o uso de ultra-som a concentração de lactose por ser reduzida a 70-74%, comparado com a redução de 30-51% quando o processo é realizado sem condições sonoquímicas (WANG et al., 1996; SINISTERRA, 1992).

Ishimori, Karube e Suzuky (1982) observaram que a glucose oxidase, foi liberada em cultivo contínuo de *Aspergillus sp*, sob ondas ultra-sônicas, as quais causaram vibração na parede celular do micélio. Os resultados obtidos mostraram que a maior produção de enzima extracelular ocorreu com irradiação ultra-sônica de 20kHz e potência de 15W, sem causar danos ao micélio. Já a 20W, a produtividade extracelular decresceu devido à inativação da glucose oxidase pelo forte efeito da cavitação.

Portanto, o uso de irradiações ultra-sônicas, utilizando-se parâmetros adequados, pode influenciar reações enzimáticas, possivelmente interferindo na formação e dissociação do complexo enzima-substrato, e proporcionar a liberação de quantidades significativas de enzimas em sua forma ativa, e assim constituir uma ferramenta de utilização para a melhoria de produção nos processos biotecnológicos.

3.4 FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

O cultivo contínuo é uma técnica de conhecida importância em estudos fisiológicos de microrganismos e mais recentemente como processo de produção em larga escala. Um sistema de cultivo contínuo é constituído de suspensão homogeneizada de células na qual o meio fresco é adicionado de maneira que o volume da cultura é mantido constante.

A característica essencial desta técnica é de que o crescimento microbiano ocorre sob o chamado estado estável, isto é, em velocidade constante e em ambiente igualmente constante. Sob tais condições, a velocidade de crescimento do microrganismo (μ) é exatamente igual à taxa de diluição (D). A taxa ou fator de

diluição (D) é a relação entre o fluxo do meio que está sendo adicionado no fermentador e o volume de trabalho, ou seja, o número de volumes do cultivo que passa pelo fermentador em função do tempo (h^{-1}) (PIRT, 1985).

As principais vantagens apresentadas pelo processo contínuo de fermentação, em relação ao descontínuo tradicional, são decorrentes da operação em estado estável, podendo-se destacar:

- aumento da produtividade do processo, em virtude de uma redução dos tempos mortos ou não-produtivos;
- obtenção de caldo fermentado uniforme, o que facilita o projeto das operações de recuperação do produto de interesse;
- manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou, ainda, para estudos de otimização da composição de meio de cultura;
- possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção;
- maior facilidade no emprego de controles avançados;
- menor necessidade de mão-de-obra (LIMA et al., 2001).

A metodologia de imobilização de *S. cerevisiae* em materiais celulósicos e em processos contínuos de fermentação tem sido descrita recentemente por diversos autores.

Kourkoutas et al., (2002a e 2002b) utilizaram pedaços de marmelo e maçã, respectivamente, para imobilizar *S. cerevisiae* em fermentação contínua para a produção de vinho. Szajáni et al., (1996) imobilizaram células de leveduras em esferas de celulose para a produção de etanol, tendo sacarose como substrato. Loukatos et al., (2003) utilizaram material celulósico deslignificado para a imobilização de células de levedura, para produção alcoólica de vinho.

3.5 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

Os sistemas com células imobilizadas têm como principal característica o uso de alguma estrutura física de confinamento e que obriga as células a permanecerem em uma região particular de um biorreator. Características de sistemas de células imobilizadas são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 – Características de sistemas de células imobilizadas:

Método de imobilização	Enredamento em matrizes Fixação em suporte sólido por adsorção ou ligação covalente Microencapsulação em membranas poliméricas Retenção mecânica em biorreator Imobilização sem suportes inertes (floculação de células)
Características Microbiológicas	Função e viabilidade celular Rendimento e taxa de crescimento celular Produtos metabólicos Parede celular e permeabilidade da membrana Necessidades respiratórias
Características químicas das matrizes	Composição química e métodos de síntese Grupos funcionais, tipo(s) de monômero(s) Possível toxicidade dos componente(s) da matriz na função e viabilidade celular
Características físicas das matrizes	Estabilidade de pH e temperatura Solubilidade em soluções aquosas contendo diferentes solutos e íons Porosidade que afeta a difusão do substrato e produtos Transferência de oxigênio dos sistemas aeróbios Geometria e tamanho da matriz Resistência mecânica da matriz Gravidade específica e velocidade de fluidização

Estabilidade do sistema célula-matriz	<p>Atividade e meia-vida na operação contínua</p> <p>Estabilidade operacional no sistema do bioreator</p> <p>Possível estabilização do sistema enzimático celular</p> <p>Preservação da estabilidade e atividade durante a armazenagem</p>
--	--

Fonte: MARGARITIS e MERCHANT ,1984.

Em muitos casos, as vantagens e limitações de um dado sistema reator dependem do método de imobilização e da configuração do reator utilizado. As principais vantagens dos sistemas com células imobilizadas citadas na literatura são as seguintes:

- possibilidade de utilização de altas concentrações celulares no volume reacional, implicando em maiores velocidades de processamento;
- operação de sistemas contínuos à vazão específica de alimentação próximos da velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{m\acute{a}x}$, característica da célula não imobilizada;
- eliminação de problemáticos recírculos externos de células através de uso de sedimentadores, filtros e centrífugas;
- o efeito combinado de uma alta densidade celular e operação em altas taxas de diluição reduzem o risco de contaminação;
- células imobilizadas são expostas a uma maior concentração de nutrientes resultando em um substancial aumento das velocidades de reação;
- processo contínuo com célula imobilizada são menos susceptíveis aos efeitos de compostos inibitórios e depleção de nutrientes;
- provável obtenção de maiores fatores de conversão de substrato ao produto desejado;
- possibilidade de utilização de projeto de biorreatores mais adequados à cinética do sistema biológico utilizado;

- maior proteção ao sistema biológico em relação ao estresse ambiental, ocasionado por elevadas concentrações de substratos, pH e cisalhamento (LIMA et al., 2001; MARGARITIS e MERCHANT, 1984).

Segundo Lima et al., (2001) e Margaritis e Merchant (1984), as principais características de um suporte para a imobilização de células vivas são as seguintes:

- não toxidez às células;
- alta capacidade de retenção;
- resistência ao ataque químico e microbiano;
- pouca sensibilidade às possíveis solicitações mecânicas, seja de compressão por peso, de tensões de cisalhamento ou eventuais pressões internas e externas de gases;
- alta difusividade de substratos e produtos.
- estável a mudanças de pH e temperatura;
- simplicidade e relativo baixo custo da técnica de imobilização;
- alta concentração de biomassa pode ser alcançada e mantida por extenso período de tempo.

3.5.1 Imobilização de células em materiais lignocelulósicos

Inúmeras técnicas de imobilização de células têm sido exploradas para vários processos fermentativos. Entretanto, estes métodos são freqüentemente caros e complexos. Um dos métodos extensivamente estudado é o enredamento de células em géis poliméricos como o alginato e a carragena. Contudo, estes métodos apresentam limitações de estabilidade, bem como sua limitação na transferência de massa dentro do gel. Além disto, a preparação do gel em larga escala para o

processo fermentativo industrial é difícil e requer um equipamento complexo e sofisticado, o qual aumentaria o custo de produção (OGBONNA et al., 1994).

Na procura de materiais eficientes e de baixo custo para imobilização, têm sido estudados diversos materiais lignocelulósicos: bagaço de cana-de-açúcar, lascas de madeira, cascas de arroz e palha (ROBLE; OGBONNA; TANAKA, 2003; DAS; GAIDHANI e MURARI, 1993; LAMPTEY e MOO-YOUNG, 1987; MICHAUX et al., 1982). De acordo com Roble, Ogbonna, Tanaka (2003), a maioria destes materiais, devido a suas estruturas singulares, apresentam baixa taxa de transferência de massa entre o meio e as células imobilizadas, além de exibir baixa capacidade de reter células.

Contudo, a bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é excelente suporte para imobilização de células, pois apresenta baixo custo, alta porosidade, resistência a autoclavação e variação de pH e temperatura, sendo material ideal a ser utilizado em países em desenvolvimento (Ogbonna et al., 1994; Roble et al., 2003). Estes autores demonstraram que a *Luffa cylindrica* é excelente suporte em comparação com outros suportes para imobilização, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Características da bucha vegetal comparada com outros suportes:

<i>Propriedades físicas</i>	Forma	Densidade (g/cm³)	Porosidade (%)	Volume específico do poro (cm³/g)
Luffa	cilíndrica	0,02-0,04	79-93	21-29
Cerâmica	Part. irregulares	0,5	70	1,4
Aço inox	esférica	7,7	80	0,13
Espuma Poliéster	cúbica	1,1	97	7,27

Fonte: OGBONNA et al., 1994.

A *Luffa cylindrica* cresce bem em climas tropicais e subtropicais e são produzidas em grandes quantidades na maioria dos países da África e Ásia e América do Sul, onde são usualmente utilizadas em banhos e na lavagem de louças

(OGBONNA et al., 1994). A bucha vegetal é obtida do fruto seco maduro da *Luffa cylindrica* (IQBAL e ZAFAR, 1993).

Ogbonna, Tomiyama e Tanaka (1996) desenvolveram um método para imobilização de células não-floculantes em *Luffa cylindrica*, em cultivo de batelada, com adição de quitosana para induzir a floculação. A retenção de células no suporte foi alta, pois a quantidade de células presentes no sobrenadante foi menor que $0,1 \text{ gL}^{-1}$, durante toda a fermentação.

Ogbonna et al., (1997) testaram a eficiência na produção de etanol por células de leveduras imobilizadas em *Luffa cylindrica*, mas ao contrário de trabalhos anteriores, utilizaram bucha vegetal cortada em pedaços e não mais inteira. *Luffa cylindrica* cortada em pedaços resultou em duas e quatro vezes maiores, a quantidade de células imobilizadas floculantes e não-floculantes por unidade de bucha vegetal, respectivamente. Conseqüentemente, foram obtidas produtividades maiores de etanol quando utilizaram *Luffa cylindrica* cortada em pedaços. No caso das células floculantes de *S. cerevisiae*, a produtividade foi 66% maior do que a obtida com a *Luffa cylindrica* inteira.

