

# Effetto della temperatura e del pH sulla produzione continua di Xilitolo mediante *Candida Guilliermondii*

## Efeito da temperatura e do pH sobre a produção contínua de Xilitol mediante *Candida Guilliermondii*

A. Converti<sup>(1)</sup>, P. Torre<sup>(1)</sup>, E. De Luca<sup>(1)</sup>, P. Perego<sup>(1)</sup>, S.S.Silva<sup>(2)</sup> e S. Sato<sup>(3)</sup>

### RESUMO

Neste trabalho é avaliada a influência do pH e da temperatura sobre a produção de xilitol mediante a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, através de ensaios de fermentação semiaeróbica contínua, conduzidos em reator CSTR. Os resultados a diferentes pH têm sido testados com o modelo de Villadsen para obter indicações sobre a estrutura do sítio ativo da enzima que limita a produção de xilitol. Diferentemente do que ocorre com sistemas enzimáticos purificados, este modelo tem se revelado inadequado para este tipo de estudo em sistemas a células inteiras. Os resultados obtidos a diferentes temperaturas têm sido utilizados para a estimação dos parâmetros termodinâmicos com vista à individuação dos fenômenos que limitam seja a redução da xilose a xilitol que a desativação térmica do biocatalisador. Os valores dos parâmetros termodinâmicos estimados através do modelo tradicional de Arrhenius são comparados com os mencionados na literatura para outros bioprocessos de tipo enzimático. Uma análise comparativa com o modelo "termodinâmico", que prevê um equilíbrio entre as duas formas ativa e desativada do catalisador, evidencia os limites do método empírico de Sizer, baseado sobre a equação de Arrhenius, em fornecer indicações sobre o fenômeno responsável pela queda de atividade observada acima da temperatura ótima.

### ABSTRACT

The influence of pH and temperature on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 has been studied by means of continuous semiaerobic fermentations in CSTR. The results collected at different pH have been worked out by the Villadsen model to get information on the structure of the active site of the enzyme limiting xylitol production. Contrarily to purified enzymatic systems, such a model revealed itself inadequate for this kind of study in the presence of whole cells. The results obtained at different temperatures have been utilized to estimate the thermodynamic parameters aiming at pointing out the phenomena limiting either the reduction of xylose to xylitol or the biocatalyst thermal inactivation. The values of the thermodynamic parameters estimated by the traditional Arrhenius model have been compared with those reported in the literature for other bioprocesses. A comparative analysis with the so-called "thermodynamic" model -that supposes the occurrence of an instantaneous equilibrium between the active and the inactivated forms of the biocatalyst- put in evidence the limits of the Sizer empirical method to provide information on the phenomenon responsible for the activity fall observed beyond the optimum temperature.

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo "G.B. Bonino", Università di Genova - via Opera Pia 15 - 16145 Gênova, Itália.

<sup>(2)</sup> Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL - Campus 1 - Rodovia Itajubá-Lorena, km 74,5 - 12600-000 Lorena - SP.

<sup>(3)</sup> Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, FCF/USP, Avenida Prof. Lineu Prestes 580 - Bloco 16 - 05508-900 São Paulo - SP.

## INTRODUZIONE

Lo xilitolo, intermedio del metabolismo del D-xilosio, è un pentitolo che sta riscuotendo un crescente interesse industriale per via delle sue proprietà cliniche e dietetiche. Il lievito *Candida guilliermondii*, ampiamente studiato per questa bioconversione, è in grado di trasformare il D-xilosio in D-xilulosio attraverso un cammino ossidoriduttivo che consta di due reazioni in sequenza. Nella prima, l'enzima xilosio reduttasi (XR) trasforma il D-xilosio in xilitolo, utilizzando come cofattore NADH e/o NADPH, a seconda della specie. Nella seconda reazione, lo xilitolo è ossidato a D-xilulosio da una deidrogenasi NAD<sup>+</sup> dipendente (xilitolo deidrogenasi, XDH) (Prior *et al.*, 1989; Girio *et al.*, 1990). Il D-xilulosio, una volta fosforilato a D-xilulosio 5-fosfato dalla xilulosio chinasi, può entrare nel metabolismo energetico (fermentazione alcolica, glicolisi e ciclo di Krebs) attraverso lo shunt del pentoso fosfato. La possibilità di accumulare xilitolo è legata alla natura del cofattore dell'enzima XR ed è strettamente correlata alle condizioni di aerazione. I lieviti la cui XR dipende tanto dal NADPH che dal NADH (come *Pichia stipitis*) sono in grado di rigenerare il cofattore NAD<sup>+</sup> consumato nella seconda reazione e pertanto, sia in condizioni anaerobiche che microaerofile, non possono accumulare xilitolo, producendo prevalentemente etanolo.

