



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

---

**IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Kluyveromyces  
marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045:  
CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE AÇÚCAR  
INVERTIDO EM BIORREATOR**

**FABRICIO COUTINHO DE PAULA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada).

**Janeiro - 2007**

**IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Kluyveromyces  
marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045:  
CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE AÇÚCAR  
INVERTIDO EM BIORREATOR**

**FABRICIO COUTINHO DE PAULA**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus  
de Rio Claro, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
concentração: Microbiologia Aplicada).**

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Janeiro de 2007**

**IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE *Kluyveromyces  
marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045:  
CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE AÇÚCAR  
INVERTIDO EM BIORREATOR**

**FABRICIO COUTINHO DE PAULA**

Orientador: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Bociências da Universidade Estadual  
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus  
de Rio Claro, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
concentração: Microbiologia Aplicada).**

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Janeiro de 2007**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Jonas Contiero (Orientador)  
IB/Unesp-Rio Claro

Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi  
UEL-Londrina

Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães  
USP-Ribeirão Preto

*Dedico esta dissertação aos meus pais,  
Elias e Sebastiana, por seu carinho,  
dedicação e pelo amor incondicional.*

*“...O tempo não é algo que se pode voltar atrás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, invés de esperar que alguém lhe traga flores...  
...Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder todo o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar”.*

*(O Menestrel – William Shakespeare).*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível. Agradeço-lhe todos os dias por existir e poder participar de valiosos momentos, assim como este, quando me encontro a desempenhar uma tarefa tão importante na vida: agradecer.

Agradeço ao Prof. Dr. Jonas, por permitir que fizesse parte de seu grupo de pesquisa, pela sua paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti e à Profa. Dra. Eleonora Carmona, por seus valiosos conselhos no exame de qualificação.

A Profa. Dr. Maria Antonia Celligoi e ao Prof. Dr. Luis Henrique Guimarães, por suas avaliações em minha defesa de dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Industrial, que de alguma forma ajudaram ou incentivaram meu trabalho: Márcia Cazzeta, Siddhartha, Maria Paula, Guilherme, Mariana, Roberta, Gustavo, Gervásio, Daniel e Márcia Nietsche.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia: Beto, Zito, Luiza e Ângela. Sem estes nosso trabalho seria um pouco mais complexo.

Pelo incentivo intelectual e moral, eu agradeço aos meus amigos: Carlinhos, Bissesto, Denílson, Alê, Rodolfo, Bauru, Edsão, Fernando, Carlão, Renata, Ronaldão, Magali, Teco, Edi e Rodrigo.

Um agradecimento especial aos meus irmãos Vinícius e Lara.

Agradeço a Carolina, por seu incentivo moral, mas acima de tudo, por mudar minhas perspectivas de vida.

Agradeço a CNPq pelo recurso financeiro.

Por fim, a todas às pessoas que deveria ter agradecido, mas acabei esquecendo.

A vocês todos uma pequena amostra de toda a minha gratidão!

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>I-INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>II-OBJETIVOS</b> .....	4
<b>III-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>III.1-Enzimas</b> .....	5
<b>III.2-Inulinases</b> .....	7
III.2.1-Definição.....	7
III.2.2-Aplicações das inulinases.....	8
III.2.3-Substratos utilizados na produção de inulinase.....	10
III.2.4-Microrganismos produtores de inulinases.....	10
III.2.5-Produção de inulinase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	15
<b>III.3-Imobilização enzimática</b> .....	17
III.3.1-Definição e classificação das enzimas imobilizadas.....	17
III.3.2-Aplicações das enzimas imobilizadas.....	18
III.3.3-Reatores para enzimas imobilizadas.....	20
III.3.4-Imobilização de inulinases.....	21



<b>IV-MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>IV.1-Obtenção do caldo enzimático.....</b>	<b>23</b>
IV.1.1-Microrganismo.....	23
IV.1.2-Cultivo em batelada alimentada.....	23
IV.1.3-Caldo enzimático.....	24
<b>IV.2-Determinação de açúcares redutores.....</b>	<b>24</b>
IV.2.1-Determinação de açúcares redutores.....	24
IV.2.2-Determinação das taxas de conversão de sacarose.....	24
<b>IV.3-Determinação da atividade e atividade específica da enzima inulinase.....</b>	<b>24</b>
IV.3.1-Determinação da atividade da inulinase livre.....	24
IV.3.2-Determinação da atividade específica e conteúdo protéico total.....	25
IV.3.3-Determinação da atividade da inulinase e proteína imobilizados no suporte.....	25
IV.3.4-Determinação da atividade da inulinase no derivado do processo de imobilização.....	25
IV.3.5-Determinação da eficiência da imobilização enzimática.....	25
<b>IV.4-Imobilização do caldo enzimático em diferentes suportes.....</b>	<b>25</b>
IV.4.1-Imobilização em carvão ativado, por adsorção.....	25
IV.4.2-Imobilização em carvão ativado, por adsorção, mediante tratamento com etanol.....	26
IV.4.3-Imobilização em diatomito, por adsorção.....	26
IV.4.4-Imobilização em casca de ovo, por adsorção.....	26
IV.4.5-Imobilização em casca de ovo com glutaraldeído.....	26
IV.4.6-Imobilização em resina amberlite XAD-2, por adsorção.....	26
IV.4.7-Imobilização em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente.....	27
IV.4.8-Imobilização do caldo parcialmente purificado, por uma coluna com carvão ativado, em sílica de porosidade controlada.....	27
IV.4.8.1-Filtração do caldo enzimático em coluna com carvão ativado.....	27