Roble, Ogbonna e Tanaka (2003) testaram um novo modelo de bioreator de operação simultânea de processos aeróbios e anaeróbios, com células imobilizadas em *Luffa cylindrica* para a bioconversão do amido de mandioca a etanol. *Aspergillus* sp foi utilizado para a sacarificação do amido, enquanto que, *S. cerevisiae*, para fermentação. Quatro métodos de imobilização foram investigados e em três deles, a bucha vegetal mostrou ser boa matriz para imobilização de *Aspergillus* sp.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismo

Cepa industrial etanológica de *Saccharomyces cerevisiae* gentilmente cedida pela Usina de Açúcar e Álcool da COROL (Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda.) –PR.

4.1.2 Meios de cultura

4.1.2.1 Meio de Manutenção

Meio sólido completo:

Sacarose.....	5g
Extrato de levedura.....	0,4g
Peptona.....	0,4g
KH ₂ PO ₄	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,01g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,15g
Ágar.....	1,5g
H ₂ O destilada q.s.p.....	100mL

O meio foi ajustado a pH 6,5 e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

4.1.2.2 Meio de Fermentação

Meio líquido de imobilização e fermentação:

Sacarose.....	5g
Extrato de levedura.....	0,4g
Peptona.....	0,4g
KH ₂ PO ₄	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,01g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,15g
H ₂ O destilada q.s.p.....	100mL

O meio foi ajustado a pH 5,5 e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

4.1.3 Fermentador contínuo

A fermentação contínua foi realizada em um frasco fermentador (FIGURA 1) com capacidade de 1,2L e 0,6L de volume de trabalho; com as seguintes características: diâmetro de 10cm, altura de 15cm e saída lateral de 1,5cm de diâmetro localizada na altura de 8cm da base. A tampa do fermentador dispõe de dispositivos de entrada para: sonda ultra-sônica, alimentação do sistema e aquecimento. O sistema era alimentado continuamente com meio de cultura (4.1.2.2) armazenado em um reservatório de capacidade 20L.

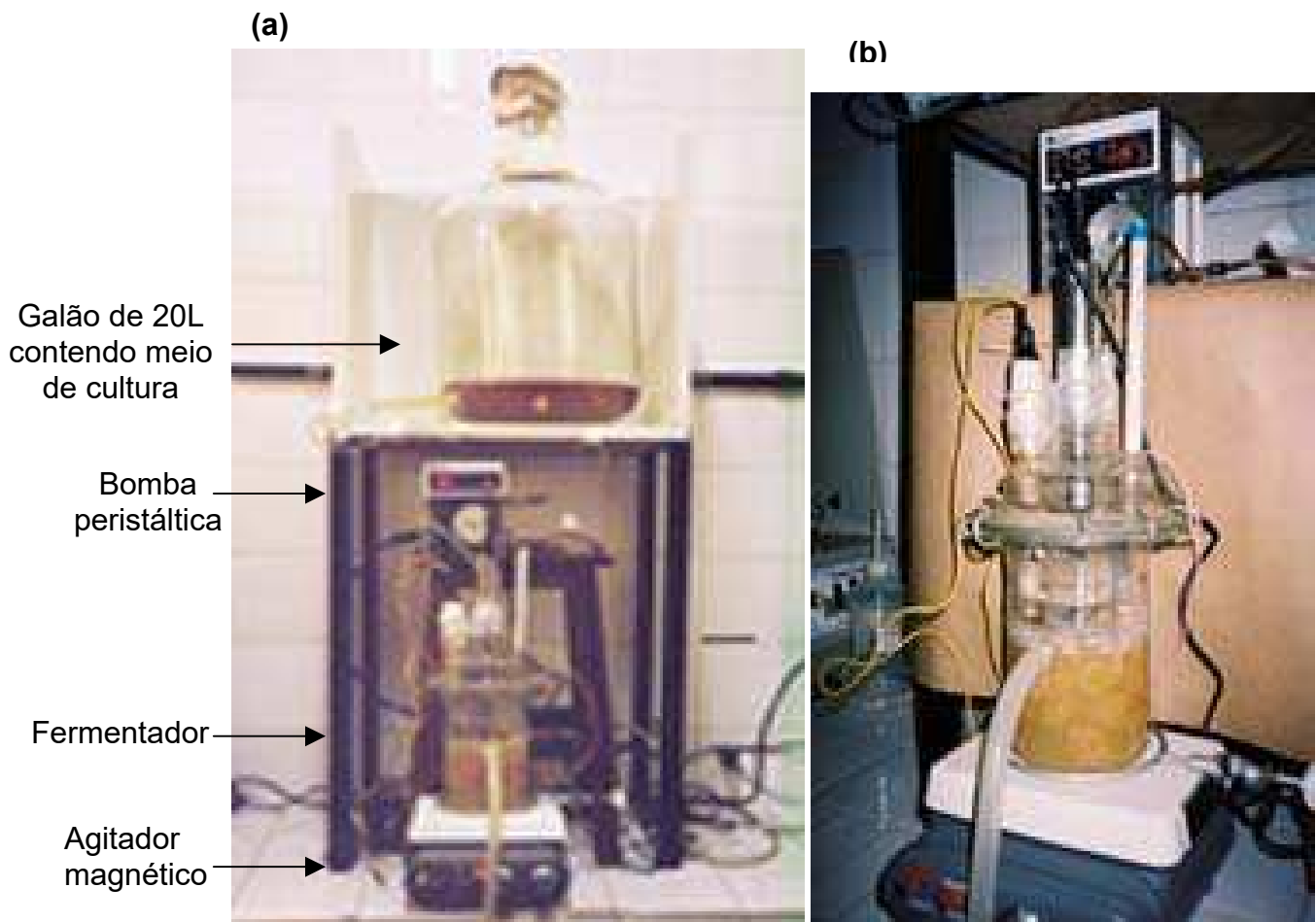


Figura 1 – (a) Sistema de fermentação contínua; (b) Detalhe do fermentador contendo células de *S. cerevisiae* imobilizadas em bucha vegetal.

4.1.4 Equipamento de ultra-som

Foi utilizado o equipamento gerador de ondas ultra-sônicas de marca Ultrasonic Processor 20 kHz, modelo GE 130 PB/70 W, equipado com guia de onda tipo sonda, de 9,5 mm de diâmetro, modo contínuo.

4.1.5 *Luffa cylindrica*

O suporte utilizado para imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* foi bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), comercializada por OBARA – Ind. e Com. de Alimentos Ltda., Londrina – PR. Safra de 2002, adquirida em supermercado local.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação do microrganismo

A levedura *S. cerevisiae* foi preservada em meio sólido descrito no item 4.1.2.1, em placas de Petri. A renovação das culturas foi feita a cada 45 dias, sendo guardadas em câmara fria a 4 °C.

4.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir da transferência de diversas alçadas de células, do meio sólido descrito no item 4.1.2.1, para frascos de erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL do meio, descrito no item 4.1.2.2. Estes frascos eram incubados em shaker, com agitação de 180 rpm a 30°C por 12 horas. Decorrido este tempo, 6 alíquotas de 5 mL da cada frasco eram transferidas para outro frasco contendo 30 ml de meio estéril e homogeneizado. O volume final de 60 mL era transferido para o fermentador.

4.2.3 Condições de cultivo

O cultivo foi realizado em fermentador com agitação branda e controle de temperatura em $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. As fermentações foram conduzidas em batelada por 5 horas, antes do início da alimentação contínua. Os valores de taxas de diluição ensaiadas para células livres e imobilizadas foram: 0,12; 0,21; 0,33; $0,46\text{h}^{-1}$ e 0,10; 0,14; 0,29; $0,46\text{h}^{-1}$, respectivamente.

4.2.4 Determinação do $\mu_{\text{máx}}$

O cálculo do $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade específica de crescimento) do microrganismo foi realizado pelo método da lavagem em fermentação contínua. Neste método, o valor da taxa de diluição é ajustado em valor maior que o valor crítico (D_c) promovendo a lavagem deste microrganismo. O cálculo do $\mu_{\text{máx}}$ é realizado a partir da inclinação da reta do gráfico $\ln X/X_i$ (onde X é a biomassa final e X_i é a biomassa inicial) pelo tempo, que pode ser colocada na seguinte fórmula: $\mu_{\text{máx}} = 1 - \text{inclinação da reta}$ (PIRT, 1985).

4.2.5 Imobilização

Para ser utilizada como suporte, 7g de bucha vegetal foi recortada em pedaços de aproximadamente 4cm x 4cm x 0,5 cm e acondicionada no fermentador já contendo o meio de cultura. Em seguida, este sistema foi autoclavado e preparado para receber o inóculo. A biomassa total foi calculada somando-se a quantidade de células suspensas e as células aderidas ao suporte.

4.2.6 Fermentação

Após a adição de 10% (v/v) do inóculo no fermentador contendo 540mL de meio de cultivo, seguia-se um período de adaptação do microrganismo de aproximadamente 5 horas. Em seguida, iniciava-se a fermentação contínua pelo bombeamento de meio novo em valor de taxa de diluição estabelecido e aguardava-se até que a cultura atingisse o estado estável (valores de biomassa, açúcares e proteínas constantes). Durante o estado estável procedia-se a coleta de amostras para determinações de açúcares redutores e totais, biomassa, atividade invertásica, proteínas totais e teor alcoólico.

4.2.7 Coleta de amostras

Amostras de 20mL foram coletadas do caldo fermentado para realização das análises. Era usada alíquota de 5mL para a determinação de biomassa, o restante era centrifugado a 5600g por 10min, e o sobrenadante usado para as determinações de atividade enzimática, proteínas totais, etanol e açúcares redutores e totais.

4.2.8 Determinação da atividade invertásica

A atividade de invertase foi determinada pela liberação de glucose e frutose a partir de sacarose após a mistura da enzima com solução de sacarose termostaticada. Misturavam-se 1,0mL do sobrenadante da cultura o qual continha a invertase e 1,0mL de sacarose 0,3M em tampão acetato pH 4,7 e incubava-se a 37 °C. Decorridos 20 minutos, interrompia-se a reação, quando transferia-se 1,0mL para tubo contendo 1,0mL de 3,5 dinitrosalicilato. Procedia-se à fervura por 5 minutos. Os produtos foram dosados fotolorimetricamente a 540nm (MILLER,

1959). A amostra correspondente ao tempo zero de ação da enzima era utilizada como branco.

Uma unidade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que libera $1\mu\text{mol}$ de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

A atividade específica é expressa em unidades de atividade enzimática por mg de proteína extracelular.