Invece, le specie in cui la XR è dipendente solo dal NADPH (quali *Candida sp.* e *Debaryomyces hansenii*) non sono in grado di rigenerare il cofattore necessario al secondo step attraverso la riduzione che avviene nel primo (Amaral-Collaço *et al.*, 1989); in condizioni aerobiche, il NADPH formato può essere riossidato per via respirativa, mentre in condizioni semiaerobiche si genera uno squilibrio redox che porta all'accumulo di xilitolo (Dietzemüller *et al.*, 1984, Prior *et al.*, 1989). Secondo Barbosa *et al.* (1988), il meccanismo globale del metabolismo dello xilosio in *Candida guilliermondii* in terreni di coltura bilanciati dal punto di vista nutrizionale può essere rappre-

sentato, in condizioni microaerobiche, da un bilancio di materia che comporta una resa teorica di 0,905 moli xilitolo per mole xilosio consumata.

Nonostante siano reperibili in letteratura una gran quantità di informazioni su molti parametri operativi che influenzano la produzione di xilitolo mediante *Candida guilliermondii*, come l'età dell'inoculo, il pH, la temperatura e le condizioni di aerazione, solo pochi studi sono stati condotti per correlarne in modo sistematico l'influenza sul metabolismo microbico. In questo lavoro è stata valutata l'influenza del pH e della temperatura sulla riduzione dello xilosio a xilitolo ad opera di questo lievito, attraverso una serie di fermentazioni continue condotte in condizioni microaerobiche in reattore CSTR. In particolare, sono stati stimati i parametri termodinamici della biotrasformazione, nel tentativo di individuare i fenomeni associati tanto alla formazione dello xilitolo per via fermentativa quanto all'inattivazione termica del biocatalizzatore.

## MATERIALI E METODI

### Microrganismo

Le prove sperimentali sono state effettuate utilizzando il lievito *Candida guilliermondii* FTI 20037, isolato nel Dipartimento di Biotecnologia della Facoltà di Ingegneria Chimica di Lorena (FAEN-QUIL), Lorena - SP. Le cellule di lievito sono state mantenute a 4°C in slant di PDA (20 g/L) contenenti 6,7 g di Yeast Nitrogen Base (YNB) e 20 g/L di xilosio. Campioni di cellule venivano trasferiti in Erlenmeyer da 500 mL riempite con 200 mL di mezzo di coltura sintetico, costituito da 30 g/L di xilosio, 5,0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g/L estratto di lievito, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Dopo 40 h di incubazione a 30°C in agitatore rotante (200 rpm), le cellule venivano raccolte mediante centrifugazione sterile e utilizzate come inoculo nel bioreattore.

## Condizioni sperimentali

Le fermentazioni sono state realizzate in fermentatore in scala di laboratorio, con volume utile di 2,0 L, nello stesso terreno utilizzato per la crescita cellulare. Le fermentazioni sono state avviate come processi discontinui e solo dopo 60 h, quando quasi tutto lo xilosio inizialmente presente era stato consumato e la concentrazione cellulare era approssimativamente 4,0 g/L, si è iniziato ad alimentare il fermentatore in continuo. Le fermentazioni continue sono state condotte ad agitazione di 300 rpm, aerazione di 20 mL/min e velocità di diluizione pari a 0,053 h<sup>-1</sup>. Il pH iniziale e la temperatura sono stati variati rispettivamente fra 2,5 e 7,0 e fra 22°C e 39°C. Le prove a pH variabile sono state condotte lavorando ad una temperatura di 30°C e quelle a temperatura variabile a pH 5,0.