4.2.9 Determinação de açúcares redutores e totais

Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959), enquanto os açúcares totais pelo método do Fenol Sulfúrico (DUBOI; GILLES; HAMILTON, 1956).

A curva padrão foi confeccionada com glicose variando de 0,2 a 1,0mg/mL para açúcares redutores e de 20 a 100gmL^{-1} para açúcares totais. As leituras de absorvâncias foram efetuadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm e 490nm, respectivamente.

4.2.10 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Hartree (1972). A curva padrão foi confeccionada utilizando albumina bovina variando de 20 a $100\mu\text{gmL}^{-1}$. As leituras de absorvâncias foram efetuadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650nm.

4.2.11 Pulso de rafinose

A cultura livre na fase estável foi submetida ao pulso de solução de rafinose a 2% nas taxas de diluição 0,12 e 0,46h⁻¹ enquanto que na cultura imobilizada, na taxa de diluição 0,10h⁻¹.

4.2.12 Tratamento com ultra-som

O tratamento ultra-sônico foi aplicado na cultura no decorrer da fase estável em fermentação contínua, tanto em células livres como em células imobilizadas. A sonda de 9,5mm de diâmetro foi introduzida na cultura presente no fermentador, numa profundidade de 2,5cm. A cultura de células livres foi irradiada por 2 minutos, numa amplitude 20, potência de 25W e frequência de 20kHz em duas taxas de diluição diferentes: 0,12 e 0,46h⁻¹. A cultura de células imobilizadas em bucha vegetal foi irradiada nos tempos de 1, 2 e 4 minutos, numa amplitude de 20, frequência de 20kHz, potência de 33W, em taxa de diluição 0,10h⁻¹.

4.2.13 Dosagem da produção de etanol

As amostras foram analisadas através do método colorimétrico do dicromato descrito por Kaye e Haag (1954), para determinação da concentração de etanol.

4.2.14 Determinação de biomassa

A determinação de biomassa foi medida em alíquota adequadamente diluída e a leitura efetuada em espectrofotômetro Femto 600Plus a 610nm. Esta leitura foi comparada com a curva de biomassa desta cepa em g/L.

4.2.15 Determinação de pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico de acordo com as Normas Analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985) em pHmetro HANNA Instruments HI9321.

4.2.16 Viabilidade

A viabilidade da cultura foi realizada com solução de azul de metileno (THOMAS; INGLEDEW, 1990) e posterior contagem de células em câmara de Neubauer.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados no artigo 1, o qual foi elaborado de acordo com as normas da revista World Journal of Microbiology & Biotechnology. Os demais resultados estão descritos a seguir.

5.1 DETERMINAÇÃO DO $\mu_{MÁX}$

O método de lavagem para cálculo do $\mu_{máx}$ foi feito de acordo com Pirt (1985). Para a determinação do $\mu_{máx}$, a cultura contínua foi conduzida em taxa de diluição $0,5 \text{ h}^{-1}$, até a biomassa atingir valor constante. Então, a cultura foi ajustada para taxa de diluição de valor de $1,0 \text{ h}^{-1}$, isto é, um fluxo de 600 mL h^{-1} , para que ocorresse a lavagem. Aplicando-se o valor da inclinação da reta mostrada na figura 1 na fórmula $\mu_{máx} = 1 - \text{inclinação da reta}$, obtém-se: $\mu_{máx} = 0,5503$.

Tabela 3 - Cálculo do $\mu_{máx}$ pelo método de lavagem

Biomassa ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (horas)	X/Xi	ln(X/Xi)
646,0	1,00	1,000	0,000
567,5	1,25	0,878	-0,130
517,0	1,50	0,800	-0,223
460,0	1,75	0,712	-0,340
409,5	2,00	0,634	-0,456
374,1	2,25	0,579	-0,546
338,6	2,50	0,524	-0,646
292,4	2,75	0,453	-0,792
261,2	3,00	0,404	-0,906
231,3	3,25	0,358	-1,027
209,6	3,50	0,324	-1,127

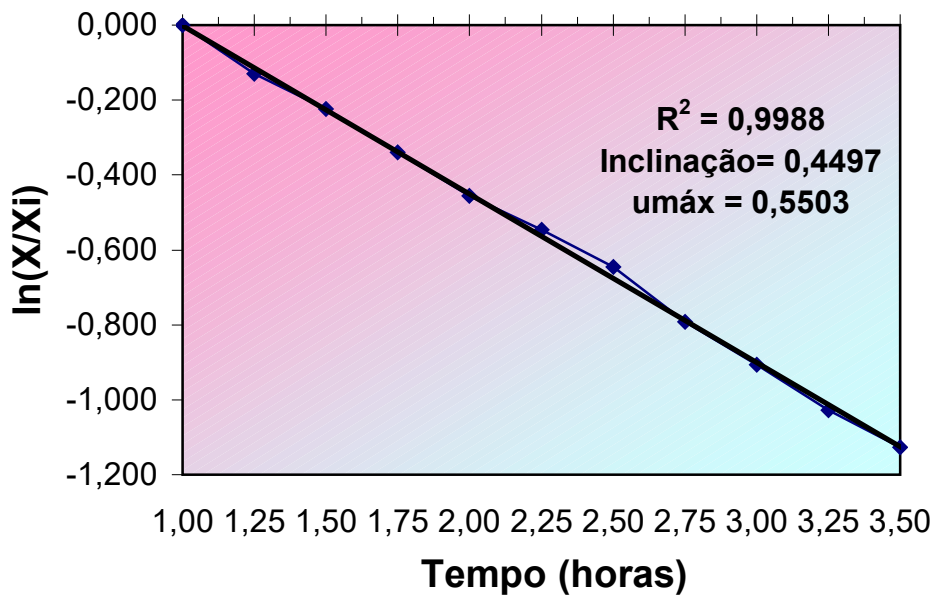


Figura 2 - Método dinâmico de determinação de $\mu_{\text{máx}}$

A determinação do $\mu_{\text{máx}}$, característico de cada microrganismo, foi importante para a escolha das taxas de diluições que seriam testadas. Sabendo-se que na fase estável, a taxa de diluição é igual ao $\mu_{\text{máx}}$, um valor de taxa de diluição acima de $0,5503 \text{ h}^{-1}$ provocaria a lavagem do microrganismo. Portanto, as taxas de diluições testadas neste trabalho foram inferiores a este valor.

5.2 FERMENTAÇÃO CONTÍNUA COM CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS

Com a realização das fermentações representadas nas figuras 3 e 4 investigou-se o comportamento da levedura livre e imobilizada, respectivamente, em quatro taxas de diluição.

Em células livres (FIGURA 3), a produção de etanol em baixas taxas de diluição ($0,12$ e $0,21 \text{ h}^{-1}$) mostrou-se elevada: $24,24$ e $21,76 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que, em altas taxas de diluição ($0,33$ e $0,46 \text{ h}^{-1}$) foram $8,05$ e $3,44 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, os valores de eficiência de conversão foram elevados, acima de 90% em todas as taxas de diluição testadas.

Os valores de produtividade de etanol foram: 1,74; 2,74; 1,59 e 0,95 $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, nas taxas de diluição 0,12; 0,21; 0,33 e 0,46 h^{-1} , respectivamente.

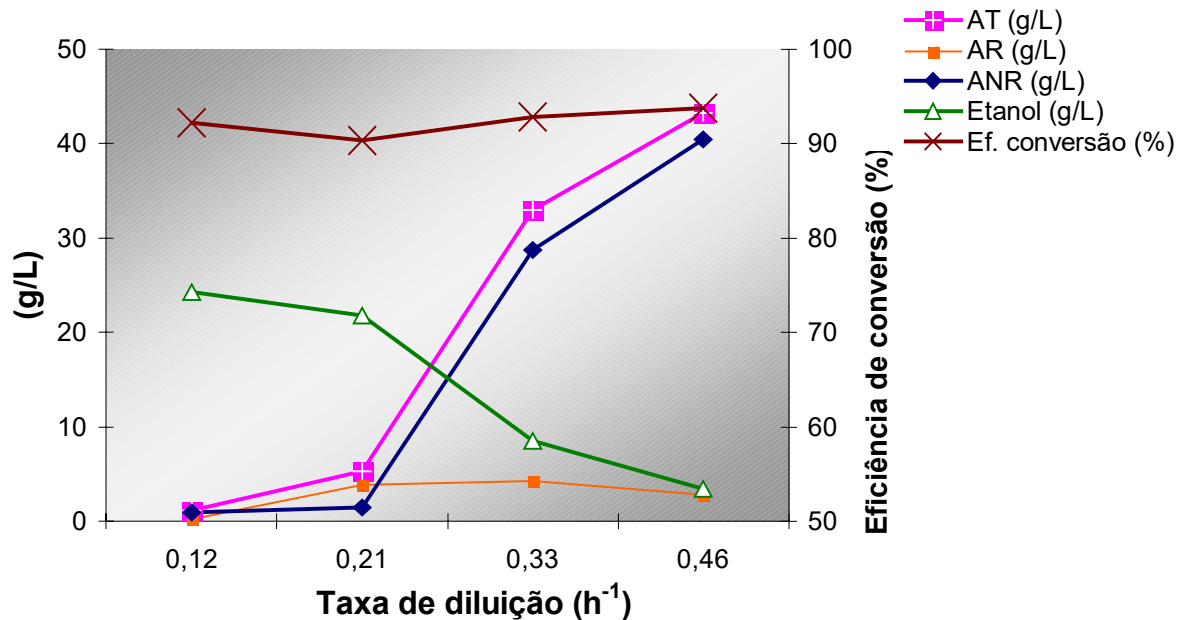


Figura 3 - Fermentação contínua de células livres de *S. cerevisiae* em diferentes taxas de diluição. AT (açúcares totais); AR (açúcares redutores); ANR (açúcar não redutores).

Zhao; Lin (2003) utilizaram glicose nas concentrações de 10; 100; 200 e 300gL^{-1} , em processo contínuo na taxa de diluição $0,12\text{h}^{-1}$, para a produção de etanol por células livres de *S. cerevisiae*. Os valores da concentração de etanol obtidos por estes autores, nas duas primeiras concentrações de glicose utilizadas, foram inferiores aos obtidos neste trabalho, quando são comparados os resultados da mesma taxa de diluição. Estes autores obtiveram concentração de etanol e eficiência de conversão de substrato a produto de 3,7; $14,2\text{gL}^{-1}$ e 73; 28%, respectivamente, enquanto que a glicose residual foi de 0,52; $36,28\text{gL}^{-1}$.

Bayrock; Ingledew (2001) utilizaram sistema constituído de 5 reatores funcionando em seqüência e células livres de *S. cerevisiae* para fermentar glicose em diferentes concentrações. Estes autores obtiveram $27,7\text{gL}^{-1}$ de etanol, utilizando 152gL^{-1} glicose a uma taxa de diluição de $0,34\text{h}^{-1}$. Entretanto, o coeficiente de conversão foi de apenas 36%. Estes autores alcançaram concentração de etanol de 132gL^{-1} e eficiência de conversão de 83%, quando a glicose foi utilizada na

concentração de 310gL^{-1} . Entretanto, estes valores correspondem ao último reator da seqüência que estava a uma taxa de diluição $0,05\text{h}^{-1}$.

A imobilização de células de *S. cerevisiae* em materiais ricos em celulose tem sido pouco estudada. Lamptey; Moo-Young (1987) utilizaram lascas de madeira e Michaux et al., (1982) usaram pó de serra adicionado de gelatina. Mais recentemente, a bucha vegetal foi utilizada como suporte para imobilização. Iqbal; Zafer (1994) foram pioneiros na imobilização de fungos, leveduras e bactérias em *Luffa cylindrica*. Ogbonna et al., (1994) obtiveram um valor de 4,4g de células de *S. cerevisiae* por grama de bucha vegetal. Roble et al., (2003) investigaram vários métodos de imobilização de *S. cerevisiae* em bucha vegetal. O melhor resultado obtido foi de 4,65g de células por grama de suporte.

No presente estudo obteve-se 5,5g de células por grama de suporte, o que corresponde à biomassa total de 41,0g no bioreator, na taxa de diluição de $0,10\text{h}^{-1}$. Enquanto que, no cultivo de células livres, o valor da biomassa total foi de 6,9g no bioreator, na taxa de diluição $0,12\text{h}^{-1}$.

Nas duas menores taxas de diluição testadas, a concentração de etanol no cultivo de células imobilizadas foi inferior, quando comparada com o cultivo de células livres. Nas duas maiores taxas de diluição, a concentração de etanol também foi inferior em relação às taxas de diluição menores, mas são valores similares entre si. Os valores da concentração de etanol encontrados foram: 16,84; 15,68; 7,84 e $3,19\text{gL}^{-1}$, nas seguintes taxas de diluição: 0,10; 0,14; 0,29 e $0,46\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os valores da eficiência de conversão variaram de 67,1 a 74,2% (FIGURA 4). Os valores de produtividade de etanol foram: 0,97; 1,27; 1,31 e $0,84\text{gL}^{-1}$, nas taxas de diluição 0,10; 0,14; 0,29 e $0,46\text{h}^{-1}$, respectivamente.

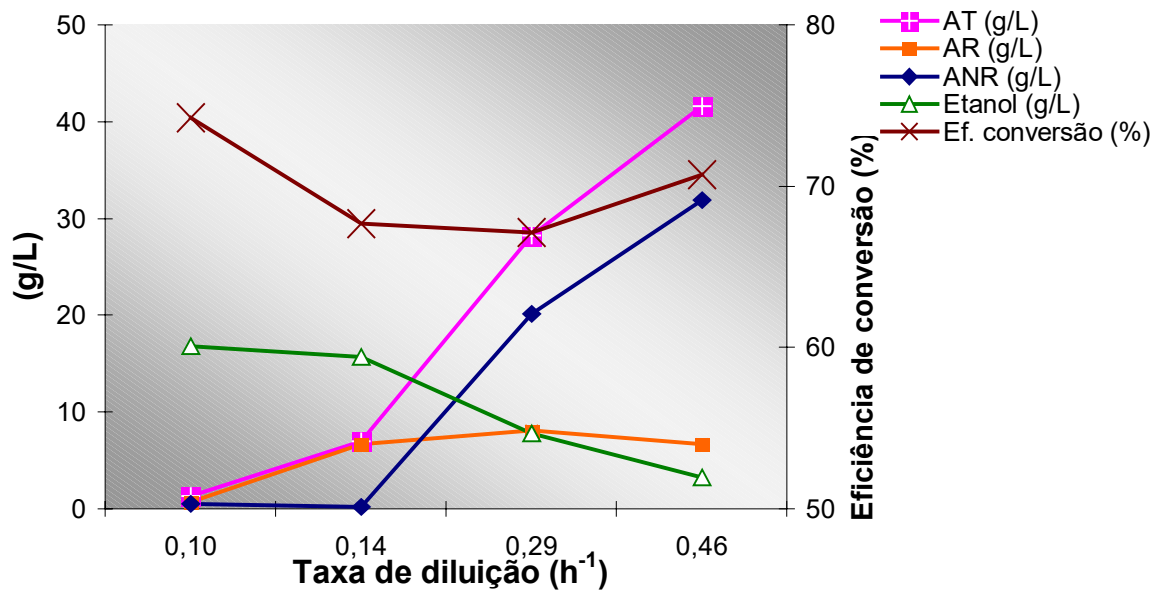


Figura 4 - Fermentação contínua de células imobilizadas de *S. cerevisiae* em diferentes taxas de diluição. AT (açúcares totais); AR (açúcares redutores); ANR (açúcar não redutores).

Ogbonna et al., (1994) imobilizaram *S. cerevisiae* IR2 em *Luffa cylindrica*, na fermentação de sacarose e em taxa de diluição $0,07\text{h}^{-1}$. Os resultados obtidos por estes autores foram superiores aos deste trabalho. A concentração de etanol e a produtividade foi de 70g/L^{-1} e $9,8\text{g/L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, estes autores utilizaram reator com volume de trabalho de 2L e concentração de sacarose de 195g/L^{-1} , obtendo eficiência de conversão de sacarose a etanol de 67%.

Mais recentemente, Ogbonna et al., (1997) utilizaram *Luffa cylindrica* para imobilização da mesma linhagem, na fermentação de glucose a 180g/L^{-1} , para a produção de etanol. A fermentação foi conduzida por mais de 600 horas em fermentador com volume de trabalho de 1,5L. Durante o estado estável, a produção de etanol foi $70,8\text{g/L}^{-1}$, com eficiência de conversão de 77% e produtividade de $6,48\text{g/L}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Segundo Parascandola et al., (1993) algumas modificações fisiológicas podem ocorrer quando a levedura *S. cerevisiae* é imobilizada. A cepa utilizada no presente estudo apresenta grande propensão a flocular, possibilitando a imobilização de altos valores de biomassa. Como consequência, ocorreu a formação de camadas estratificadas de células, o que provavelmente dificultou o acesso de

nutrientes àquelas células do interior da biomassa imobilizada, tendo como resultado a diminuição dos valores de produção etanólica.

Neste trabalho a bucha vegetal mostrou ser excelente suporte para imobilização de células de *S. cerevisiae* e embora outros autores (Loukatos et al 2003; Kourkoutas et al 2002; Roble et al. 2003) sugiram vantagens na utilização de células imobilizadas em suportes variados, os resultados deste trabalho indicam que a produção de etanol foi prejudicada.

5.3 ARTIGO 1:

**EFFECT OF RAFFINOSE AND ULTRASOUND PULSES ON INVERTASE RELEASE BY
FREE AND IMMOBILIZED *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN LOOFA (*LUFFA
CYLINDRICA*) SPONGE**

Running head:

Raffinose and ultrasound pulses on invertase release by *Saccharomyces cerevisiae*.

Title:

Effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge

Authors:

L. L. M. Marques¹, J. B. Buzato^{1*}, L. H. M. Vargas¹, M. A. P. C. Celligoi¹

Affiliation:

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE, Universidade Estadual de Londrina/UEL, Londrina, PR, Brasil.

Correspondence:

. *Author for correspondence:

Universidade Estadual de Londrina

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

Caixa postal 6001

CEP 86.051-990; Londrina – Paraná, Brasil.

Tel.: +55-43-3371-4270. Fax: +55-43-3371-4216. E-mail:buzato@uel.br

Effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge

Summary

The enzyme invertase is of great interest to industry because it catalyzes the sucrose hydrolysis reaction producing invert sugar. The use of raffinose and ultrasound irradiation can release large amounts of enzymes in their active form and thus it is a tool to improve biotechnological processes. *Luffa cylindrica* is an excellent support to immobilize microbial cells, showing advantages such as low cost and resistance to autoclaving. This study investigated the effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release from free *S. cerevisiae* and *S. cerevisiae* immobilized in *Luffa cylindrica*. The free cell culture was submitted to 2% raffinose pulse and irradiated for 2 minutes at dilution rates of 0.12 and 0.46 h⁻¹. The immobilized cell culture was submitted to raffinose pulse and irradiated for 1, 2 and 4 minutes, at 0.10 h⁻¹ dilution rate. In free cells, the raffinose pulse did not alter the invertase activity but in immobilized cells, the value of the activity increased from 5.38 to 7.27 U/mg. Ultrasound application in free cell culture at the 0.12 h⁻¹ dilution rate gave the best results. The activity varied from 25.08 to 29.38 U/mg while the increase in immobilized cells was from 5.22 to 9.70 U/mg when sonicated for 2 minutes. These results showed that ultrasound application in continuous culture may have great potential for application in biotechnological techniques.

Keywords: immobilization, invertase, *Luffa cylindrica*, raffinose, *Saccharomyces cerevisiae*, ultrasound

Introduction

The enzyme invertase (β -D-fructofuranoside fructohydrolase, E.C. 3.2.1.26) that catalyses the sucrose hydrolysis reaction is of great industrial interest because it is used to produce syrup from sucrose and molasses which is important in the food industry. More recently this enzyme has been used as a sensor for continuous sucrose determination (Balasundaram & Pandit 2001). Different methodologies have been proposed to increase enzyme release in the culture medium. The use of enzymatic inducers such as raffinose has given positive results in invertase release (Parascandola *et al.* 1993; Özcan *et al.* 1997; Brandão *et al.* 2002). Ultrasound has been used to extract and release intracellular enzymes such as invertase from *S. cerevisiae* (Balasundaram & Pandit 2001), *Phaffia rhodozyma* (Persike *et al.* 2002), *Aspergillus niger* (Vargas *et al.* 2004) and acid phosphatase and ATPase from *S. cerevisiae* (Bucalon & Palma 1990) and β -galactosidase from *Lactobacillus* (Wang & Sakakibara 1997). In microbial cell cultures, high intensity ultrasound application ruptured cell walls, but low intensity ultrasound increased growth, promoted enzyme release, enhanced productivity in biological processes and thus is a tool for improving biotechnological processes (Matsuura *et al.* 1994; Chisty 2003).