## Metodi analitici

Le concentrazioni di xilosio e xilitolo sono state determinate mediante HPLC ad indice di rifrazione connesso con una colonna SUGAR-PAK a 85°C, utilizzando come fase mobile acqua deionizzata contenente 50 mg/L Ca-EDTA ad un flusso di 0,5 mL/min. La concentrazione cellulare è stata misurata per via turbidimetrica a 600 nm, correlando le misurazioni della densità ottica con il peso secco, misurato dopo aver lasciato seccare la biomassa a 90°C per 24 h.

## TEORIA

### Influenza della temperatura

L'andamento della velocità delle reazioni enzimatiche segue normalmente un andamento a campana. L'aumento di velocità previsto dai principali modelli teorici della cinetica chimica (approccio di Arrhenius e teoria degli urti, teoria del complesso attivato) è, infatti, contrastato dalla diminuzione dell'attività enzimatica, causata dalla deformazione rispetto alla conformazione biologicamente attiva, dovuta all'agitazione termica. Tale effetto è definito inattivazione termica.

Un primo approccio, di tipo empirico, per studiare questo effetto, è dovuto a Sizer (1944), che ipotizzò come a basse temperature l'effetto dell'inattivazione

termica sia trascurabile e che riesca a prevalere solo a temperature superiori a  $T_{opt}$ . Per  $T < T_{opt}$  si ipotizza quindi che tra temperatura e costante di velocità,  $k_v$ , sussista una normale relazione del tipo di Arrhenius:

$$k_v = A \exp(-\Delta H^\ddagger/RT) \quad (1)$$

dove  $\Delta H^\ddagger$  è l'entalpia di attivazione della reazione enzimatica,  $R$  la costante dei gas ideali,  $T$  la temperatura assoluta e  $A$  è il fattore preesponentiale di Arrhenius, correlabile all'entropia di attivazione di questa reazione. Per  $T > T_{opt}$  si ipotizza un analogo andamento di tipo Arrhenius, introducendo semplicemente un nuovo parametro di attivazione,  $\Delta H^\ddagger$ , e un diverso fattore preesponentiale,  $B$ , ottenendo una relazione dello stesso tipo di quella precedente. In base a questo approccio empirico, l'entalpia di attivazione della reazione di inattivazione dell'enzima,  $\Delta H^\ddagger_i$ , sarebbe data dalla somma di questo parametro sperimentale in valore assoluto e dell'entalpia di attivazione della reazione catalizzata,  $\Delta H^\ddagger$ .

Le relative variazioni delle entropie di attivazione della reazione enzimatica e dell'inattivazione termica possono essere stimate mediante le equazioni:

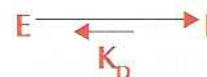
$$A = \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta S^\ddagger/R) \quad (2) \quad B = \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta S^\ddagger_i/R) \quad (3)$$

dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann e  $h$  la costante di Plank. Poiché gli intervalli di temperatura considerati in questo studio sono piuttosto ristretti, si assume che  $T$  sia costante e pari alla media degli estremi dell'intervallo.

Si ipotizza un'analogia relazione tra l'entropia di attivazione della disattivazione, quella di attivazione della reazione enzimatica e la  $\Delta S^\ddagger_i$  ricavata sperimentalmente. L'energia libera di attivazione nei due casi può essere calcolata attraverso l'equazione di Gibbs:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (4)$$