Cell immobilization has some advantages when compared with free cell culture. The reaction speed can be accelerated and a high dilution rate can be used in continuous fermentation without causing cell washing and it is less susceptible to the effect of inhibitory compounds and nutrient depletion (Lima *et al.* 2001). Many immobilization techniques for *Saccharomyces cerevisiae* have been explored in several fermentation processes (Nigam 2000; Navratil *et al.* 2001; Farid *et al.* 2002; Cibis *et al.* 2002; Rossi & Rocha 2003; Yuengang *et al.* 2003). However, these methods frequently present limitations in stability, mass transfer inside the support and difficulty in their large scale preparation. They also require complex and sophisticated equipment that would increase production costs. Immobilization in lignocellulosic materials such as sugar cane bagasse, wood shavings, rice husks and straw also presents restrictions (Ogbonna *et al.* 1997). However, the loofa (*Luffa*

cyindrica) sponge is an excellent support for cell immobilization because it is cheap, highly porous and resistant to autoclaving, pH variation and temperature, and is an ideal material for use in developing countries (Ogbonna *et al.* 1994; Roble *et al.* 2003). This study investigated the effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release from *Saccharomyces cerevisiae* cells in continuous culture, both free and immobilized in *Luffa cylindrica*.

Material and Methods

Microorganism and culture medium

The industrial ethanol forming yeast from *Saccharomyces cerevisiae* used in this study was donated by the COROL Sugar and Alcohol Refinery (Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda-PR). It was maintained in solid medium whose composition (in gL⁻¹) was sucrose, 50; yeast extract, 4; peptone, 4; KH₂PO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0.1; CaCl₂·2H₂O, 0.1; (NH₄)₂SO₄ and 1.5; agar, 15.

The composition of the fermentation liquid medium was the same, but without the agar. The fermentation medium was adjusted to pH 5.5 and autoclaved at 121°C for 20 minutes before use.

Experimental apparatus

Continuous fermentation was carried out in a fermenter with 1.2L capacity and 0.6L working volume, with fixtures for ultrasound probe entry, feed and heating. The culture was fed continually with fresh culture medium stored in a 20L reservoir. An Ultrasonic Processor 20 kHz, model GE 130 PB/70 W, from Sonics and Materials, was used equipped with a probe-type 9.5mm diameter, continuous mode wave guide.

Immobilization

Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge was used as the support to immobilize *S. cerevisiae* cells. For use as support, the loofa sponge was cut up into 4cm x 4cm pieces and placed in the fermenter that already contained culture medium. Shortly afterwards, the system was autoclaved and prepared to receive the inoculum.

Culture conditions and pulses

After adding 10% (v/v) inoculum in the fermenter, before starting continuous feeding, a batch fermentation was conducted for five hours under gentle agitation and temperature controlled at $30^{\circ}\text{C}\pm 1$. The fermentation was performed at the following dilution rates: 0.12; 0.21; 0.33; 0.46 h^{-1} for free cells and 0.10; 0.14; 0.29; 0.46 h^{-1} for immobilized cells. The raffinose and ultrasound pulses were applied to the culture during the steady state of continuous fermentation. The raffinose pulse was carried by the addition of 20ml of 2%(w/v) raffinose solution at the 0.12 and 0.46 h^{-1} dilution rates and at the 0.10 h^{-1} dilution rate in the immobilized culture.

In the ultrasound pulse, the probe was immersed 2.5cm in the culture. The culture was irradiated at a frequency of 20 kHz and amplitude 20. In free cells, the culture was sonicated for 2 minutes at a power input of 25 W, at the 0.12 and 0.46 h^{-1} dilution rates, while in the immobilized cells, at times of 1, 2 and 4 minutes, at a power input of 33 W at 0.10 h^{-1} dilution rate.

Assays

The samples removed from the fermented syrup were centrifuged at 5583g for 10 minutes and the supernatant used in the determinations.

The invertase activity was determined by incubation at 37°C of a mixture of 1 ml sucrose solution 0.3M, 3 ml acetate buffer, pH 4.7 and 1 ml culture supernatant that contained invertase. The samples were collected after 20 minutes and the reducing sugars released were determined using the dinitrosalicylic acid method (Miller 1959). One unit of

enzymatic activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of reducing sugar per minute in assay conditions. The specific activity was expressed in enzymatic activity units per mg extracellular protein. The protein concentration was determined by the Hartree method (1972) using bovine albumin as standard.

Sucrose hydrolysis was estimated by the difference between total sugar (Duboi *et al.* 1956) and reducing sugar.

Viability test

The culture viability was assessed microscopically with the aid of methylene blue (Thomas & Ingledew 1990) and cell counting in Newbauer chamber.

Results and Discussion

Immobilization

S. cerevisiae cell immobilization in cellulose-rich materials has been little studied. Lamptey & Moo-Young (1987) used wood shavings and obtained values of 66.7 and 188.0 mg cells/ g support. Michaux *et al.* (1982) used sawdust added to gelatin and obtained immobilization values ranging from 94.2 to 145 mg cells/ g support .

More recently, loofa sponge has been used as support for immobilization. Iqbal & Zafer (1994) were pioneers in fungus, yeast and bacteria immobilization in *Luffa cylindrica*. Ogbonna *et al.* (1994) obtained a value of 4.4g *S. cerevisiae* cells /g of loofa sponge. Roble *et al.* (2003) assessed various cell immobilization methods in this support. The best result was 4.65g *S. cerevisiae*/ g support. In the present study, at a dilution rate of $0,10\text{h}^{-1}$, a high concentration of immobilized cells was ascertained: 5.5g cells per gram of support. This result confirms loofa sponge as an excellent support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization.

Invertase production

Table 1 shows invertase production and sucrose hydrolysis in continuous fermentation by free *S. cerevisiae* cells and *S. cerevisiae* cells immobilized in loofa sponge.

Table 1- Invertase production and sucrose hydrolysis, in continuous *Saccharomyces cerevisiae* cell culture, at different dilution rates.

Free cells			Immobilized cells		
Dilution rate (h ⁻¹)	Specific Activity (U/mg prot)	Sucrose hydrolysis (%)	Dilution rate (h ⁻¹)	Specific Activity (U/mg prot)	Sucrose hydrolysis (%)
0.12	23.69	98	0.10	5.38	99
0.21	5.04	97	0.14	1.88	99
0.33	0.22	43	0.29	0.87	58
0.46	0.20	19	0.46	0.41	30

The highest values of enzymatic activity were detected at low dilution rates, in both in free and immobilized cells, however, the enzymatic activity values ranged greatly. **O cultivo de células livres, em baixas taxas de diluição, atingiu os melhores valores de atividade invertásica, em comparação com o cultivo com células imobilizadas.** Parascandola *et al.* (1993) assessed invertase activity in continuous *S. cerevisiae* culture in gelatin and the extracellular enzymatic activity values were lower than those reported in this study.

Invertase activity, in continuous culture of *S. cerevisiae* cells free and immobilized in gelatin was assessed by Parascandola *et al.* (1993). These authors found extracellular enzymatic activity values lower than in the present study.

The low enzymatic activity values found in immobilized cells were probably because of the large quantity of biomass immobilized in the support, due to the excellent property of the loofa sponge as support for immobilization and the strain used presents great readiness for flocculation. Consequently, stratified layers of cells formed that probably hindered the release of invertase from the interior of the immobilized biomass.

This study also assessed the hydrolysis of the sucrose present in the culture medium. The hydrolysis was practically total, over 97% at low dilution rates in both free and immobilized cells. However, the hydrolysis values obtained were not satisfactory at the two higher dilution rates tested. Chang *et al.* (1996) assessed sucrose hydrolysis in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in alginate capsules. The host strain used was *S. cerevisiae* SEY 2102 containing plasmid pRB58 with the SUC2 gene encoding invertase. Sucrose hydrolysis was maintained at 95% at dilution rates of 0.1 to 0.6 h⁻¹.

Raffinose pulse

Table 2 shows the results of raffinose pulse in free cells. The raffinose pulse was conducted at dilution rates of 0.12 and 0.46 h⁻¹. The results presented little variation in the enzymatic activity. At a dilution rate of 0.12 h⁻¹ it was 23.72 U/mg⁻¹ while at a dilution rate of 0.46 h⁻¹ it was less than 0.3 U/mg⁻¹. Parascandola *et al.* (1993) investigated the effect of raffinose as carbon source in invertase production in large scale culture of free *S. cerevisiae* cells. These authors obtained an increase from 7 to 13 U/mg⁻¹ in specific invertase activity during the exponential phase. Brandão *et al.* (2002) investigated invertase activity under repressive and non-repressive growth conditions. For this, the *S. cerevisiae* cells were grown on different carbon sources: glucose, fructose, galactose and raffinose. The highest invertase activity value was obtained when raffinose was used as carbon source.

Table2 – Effects of ultrasound and raffinose pulses on invertase activity in continuous culture with free *Saccharomyces cerevisiae* cells.

	Dilution rate (h ⁻¹)	Ultrasound pulse		Raffinose pulse	
		Invertase Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg)	Invertase Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg)
Steady state	0.12	60.69	25.08	60.11	23.69
Greatest value after pulse	0.12	70.97	29.38	64.62	23.73
Steady state	0.46	0.69	0.19	0.70	0.20
Greatest value after pulse	0.46	1.35	0.45	0.98	0.26

The effect of raffinose pulse on immobilized cells is shown in Table 3. Due to the low activity values obtained with free cells, at the 0.46 h^{-1} dilution rate, the raffinose pulse in the immobilized cells was conducted in 0.10 h^{-1} dilution rate. The values obtained, after applying the pulse, were 20.02 Uml^{-1} and 7.27 Umg^{-1} . Parascondola *et al.* (1993) cultivated immobilized *S. cerevisiae* cells on a large scale using raffinose for invertase production. These authors obtained an increase in specific invertase activity from 8 to 18 Umg^{-1} .

Table 3 – Effect of ultrasound and raffinose pulsing times on the invertase activity of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* at 0.10 h^{-1} dilution rate.

	Ultrasound pulse 1'		Ultrasound pulse 2'		Ultrasound pulse 4'		Raffinose pulse	
	Invertase Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg)	Invertase Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg)	Invertase Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg)	Invertase Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg)
Steady state	15.64	5.23	15.58	5.22	15.54	5.22	15.86	5.38
Greatest value after pulse	22.20	8.09	31.21	9.70	18.88	7.32	20.02	7.27

Ultrasound pulse

The effect of the ultrasound pulse on free cells is shown in Table 2. The ultrasound pulse was conducted at 0.12 and 0.46 h^{-1} dilution rates. At 0.12 h^{-1} dilution rate, the activity values increased 17% (Figure 1). The values obtained after applying the pulse were 70.97 Uml^{-1} and 29.38 Umg^{-1} . While at the 0.46 h^{-1} dilution rate, the results were varied but presented low magnitude (Figure 2).

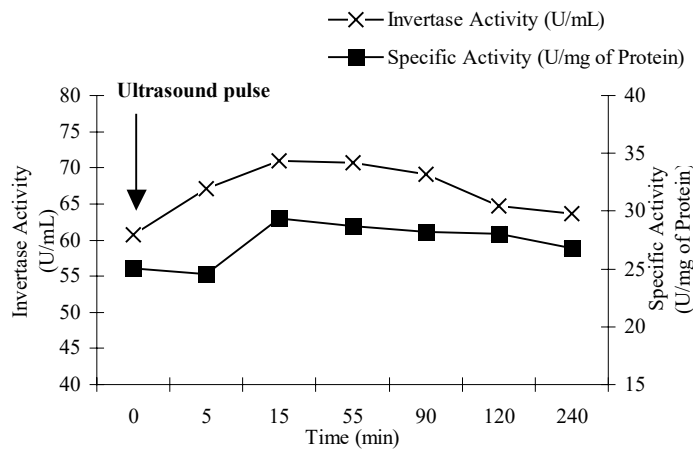


Figure 1 – Effect of ultrasound pulse on invertase activity, of free *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.12 h^{-1} dilution rate

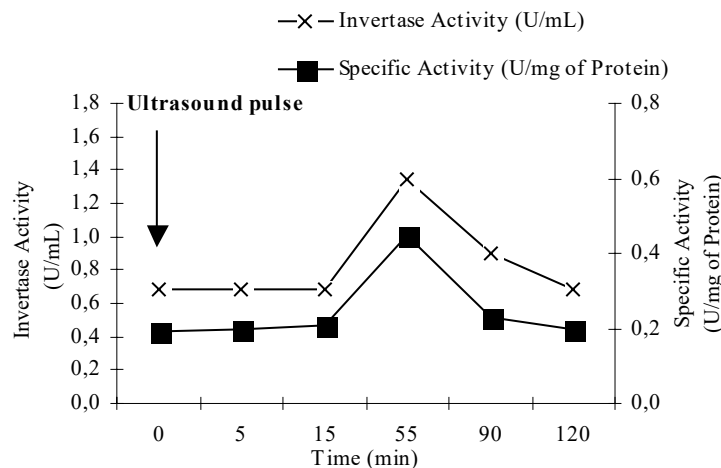


Figure 2 – Effect of ultrasound pulse on invertase activity on free *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.46 h^{-1} dilution rate.

Bucalon and Palma (1990) investigated the effect of sonication on the start of a batch *S. cerevisiae* culture. Cell radiation with frequency of 1.8 MHz and intensity of 200 mWcm^{-2} caused a slight increase in the phosphatase and ATPase activity. However, there was a large increase when the frequency of 20 kHz and intensity of 10 Wcm^{-2} were applied. Lanchun *et al.* (2003) observed that ultrasound application on a *Saccharomyces cerevisiae* batch culture at frequency of 24 kHz and power input of 2 W raised the proteinase activity values by 24%. Vargas *et al.* (2003) assessed the ultrasound application time on invertase release in batch *S. cerevisiae* culture. The greatest enzymatic activity detected without

causing cell rupture was 1.08 Uml^{-1} , using frequency of 20 kHz, amplitude 40, intensity of 0.62 Wml^{-1} ultrasound radiations and up to five minutes sonication.

The effect of ultrasound on *S. cerevisiae* cells immobilized in loofa sponge is shown in Table 3. Due to the low activity values obtained with free cells at the 0.46 h^{-1} dilution rate, the ultrasound pulse on the immobilized cells was conducted at 0.10 h^{-1} dilution rate. The sonication times used were 1, 2 and 4 minutes. At the one minute time, the activity values were 22.20 Uml^{-1} and 8.09 Umg^{-1} , respectively, after pulse application. At the two minute time, the values obtained were 31.21 Umg^{-1} and 9.70 Umg^{-1} , after five minutes ultrasound application (Figure 3). These values represent an increase of 100 and 86 %, respectively. At the 4 minutes sonication time, the values obtained were 18.88 Uml^{-1} and 7.32 Umg^{-1} . Therefore, the best ultrasound application time in immobilized cells was 2 minutes.

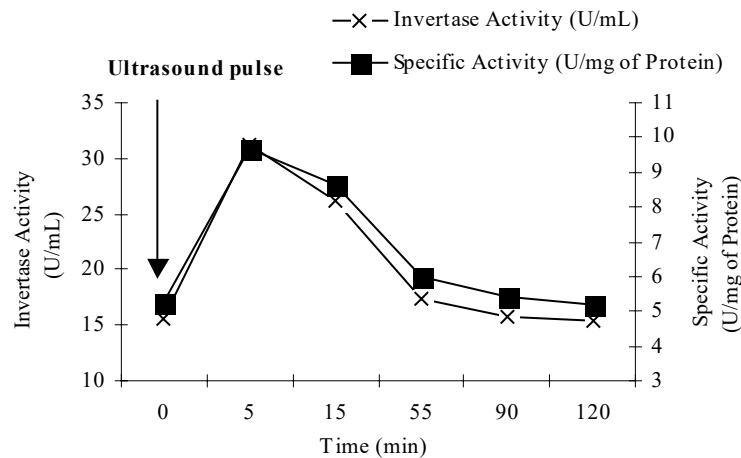


Figure 3 - Effect of 2 minute ultrasound pulse on invertase activity in immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.10 h^{-1} dilution rate.

The cell viability was assessed at 5, 15, 55, 90 and 120 minutes, after applying ultrasound to the cells. The viability rate was over 95% at the sonication times of 1 and 2 minutes. However, in the 4 minute application, a mortality rate of up to 46% was ascertained (data not shown).

The ultrasound pulse, at low frequency and for a short period increased cell permeability, consequently compound release was high. In this study, an increase

was obtained in protein release that was mostly invertase, shown by the increase in the specific activity.

Conclusion

The present study confirms loofa sponge as an excellent support for *S. cerevisiae* immobilization due to the high values of biomass aggregated to it but it hinders invertase release. Consequently, the invertase activity values were low in immobilized cells, at low dilution rates, when compared to the values obtained in free cells. Therefore, the immobilization of *S. cerevisiae* cells in *Luffa cylindrica* was shown not to be a suitable method for invertase production. The values obtained with the raffinose pulse were lower than those with ultrasound, both in free cell culture and in immobilized cell culture. In this study, the use of ultrasound pulse increase invertase release, and therefore its application is promising in improving biotechnological processes.

Acknowledgements

Marques, L. L. M. is grateful to CAPES for financial support.

References

- Balasundaram, B. & Pandit, A. B. 2001 Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation. *Biochemical Engineering Journal* **8**, 251-256.
- Bucalon, A. J.& Palma, M. S. 1990 Bioeffects of ultrasound in yeast cells suspensions. *Revista Brasileira de Engenharia* **7**, 265-272.

- Brandão, R. L.; Etchebehere, L.; Queiroz, C.C.; Tropa, M. J.; Ernandes, J. R.; Gonçalves, T.; Dias, M. C. L.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; Leiper, F. C.; Carling, D. & Castro, I. M. 2002 Evidence for involvement of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C in glucose induction of HXT genes and derepression of SUC2. *FEMS Yeast Research* **2**, 93-102.
- Chang, H. N.; Seong, G. H.; Yoo, I.K.; Park, J. K. & Seo, J. H. 1996 Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering* **51**, 157-162.
- Chisti, Y. 2003 Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology* **21**, 89-93.
- Cibis, E.; Zboromirska, W. B.; Garncarek, Z.; Gasperowicz, A. & Krzywonos, M. 2002 Kinetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell immobilization onto ceramic supports. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **11**, 51-56.
- Duboi, M.; Gilles, K. A.; & Hamilton, J. K. 1956 Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Farid, M. A.; El-Enshasy, H. A & El-Deen, A. M. N. 2002 Alcohol production from starch by mixed cultures of *Aspergillus awamori* and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* at different agitation speeds. *Journal of Basic Microbiology* **42**, 162-171.
- Hartree, E. S. 1972 Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* **48**, 422-427.
- Iqbal, M. & Zafar, S. I. 1994 Vegetable sponge as a matrix to immobilize micro-organisms: a trial study for hyphal fungi, yeast and bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, **18**, 214-217.
- Lampety, J. & Moo-Young, M. 1987 Immobilization of yeast cells by adsorption on wood chips. *Methods in Enzymology* **135**, 333-340.
- Lanchun, S.; Bochu, W.; Liancai, Z. Jie, L; Yanhong, Y. & Chuanren, D. 2003 The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and Surfaces* **30**, 61-66.