Il cosiddetto approccio termodinamico (Roels, 1983) invece è basato sull'ipotesi che l'equilibrio reversibile di disattivazione:



avenga istantaneamente rispetto alle reazioni che, nel modello di Michaelis-Menten, coinvolgono il substrato, l'enzima e il prodotto. L'effetto di inattivazione è pertanto spiegato con la riduzione della concentrazione

dell'enzima attivo, E: se  $K_D$  è la costante dell'equilibrio di inattivazione, dal bilancio di materia per l'enzima si ottiene la concentrazione della forma attiva dell'enzima:

$$[E] = [E]_0 / (1 + K_D) \quad (5)$$

Inserendo questa espressione nell'equazione di Michaelis-Menten si ottiene:

$$V_m = [k_f / (1 + K_D)] [E]_0 = k_{eff} [E]_0 \quad (6)$$

Dalla teoria del complesso attivato, si ha:

$$k_v = (k_B T / h) \exp(\Delta S^\ddagger / R) \exp(-\Delta H^\ddagger / RT) = A \exp(-\Delta H^\ddagger / RT) \quad (7)$$

mentre, dall'equazione di Gibbs:

$$K_D = \exp(\Delta S_D^\circ / R) \exp(-\Delta H_D^\circ / RT) = B \exp(-\Delta H_D^\circ / RT) \quad (8)$$

dove  $\Delta S_D^\circ$  e  $\Delta H_D^\circ$  sono rispettivamente le variazioni di entropia ed entalpia standard termodinamiche dell'equilibrio di inattivazione. Sostituendo si ottiene l'espressione:

$$k_{eff} = A \exp \left\{ 1 + B \exp \left( -\frac{\Delta H_D^\circ}{RT} \right) \right\} \quad (9)$$

che contiene sia il contributo dell'entropia di attivazione della reazione enzimatica,  $A$ , che quello dell'entropia standard di inattivazione del catalizzatore,  $B$ .

Questa espressione spiega l'andamento dei punti sperimentali in tutto l'intervallo di temperatura. A basse temperature il denominatore è circa uguale a 1, per cui si ottiene un andamento di tipo Arrhenius:

$$k_{eff} \cong A \exp \left( -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \right) \quad (10)$$

Al crescere della temperatura aumenta il peso della forma enzimatica non attiva, a causa dell'aumento della  $K_D$ , costante di equilibrio di una reazione endotermica, per cui l'Eq.(10) diventa:

$$K_{eff} \cong \frac{A}{B} \exp \left( \frac{\Delta H_D^\circ - \Delta H^\ddagger}{RT} \right) \quad (11)$$

Anche secondo quest'approccio quindi il grafico del logaritmo naturale della  $k_{eff}$  in funzione di  $1/T$  dovrebbe mostrare, nei suoi rami laterali, un andamento rettilineo. I due approcci concordano sul significato da attribuire ai coefficienti legati all'entropia di attivazione e all'entalpia di attivazione della reazione enzimatica,

mentre differiscono nell'interpretazione del significato fisico da attribuire ai corrispondenti coefficienti della retta che descrive l'inattivazione termica. Secondo Sizer (1944), l'inclinazione di questa retta sarebbe legata all'entalpia di attivazione della reazione di inattivazione dell'enzima,  $\Delta H^\ddagger$ , mentre, in base all'approccio termodinamico, essa sarebbe da considerarsi legata all'entalpia termodinamica standard di questa stessa reazione,  $\Delta H_D^\circ$ . Analogamente, per quanto riguarda l'intercetta all'origine, secondo il primo approccio essa dipenderebbe dall'entropia di attivazione, mentre in base al secondo dall'entropia standard dell'equilibrio di inattivazione termica.

L'approccio empirico di Sizer può essere pertanto considerato un'approssimazione di quello di Roels. La reazione di inattivazione termica dell'enzima è infatti fortemente endotermica, essendo la forma attiva dell'enzima molto più stabile di quella inattivata. Lo stato di questa forma ad alta energia può essere assimilato a quello dello stato di transizione e pertanto i valori dei parametri termodinamici entalpici ed entropici non dovrebbero discostarsi di molto da quelli dei corrispondenti parametri di attivazione.

## Influenza del pH

L'approccio di Villadsen *et al.* (1990) considera gli enzimi dal punto di vista della loro natura protolitica. Secondo questo autore, l'affinità di un enzima per il suo substrato si manifesta solo quando esso si trova nello stato di ionizzazione corrispondente ad una sua forma attiva, costituita dalla specie anfotera  $HX-E-Y$ ; questa sarebbe costantemente in equilibrio con le due forme, entrambe inattive,  $HX-E-YH$  e  $X-E-Y$ , prevalenti rispettivamente a bassi ed elevati valori di pH.

Queste considerazioni possono spiegare la riduzione dell'attività enzimatica causata dalla variazione del pH dell'ambiente di reazione e l'esistenza di un pH ottimale di lavoro e sono alla base di un semplice me-

todo grafico che, utilizzando i valori sperimentali della produttività specifica a diversi pH, consente di stimare le costanti di dissociazione dei residui R degli amminoacidi presumibilmente coinvolti nella catalisi.

Sulla base delle espressioni delle costanti degli equilibri di dissociazione considerati, del bilancio di massa e dell'equazione di Michaelis-Menten, si può scrivere la seguente espressione per la velocità della reazione enzimatica:

$$v_m = k_v [E]_0 \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{a_1}} + \frac{K_{a_2}}{[H^+]} \right) = \bar{v}_m \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_{a_1}} + \frac{K_{a_2}}{[H^+]} \right) \quad (12)$$

dove  $\bar{v}_m$  è il valore della velocità massima, assunta in corrispondenza del valore di pH al quale si ha la massima concentrazione della specie attiva, HX-E-Y.

A bassi pH, quando  $[H^+] \gg K_{a_1}$ , si ottiene:

$$v_m = \bar{v}_m K_{a_1} / [H^+] \quad (13)$$

mentre, ad alti pH, quando  $K_{a_2} \gg [H^+]$ :

$$v_m = \bar{v}_m [H^+] / K_{a_2} \quad (14)$$

Se infine le due costanti assumono due valori sufficientemente distanti ( $K_{a_1}/K_{a_2} \geq 10^4$ ), esisterà un intervallo di pH sufficientemente ampio dove la specie prevalente sarà la forma attiva dell'enzima, HX-E-Y,  $[E]_0$  sarà circa uguale a  $[X-E-Y]$  e l'Eq.(12) diviene:

$$v_m \cong \bar{v}_m \quad (15)$$

Riportando quindi il logaritmo di  $v_m$  in funzione del pH, si osserverà, in ciascuno di questi tratti, una linea retta da cui stimare facilmente i valori di  $pK_{a_1}$  e  $pK_{a_2}$  che corrispondono a quei valori di pH ai quali le rispettive rette intercettano la parallela all'asse delle ascisse passante per  $\log_{10} \bar{v}_m$ . Considerando per il caso in esame una dipendenza lineare della produttività dello xilitolo dall'attività dell'enzima limitante questa via metabolica (XR), si possono stimare mediante il metodo di Villadsen (1990), le costanti degli equilibri di dissociazione dei gruppi R laterali dei due amminoacidi verosimilmente coinvolti nell'atto catalitico e restituire così alcune utili informazioni sulle caratteristiche del sito attivo dell'enzima.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Effetto della variazione di pH

Dai dati di Tabella 1, che riassume i valori dei parametri cinetici delle sei fermentazioni condotte a pH

variabile, si deduce un andamento a campana sia della produttività volumetrica che di quella specifica, con un pH ottimale di fermentazione pari a 5,0. Si è quindi tentato di applicare il metodo di Villadsen ai valori ottenuti per il secondo parametro, purtroppo con scarso successo. Le rette che al meglio approssimano i risultati sperimentali sono descritte dalle equazioni:

$$Y_1 = 0,0311 \cdot \text{pH} - 0,7891 \quad (16)$$

$$Y_2 = 0,0744 \cdot \text{pH} - 0,2626 \quad (17)$$

Assumendo  $\log_{10} \bar{v}_m = -0.0631 \text{ g}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ , ossia il valore di  $\log_{10} v_m$  a  $\text{pH} = 5,0$ , si otterrebbero due valori delle costanti di dissociazione molto prossimi, rispettivamente pari a 4,85 e 4,95 (Fig. 1), che non trovano rispondenza con i valori di  $pK_a$  reperibili in letteratura per i principali amminoacidi.