- Lima, U. A; Aquarone, E.; Borzani, W.& Shimidell, W. 2001 Reatores com células imobilizadas. In *Biotecnologia Industrial*, vol. 2. pp. 355-371. São Paulo: Edgard Blücher. ISBN 85-212-0279-2.
- Matsuura, K.; Hirotsune, M.; Nunowawa, Y.; Satoh, M. & Honda, K. 1994 Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77**, 36-40.
- Michaux, M.; Paquot, M.; Bajot, B. & Thonart, P. 1982 Continuous fermentation: improvement of cell immobilization by zeta potential measurement. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **12**, 475-484.
- Miller, G. H. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-429.
- Navratil, M.; Sturdik, E. & Gemeiner, P. 2001 Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters* **23**, 977-982.
- Nigam, J. N. 2000 Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology* **80**, 189-193.
- Ogbonna, J. C.; Liu, Y.C; Liu, Y. K. & Tanaka, H. 1994 Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell Immobilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **78**, 437-442.
- Ogbonna, J. C.; Tomiyama, S.; Liu, Y.C & Tanaka, H. 1997 Efficient production of etanol by cells Immobilized in Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**, 271-274.
- Özcan, S.; Vallier, L; G.; Flick, J. S.; Carlson, M. & Johnston, M. 1997 Expression of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast* **13**, 127-137.
- Parascandola, P.; Alteriis, E. & Scardi, V. 1993 Invertase and acid phosphatase in free and gel-immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under different cultural conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **15**, 42-49.
- Persike, D. S.; Bonfim, T. M. B.; Santos, M. H. R.; Lyng, S. M. O.; Chiarello, M. D. & Fontana, J. D. 2002 Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast

- Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Bioresource Technology* **82**, 79-85.
- Roble, N. D.; Ogonna, J. C. & Tanaka, H. 2003 A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge for the bioconversion of raw starch to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 671-678.
- Rossi, J. C. A. & Rocha, M. H. M. L 2003 A strategic study using mutant-strain entrapment in calcium alginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **38**, 43-51.
- Thomas, K.C. & Ingledew, W. M. 1990 Fuel alcohol production : effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2046-2050.
- Vargas, L. H. M.; Campos, V. E.; Celligoi, M. A. P. C. 2003 Avaliação do tempo de sonicação na liberação de invertase por *Saccharomyces cerevisiae*. In SINAIFERM, **CDROM**. Florianópolis-Brazil.
- Vargas, L. H. M.; Pião, A. C. S.; Domingos, R. N. & Carmona, E. C. 2004 Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**, 137-142.
- Yuegang, L.; Jiajin, M. & Tiancheng, G. 2003 The study on ethanol fermentation by immobilized inulinase and yeast cell using inulin as raw material *Food & Fermentation Industries* **29**, 66-68.
- Wang, D. & Sakakibara, M. 1997 Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry* **4**, 255-261.

6 CONCLUSÕES

Em cultivo com células livres e em baixas taxas de diluição, a produção de etanol foi alta, porém, mostrou-se diminuída em taxas de diluição elevadas. Entretanto, os valores de eficiência de conversão de substrato em produto foram elevados em todas as taxas de diluição. Em células imobilizadas, a produção de etanol e a eficiência de conversão foram menores que em células livres, em todas as taxas de diluição testadas.

A atividade invertásica apresentou os maiores valores em taxas de diluição baixas, tanto em células livres como em células imobilizadas.

Os pulsos de rafinose resultaram em melhoria pouco promissora da atividade invertásica, tanto em cultivo de células livres como em células imobilizadas.

O uso de ultra-som provocou discreta melhoria de atividade invertásica, em cultivo de células imobilizadas em baixa taxa de diluição. Contudo, em cultivo de células livres em baixa taxa de diluição, o uso de ultra-som, obteve a maior liberação de invertase.

REFERÊNCIAS

- BALASUNDARAM, B.; PANDIT, A. B. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation. **Biochemical Engineering Journal**, India, v. 8, p. 251-256, 2001.
- BARTON, S.; BULLOCK, C.; WEIR, D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, p. 190-194, 1996.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by ver-high-gravity fermentation technology. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 87-93, 2001.
- BRANDÃO, R. L.; ETCHEBEHERE, L.; QUEIROZ, C.C. et al. Evidence for involvement of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C in glucose induction of HXT genes and derepression of SUC2. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 93-102, 2002.
- BUCALON, A. J.; PALMA, M. S. Sonochemical effects in *Saccharomyces cerevisiae* extract: oxidation o hydrosil and thiol groups. **Ultrasonic International Conference Proceedins**, p. 745-750, 1987.
- BUCALON, A. J.; PALMA, M. S. Ultrasound as source of modification of physiochemical parameters in cell suspensions. **Ultrasonic International Conference Proceedins**, p. 1214-1217, 1989.
- BUCALON, A. J.; PALMA, M. S. Bioeffects of ultrasound in yeast cells suspensions. **Revista Brasileira de Engenharia**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 265-272, 1990.
- CHANG, H. N.; SEONG, G. H.; YOO, I.K.; PARK, J. K.; SEO, J. H. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 157-162, 1996.
- CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, New Zealand, v.21, n. 2, p. 89-93, 2003.

COLONNA, J. W.; CANO, R. F.; LAMPEN, O. J. Microheterogeneity in yeast invertase. **Biochemistry et Biophysic Acta**, Amsterdã, v. 386, n. 1, p. 293-300, 1975.

D'AMORE, T. RUSSEL, I. STEWART, G. G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, London, v. 4, p. 315-324, 1989.

DAS, D.; GAIDHANI, N. R.; MURARI, K. et al. Ethanol production by whole cell immobilization using lignocellulosic materials as solid matrix. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 132-137, 1993.

DRAETTA, I. S. Isolamento, purificação e cinética da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. v. 4, p. 23-37, 1972.

DUBOI, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DYNESEN, J.; SMITS, H.P.; OLSSON, L. NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of invertase during bath cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 579-582, 1998.

GUERRERO, S.; LÓPES-MALO, A.; ALZAMORA, S. M. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 2, p. 31-39, 2001.

HARTREE, E. S. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**. Duluth. v. 48, p. 422-427, 1972.

HERWIG, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I. STOCKAR, U. V. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. Lausanne, v. 76, n. 3, p. 247-258, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**. São Paulo: Melhoramentos, 1985, 2 ed, p. 155.

ISHIMORI, Y.; KARUBE, I.; SUZUKY, S. Continuous production of glucose oxidase with *Aspergillus sp.* under ultrasound waves. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 4, p. 85-88, 1982.

IQBAL, M.; ZAFAR, S. I. Vegetable sponge as matrix to immobilize micro-organisms: a trial study for hyphal fungi, yeast and bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Pakistan, v. 18, p. 214-217, 1993.

KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of ethyl alcohol in blood. **Journal Forensic Medical**. South Africa, v. 1, p. 373-381, 1954.

KERN, G.; KERN, D; JAENICKE, R.; SECKLER, R. Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Science**, Germany, v. 2, p. 1862-1868, 1993.

KERN, G.; SCHÜLKE, N.; SCHIMID, F. X.; JAENICKE, R. Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast. **Protein Science**, Germany, v. 1, p.120-131,1991.

KOURKOUTAS, Y.; DOUMA, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Continuous winemaking fermentation using quince-immobilized yeast at room and low temperatures. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 143-148, 2002a.

KOURKOUTAS, Y.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. **Food Microbiology**, v. 19, p. 127-134, 2002b.

LAMPEN, O. J. Yeast and Neurospora Invertases. **The Enzymes**. New York: Academic Press, 3 ed., v. 5, 1971, p. 291-305.

LANCHUN, S.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. et al. The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Colloids and Surfaces B**, China, v. 30, p. 61-66, 2003.

LEDOUXT, V. M.; DUBOURDIEU, D. An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, France, v. 79, p. 537-543, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Savier, 1995.

LIMA, U. A; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Afiliada, 2001. v. 2.

LIN, L.; WU, J.; LIN, L. D. et al. Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 1, p.81-88, 2002.

LOUKATOS, P.; KANELLAKI, M.; KOMAITIS, M.; ATHANASIADIS, I.; KOUTINAS, A. A. A new technological approach proposed for distillate production using immobilized cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 35, n. 1, 2003.

MARGARITIS, A.; MERCHANT, F. J. A. Advances in ethanol production using immobilized cell systems. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Canada, v. 1, n. 4, p. 339-393, 1984.

MATSUURA, K.; HIROTSUNE, M.; NUNOKAWA, Y. et al. Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 77, n. 1, p. 36-40, 1994.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MOMENEO, S.; ZUECO, J.; IRANZO, M.; SENTANDREU, R. O-Linked mannose composition of secreted invertase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Letters**, v. 57, p. 271-274, 1989.

MWESIGYE, P. K.; BARFORD, J. P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 42, p. 209-306, 1996.

NIGAN, J. N.; GODOI, B. K.; BEZBARUAH, R. L. Agar immobilized yeast cells in tubular reactor for ethanol production. **Indian Journal of Experimental Biology**, India, v.36, n. 8, p. 816-819, 1998.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y.C; LIU, Y. K.; TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell Immobilization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Taiwan, v. 78, n. 6, p. 437-442, 1994.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Process Biochemistry**, Japan, v. 31, n. 8, p. 737-744, 1996.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; LIU, Y.C; TANAKA, H. Efficient production of ethanol by cells Immobilized in Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Taiwan, v. 84, n. 3, p. 271-274, 1997.

OKUNO, E.; CHOW, C.; CALDAS, I. L. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. 2 ed. São Paulo: Harbra, 1986. 450 p.

PIRT, S. J. **Principles of microbial and cell cultivation**. Londres: Blackwell, 1985. 33 p.

PARASCANDOLA, P.; ALTERIIS, E.; SCARDI, V. Invertase and acid phosphatase in free and gel-immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under different cultural conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, Italy, v. 15, p. 42-49, 1993.

PERSIKE, D. S.; BONFIM, T. M. B.; SANTOS, M. H. R. et al. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). **Bioresource Technology**, Curitiba, v. 82, p.79-85, 2002.

RADEL, S.; MCLOUGHLIN, A. J.; GHERARDINI, L. et al. Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves. **Ultrasonics**. v. 38, p. 633-637, 2000.

REDDY, A. V.; JOHNSON, S. R.; BIEMANN, K. et al. Characterization of glycosylation sites in yeast external invertase. **Journal of Biological Chemistry**., Baltimore, v. 263, n. 15, p. 6978-6985, 1988.

ROBLE, N. D.; OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge for the bioconversion of raw starch to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Japan, v. 60, n. 6, p. 671-678, 2003.

SAEKI, T.; OKUYAMA, M.; MORI, H. Localization of α -glucosidase in yeast cells. **Journal Applied Glycoscience**, Sapporo, v. 45, n. 3, p. 281-283, 1998.

SAKAKIBARA, M.; WANG, D.; TAKAHASHI, R. et al. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, p. 444-448, 1996.

SCHREUDER, O.; DEEN, C.; BOERSMA, J.; POUWELS, H. P.; KLIS, F. M. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. **Vaccine**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 383-388, 1996. Resumo. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/> [capturado em 05/06/03].