In questo caso siamo di fronte ai limiti di questo approccio, valido per le trasformazioni realizzate con l'enzima puro, ma che risulta troppo semplicistico per quelle realizzate con colture cellulari vive: non è solo l'attività della xilosio riduttasi a essere condizionata dalla concentrazione idrogenionica, ma lo sono anche tutti gli equilibri collegati alla trasformazione del substrato in prodotto. In particolare occorre considerare almeno i fenomeni di a) trasporto dello xilosio nella cellula, b) rigenerazione dell'NADPH attraverso la catena respiratoria e c) trasporto dello xilitolo all'esterno della cellula. Tutti questi processi, che accompagnano la trasformazione del substrato, sono fortemente influenzati dalla concentrazione idrogenionica e, al variare di questa possono diventare stadi "rate determining" di tutto il processo.

Una prima ipotesi circa l'influenza del pH sulla produzione continua di xilitolo può essere formulata sulla base della recente individuazione in *Debaryomyces hansenii* di un sistema di trasporto dello xilosio ad elevata affinità, che agisce da simporto protonico indotto dal substrato e controllato dai sali (Converti and Domínguez, 2001). Un aumento del pH esterno da 5,0 a 7,0 potrebbe influenzare, in prima ipotesi, l'attività di un analogo trasportatore in *C. guilliermondii*, rendendo il trasporto dello xilosio dal mezzo colturale all'interno della cellula il fenomeno limitante la formazione dello xilitolo. Come dimostrato in precedenza per *D. hanse-*

*nii* in coltura batch (Converti and Domínguez, 2001), la trasformazione dello xilosio dovrebbe avvenire in queste condizioni alla stessa velocità del suo trasporto attivo attraverso la membrana cellulare.

La scarsa influenza di un decremento del pH sulla produttività dello xilitolo può essere imputata, almeno parzialmente, all'effetto tamponante del sistema omeostatico della cellula, che tende ad opporsi alle variazioni di pH esterno e fa sì che il pH citoplasmatico non sia quello imposto dalle condizioni sperimentali.

### Effetto della variazione di temperatura

Nelle colture cellulari la massima velocità limite di formazione del prodotto, o produttività volumetrica, è espressa dalla relazione:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_m = k_v X Y_{PX} \quad (18)$$

dove  $k_v$  esprime la costante di velocità della degradazione del complesso enzima-substrato,  $X$  la concentrazione della biomassa e  $Y_{PX}$  la resa di prodotto per unità di biomassa. Secondo Roels (1983), la formula minima della biomassa secca dei lieviti è  $CH_{1.79}O_{0.5}N_{0.20}$ , che corrisponde a un peso formula di 24,60 g/C-mole. Essendo il peso molecolare dello xilosio pari a 150 g/mole si ottiene un coefficiente di resa cellulare pari a 0,820  $g_x g_s^{-1}$ . Inoltre, secondo Barbosa *et al.* (1988), la stechiometria della trasformazione microaerobica dello xilosio in xilitolo in *C. guilliermondii* è:

$$126 \text{ xilosio} + 3O_2 + 6ADP + 6P_i + 48H_2O \rightarrow 114 \text{ xilitolo} + 6ATP + 60CO_2 \quad (19)$$

Essendo il peso molecolare dello xilitolo pari a 152 g/mole, si calcolano  $Y_{P/S} = 0,917 g_p g_s^{-1}$  e  $Y_{P/X} = 1,118 g_p g_x^{-1}$ . Riportando i valori di  $k_v$ , stimati come  $Q_p/Y_{P/X}$ , in funzione della temperatura (Tabella 2), si osserva un andamento a campana sia per la produttività volumetrica che per quella specifica, con una temperatura ottimale di 30°C. L'andamento di questi dati può essere spiegato in base alle stesse ipotesi su cui si fonda il modello termodinamico. A questo scopo, è stato costruito un diagramma semilogaritmico con i valori otte-

nuti di  $\ln k_v$  contro  $1/T$  (Fig. 2). Da esso sono state individuate due rette di equazione:

$$Y_1 = \left(\frac{1}{T}\right) = p_1 + q_1 \frac{1}{T} = \ln A - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} = 23.155 - 7422.3 \cdot T^{-1} \quad (20)$$

$$Y_2 = \left(\frac{1}{T}\right) = p_2 + q_2 \frac{1}{T} = \ln \frac{A}{B} - \left(\frac{\Delta H^\ddagger_p}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger_r}{R}\right) \frac{1}{T} = 12.682 - 3422.6 \cdot T^{-1} \quad (21)$$

da cui sono stati ricavati i parametri di attivazione e termodinamici riassunti in Tabella 3.