SCHLÄFER, O.; SIEVERS, M.; KLOTZBÜCHER, H.; ONEYECHE, T. I. Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors. **Ultrasonics**. v. 38, p. 711-716, 2000.

SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**. v. 30, n. 3, p. 180-185, 1992.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S. Transporte ativo e fermentação de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 2003, MIN 024. Florianópolis: Polo, 2003. **CDROM**.

SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, Washington, v. 247, p. 1439-1445, 1990.

SZAJÁNI, R.; BUZÁS, Z.; DALLMANN, K.; GIMESI, I.; KRISCH, J.; TÓTH, M.; Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 122-125, 1996.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 11 ed. Rahway: Merck & Co. Inc., 1989. p.1290.

THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production : effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2046-2050, 1990.

VARGAS, L. H. M. **Efeitos do ultra-som sobre a invertase de *Aspergillus niger***. 2001. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

VARGAS, L. H. M.; CAMPOS, V. E.; CELLIGOI, M. A. P. C. Avaliação do tempo de sonicação na liberação de invertase por *Saccharomyces cerevisiae*. In: SINAFERM, 2003, Florianópolis. **CDROM**.

VARGAS, L. H. M.; PIÃO, A. C. S.; DOMINGOS, R. N.; CARMONA, E. C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 137-142, 2004.

WANG, D.; SAKAKIBARA, M. Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 4, p. 255-261, 1997.

WANG, D.; SAKAKIBARA, M.; KONDOH, N.; SUZUKI, K. Ultrasound-enhanced lactose hydrolyses in milk fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Japan, v. 65, n. 1, p. 86-92, 1996.

WOODWIND, J. ORR, M. Enzymatic conversion of sucrose to hydrogen. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 14, n. 6, p. 897-902, 1998. Resumo. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/> [capturado em 05/06/03].

WILLIAMS, A. R **Ultrasound: Biological Effects and Potential Hazards**. Orland: Academia Press, 1983. p. 321.

WHITAKER, J.R. The glycosidase hydrolases. In: WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker Inc., 1972. Cap. 15, p.433-465.

ZECH, M.; GÖRISCH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible inactivation by components of industrial molasses media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 41-46, 1995.

ZHAO, Y.; LIN, Y. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a chemostat under high glucose conditions. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1151-1154, 2003.

ANEXOS

ANEXO A

**Instruções para preparação e encaminhamento de artigo científico
para publicação na revista World Journal of
Microbiology & Biotechnology**

ANEXO A – Instruções para preparação e encaminhamento de artigo científico para publicação na revista *World Journal of Microbiology & Biotechnology*

Manuscript Submission

Online Manuscript Submission

The World Journal of Microbiology and Biotechnology has a fully web-enabled manuscript submission and review system. This system offers authors the option of tracking in real time the review process of their manuscripts. The online manuscript and review system offers easy and straightforward log-in and submission procedures. It supports a wide range of submission file formats, including Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX for article text and TIFF, EPS, PS, GIF, JPEG and PPT for figures. PDF is not a recommended format.

Manuscripts should be submitted to:

<http://wibi.edmgr.com>

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from this system. Please send a completed and signed form either by mail or fax to the *The World Journal of Microbiology and Biotechnology* Office.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also as printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the toolbar.

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Colour figures

Kluwer Academic Publishers offer two options for reproducing colour illustrations in your article. Please select the option you prefer:

1. Free Online Colour (no page charges): The colour figures will only appear in colour on www.kluweronline.com and not in the printed version of the journal.

2. Online and Printed Colour (with page charges): The colour figures will appear in colour on our website and in the printed version of the journal. There is a charge for the reproduction of colour figures in print. The pricing is based on the amount of pages. The first two pages are **for free** (irrespective of the number of figures on a page). Thereafter, the subsequent pages cost:

1 page = EUR 455

2 pages = EUR 685

3 pages = EUR 915

4 pages = EUR 1095

5 pages = EUR 1275

6 pages = EUR 1455

7 pages = EUR 1595

and for each subsequent page an additional EUR 115.

For example, a total of 3 colour pages would cost EUR 455.

Note: 50% reduction applies to authors publishing on behalf of a university or government institution, whereby the subsequent pages cost:

- 1 page = EUR 230
- 2 pages = EUR 345
- 3 pages = EUR 460
- 4 pages = EUR 550
- 5 pages = EUR 640
- 6 pages = EUR 730
- 7 pages = EUR 800

and for each subsequent page an additional EUR 60.

For example, a total of 3 colour pages would cost EUR230.

Please indicate at submission which figures should be printed in colour, the number of colour pages you prefer and to which address we can send the invoice. In addition, please specify if figures are to appear together on a colour page.

Manuscript Presentation

Manuscripts not conforming to the instructions below will be returned for reformatting without review. You should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journal website at <http://www.kluweronline.com/issn/0959-3993>. The journal's language is English. British English spelling and terminology should be used consistently throughout the article. Please ensure that the language is corrected by a fluent English speaker before submission if English is not your first language. Manuscripts submitted in poor English may be returned for revision without review. Text should be formatted to fit A4 or US Letter paper size, leaving 2.5 cm margins on all sides of the text. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- running head (shortened title)
- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Summary

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The summary should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. It should be page 2 of the manuscript with the title repeated on that sheet.

Key Words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations should be explained at first occurrence in the text though extensive mathematical symbols should be defined collectively before the introduction begins on page 3. A list of abbreviations which need not be defined is given in Table 1 (next page).

Article Types

Five types of manuscripts may be submitted:

Full-length Papers

These should describe new and carefully confirmed findings, and experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Short Communications

A Short Communication is suitable for recording the results of complete small investigations or giving details of new methods, techniques or apparatus. The style of main sections need not conform to that of full-length papers. Short communications are two printed pages in length. Progress reports are not acceptable.

Short Notes

Short Notes are one printed page in length. They are suitable for reports of simple findings such as the properties of an already well-described enzyme or of observations not requiring elaboration. They should be written with a short (40-word) summary, no main sub-divisions, they may contain one table or figure, or two if the text is brief, and no more than three references.

Technical Communications

These are reports of processes or procedures which may be published as an annex to a full-length paper or on their own provided that the work described is of sufficient interest to other workers in the field.

Review Papers

These should be submitted only after consultation with the Editor. They will be limited to no more than 8 printed pages.

Symbols and Units

Only recommended SI units should be used. Authors may use either superscript presentations (mg ml^{-1} or the solidus presentation (mg/ml). When giving the concentration of a solution in a solvent the correct description is, for example, 10 g glucose/100 ml, not 10 g/100 ml glucose. The term % used to express a concentration must be used correctly, i.e. g per 100 g solution; otherwise % (v/v) or % (w/v) should be used for solutions of concentration greater than 1%. For solvent mixtures use, for example, butan-1-ol/acetic acid/water (4:1:1, by vol.) or chloroform/methanol (2:1, v/v).

Nomenclature

Nomenclature Chemical and biochemical nomenclature should follow the IUPAC-IUB Commission guidelines; appropriate guidelines are given in, for example, Policy of the Journal and Instructions to Authors, The Biochemical Society, 59 Portland Place, London W1N 3AJ, UK, and references therein. This document is available online at <http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm>. The Enzyme Commission (EC) number for enzymes should be given at the first time of mention; see Enzyme Nomenclature (1992), Academic Press; London & New York, or visit <http://www.expasy.org/enzyme/>. Microorganisms must be correctly named using the current codes for bacteria, yeasts, fungi, algae and protozoa; (see Microbiology 1999, 145 (January), p. viii). Guidelines for genetic nomenclature are quoted in the same publication.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered. Consult a current issue for the styles.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections.

Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the References. A source reference note should be indicated by an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works. Note the use of the ampersand (&) in references.

Examples:

Cook (1998)

(Cook 1998)

(Dick & Quinn 1997b)

(Cook 1988; Tomkins 1991a,b; Tomkins 1992; Tomkins 1995)

(Olsen et al. 1995)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the paper in **alphabetical** order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Attwood, T.K. & Parry-Smith, D.J. 1999 *Introduction to Bioinformatics*. pp. 69-80. Harlow: Addison Wesley Longman. ISBN 0-582-32788-1.

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Steinbuchel, A. 1996 PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In *Biotechnology*, 2nd edn, Vol 6, ed. Rehm, H.-J. Weinheim: VCH Publishers.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Charnley, A.K. 1992 Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In *Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin*, ed Lomer, C.J. & Prior, C. pp. 181-190. Oxford: C.A.B. International. ISBN 0-5198779-6.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; full title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below.

Saha, B.C. & Zeikus, J.G. 1989 Improved method for preparing high maltose conversion syrups. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 299-303.

References to technical reports or doctoral dissertations, which **must** be in the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Singh, K.L. 1997 *Physiological and biochemical studies on microbes isolated from the harsh conditions*. Ph.D Thesis, BHU, Varanasi, India.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not make any changes to the PDF file. Minor corrections (+/- 10) should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@wkap.nl. Always quote the four-letter journal code and article number and the PIPS No. from your proof in the subject field of your e-mail. Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas).

Offprints

Fifty (50) offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charge and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures are published at the author's expense only.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Kluwer Academic Publishers
 Journals Editorial Office
 Attention: Deborah Magnin
 Van Godewijckstraat 30
 P.O. Box 17
 3311 GX Dordrecht
 The Netherlands
 Phone: (+31) 78 6576900
 Fax: (+31) 78 6576254

ANEXO B
Comprovante de submissão do Artigo 1

ANEXO B – Comprovante de submissão do Artigo 1

Assunto:

Submission Confirmation

Data:

Wed, **23 Jun 2004 16:05:51 -0400**

De:

"deborah magnin" <deborah.magnin@wkap.nl>

Para:

<buzato@uel.br>

Dear João,

Thank you for submitting your manuscript,

"Effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge", to World Journal of Microbiology and Biotechnology

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://wibi.edmgr.com/>

Your username is: Buzato

Your password is: buzato56

We will also need to receive a signed copyright transfer form from you. You can locate the form on the opening page of Editorial Manager under 'AUTHORS'.

Please print the form, sign it and return it to us.

Thank you.

With kind regards,

Editorial Office

Kluwer Academic Publishers

P.O. Box 990

3300 AZ DORDRECHT

The Netherlands