Il valore dell'entalpia di attivazione della reazione enzimatica  $DH^\ddagger$  (61,7 kJ mole<sup>-1</sup>) è confrontabile con quelli riscontrabili per altri sistemi enzimatici (Aiba *et al.*, 1973; Al-Asheh and Duvniak, 1994; Roels, 1983; Sizer, 1944). In particolare esso risulta piuttosto vicino al valore di 57,7 kJ mole<sup>-1</sup> ottenuto per l'entalpia di attivazione della stessa fermentazione svolta da *D. hansenii* (Converti and Domínguez, 2001). L'elevato valore dell'entalpia standard di inattivazione termica  $DH_D^\circ$  (90,3 kJ mole<sup>-1</sup>) conferma la fondatezza dell'assunzione che l'inattivazione termica sia un fenomeno correlato alla denaturazione dell'enzima e suggerisce una certa protezione dell'enzima contro questa denaturazione, derivante dalla sua naturale collocazione all'interno della cellula. Un'ulteriore conferma di questa assunzione viene dal valore dell'entropia di attivazione della produzione di xilitolo  $DS^\ddagger$  (-120,1 J mole<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), che ha lo stesso segno negativo di quelli stimati da Sizer (1944) per alcune reazioni specifiche catalizzate da enzimi. Ciò è in accordo con l'ipotesi della formazione di un complesso enzima-substrato, che comporta una riduzione del numero di gradi di libertà del sistema durante la formazione del complesso. Il valore dell'entropia standard dell'inattivazione termica  $DS_D^\circ$  (70,9 J mole<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) è positivo e molto piccolo, il che indica che questo fenomeno provoca solo un piccolo aumento nel disordine della struttura terziaria dell'enzima; in altri termini, sembrerebbe che molti dei legami elettrostatici che stabilizzano la for-

ma attiva dell'enzima XR, siano ancora presenti nella forma inattiva.

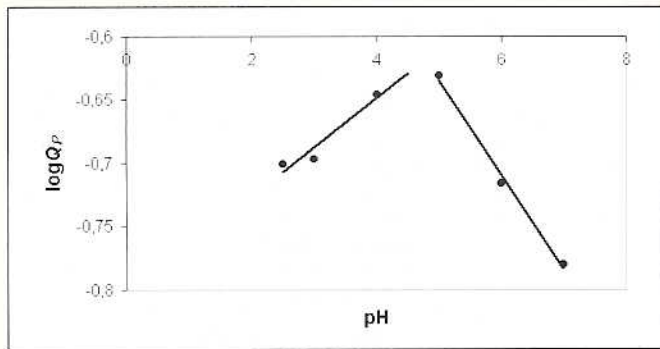


Figura 1 - Andamento della produttività specifica dello xilitolo in funzione del pH.

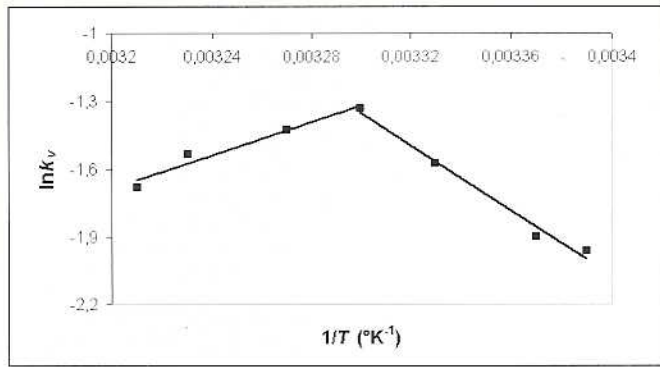


Figura 2 - Dipendenza della produttività dello xilitolo dalla temperatura.

Tabella 1 - Risultati delle prove di produzione continua di xilitolo condotte a diversi pH mediante *C. guilliermondii* ( $T = 30^\circ C$ ;  $D = 0,053 h^{-1}$ )

pH	$X$ ( $g L^{-1}$ )	$(dP/dt)_{max}$ ( $g L^{-1} h^{-1}$ )	$Q_p$ ( $g g_x^{-1} h^{-1}$ )	$\log_{10} Q_p$
2,5	2,27	0,45	0,199	-0,701
3,0	2,35	0,47	0,201	-0,697
4,0	2,40	0,54	0,226	-0,646
5,0	2,50	0,58	0,234	-0,631
6,0	2,38	0,46	0,192	-0,716
7,0	1,80	0,33	0,183	-0,780

Tabella 2 - Risultati delle prove di produzione continua di xilitolo condotte a diverse temperature mediante *C. guilliermondii* (pH = 5,0;  $D = 0,053 h^{-1}$ )

$T$ ( $^\circ C$ )	$1/T$ ( $K^{-1}$ )	$X$ ( $g L^{-1}$ )	$(dP/dt)_{max}$ ( $g L^{-1} h^{-1}$ )	$Q_p$ ( $g g_x^{-1} h^{-1}$ )	$k_v$ ( $h^{-1}$ )	$\ln k_v$
22	0,00339	3,23	0,51	0,16	0,141	-1,961
24	0,00337	3,27	0,54	0,17	0,149	-1,900
27	0,00333	2,51	0,58	0,23	0,208	-1,571
30	0,00330	2,23	0,66	0,29	0,264	-1,333
33	0,00327	2,15	0,58	0,27	0,240	-1,426
37	0,00323	2,01	0,48	0,24	0,215	-1,534
39	0,00321	1,97	0,41	0,21	0,186	-1,681

Tabella 3 - Parametri termodinamici della produzione continua di xilitolo mediante *C. guilliermondii*

Parametri di attivazione	$\Delta H^\# = 61,7 \text{ kJ mole}^{-1}$	$\Delta S^\# = -120,0 \text{ J mole}^{-1} K^{-1}$
Parametri di inattivazione	$\Delta H^\#_D = 90,3 \text{ kJ mole}^{-1}$	$\Delta S^\#_D = 297,8 \text{ J mole}^{-1} K^{-1}$

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. 1973. *Biochemical Engineering*, 2nd ed. New York: Academic Press, p. 92-127.
- Al-Asheh S., Duviniak Z. 1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnol.* 14: 223-233.
- Amaral-Collaço M.T., Gírio F.M., Peito M.A. 1989. Utilization of the hemicellulose fraction of agro-industrial residues by yeasts. In: *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. pp. 221-230, Elsevier London.
- Barbosa M.F.S., Medeiros M.B., de Mancilha I.M., Schneider H., Lee H. 1988. *J. Ind. Microbiol.* 3: 241-251.
- Converti A., Domínguez J.M. 2001. Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 39-45.
- Dietzemuller G., Kubicek C.P., Wohrer W., Rohr M. 1984. Xylitol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 195-198.

- Gírio F.M., Peito M.A., Amaral Collaço M.T. 1990. Xylitol production by fungi. An enzymatic test for screening good xylitol producer fungi. In: Grassi G., Gosse G., dos Santos G., editors, *Biomass for Energy and Industry*, vol 2, Elsevier, Amsterdam.
- Prior B.A., Killan S.G., du Perez J.C. 1989. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Proc. Biochem.* 24: 21-32.
- Roels J.A. 1983. *Energetics and Kinetics in Biotechnology*, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam.
- Sizer I.W. 1944. Temperature activation and inactivation of the crystalline catalase hydrogen peroxide system. *J. Biol. Chem.* 154: 461-466.
- Villadsen J., Chand S., Bisaria V.S., Ramachandran K.B. 1990. Enzyme reactions and technology. In: T.K. Ghose, editor, *Bioprocess Computations in Biotechnology*, Vol. 1, pp. 109-138, Ellis Horwood Ltd, Chichester.