IV.4.8.2-Imobilização do caldo parcialmente purificado em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente.....	27
IV.4.9-Imobilização em resina amberlite XAD-2, por ligação covalente.....	27
IV.4.10-Imobilização em gelatina.....	28
<b>IV.5-Otimização das condições de imobilização em gelatina.....</b>	<b>28</b>
<b>IV.6-Determinação do pH ótimo de atividade da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>28</b>
<b>IV.7-Determinação da temperatura ótima de atividade e estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>28</b>
<b>IV.8-Determinação da energia de ativação da inulinase livre e imobilizada.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.9-Cálculos das constantes <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math> da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.10-Capacidade de reutilização da inulinase imobilizada em gelatina.....</b>	<b>29</b>
<b>IV.11-Reator tubular com inulinase imobilizada em gelatina (leito empacotado).....</b>	<b>29</b>
<b>IV.12-Cromatografia de camada delgada.....</b>	<b>30</b>
<b>V-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>V.1-Imobilização do caldo enzimático em diferentes suportes.....</b>	<b>31</b>
V.1.1-Imobilização em carvão ativado, por adsorção.....	31
V.1.2-Imobilização em carvão ativado, por adsorção, mediante tratamento com etanol.....	32
V.1.3-Imobilização em diatomito, por adsorção.....	33
V.1.4-Imobilização em casca de ovo, por adsorção.....	34
V.1.5-Imobilização em casca de ovo com glutaraldeído.....	35
V.1.6-Imobilização em resina amberlite XAD-2, por adsorção.....	36
V.1.7-Imobilização em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente.....	37

V.1.8-Imobilização do caldo parcialmente purificado, por uma coluna com carvão ativado, em sílica de porosidade controlada.....	38
V.1.8.1-Filtração do caldo enzimático em coluna com carvão ativado.....	38
V.1.8.2-Imobilização do caldo parcialmente purificado em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente.....	40
V.1.9-Imobilização em resina amberlite XAD-2, por ligação covalente.....	41
V.1.10-Imobilização em gelatina.....	42
<b>V.2-Comparação entre os resultados obtidos nos processos de imobilização enzimática.....</b>	<b>43</b>
<b>V.3-Otimização das condições de imobilização em gelatina.....</b>	<b>45</b>
<b>V.4-Determinação do pH ótimo de atividade da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>46</b>
<b>V.5-Determinação da temperatura ótima de atividade da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>47</b>
<b>V.6-Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>48</b>
<b>V.7-Determinação da energia de ativação da inulinase livre e imobilizada.....</b>	<b>51</b>
<b>V.8-Cálculos das constantes <math>K_m</math> e <math>V_{max}</math> da inulinase livre e imobilizada em gelatina.....</b>	<b>52</b>
<b>V.9-Capacidade de reutilização da inulinase imobilizada em gelatina.....</b>	<b>53</b>
<b>V.10-Reator tubular com inulinase imobilizada em gelatina (leito empacotado).....</b>	<b>54</b>
<b>V.11-Cromatografia de camada delgada.....</b>	<b>56</b>
<b>VI-CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> -Microorganismos produtores de inulinase.....	12
<b>Tabela 2</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em carvão ativado.....	32
<b>Tabela 3</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em carvão ativado, com etanol.....	33
<b>Tabela 4</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em diatomito.....	34
<b>Tabela 5</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em casca de ovo.....	35
<b>Tabela 6</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em casca de ovo, com glutaraldeído.....	36
<b>Tabela 7</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em amberlite XAD-2, por adsorção.....	37
<b>Tabela 8</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em sílica de porosidade controlada, caldo bruto.....	38
<b>Tabela 9</b> -Purificação parcial da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em carvão ativado.....	40

<b>Tabela 10</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em sílica de porosidade controlada, caldo parcialmente purificado.....	41
<b>Tabela 11</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em amberlite XAD-2, por ligação covalente.....	42
<b>Tabela 12</b> -Eficiência da imobilização da inulinase de <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em gelatina.....	43
<b>Tabela 13</b> -Eficiência da imobilização enzimática em diferentes suportes.....	44
<b>Tabela 14</b> -Avaliação da quantidade ideal de inulinase imobilizada em gelatina.....	45
<b>Tabela 15</b> -Avaliação do tamanho ideal das partículas de gelatina no processo de imobilização.....	46
<b>Tabela 16</b> -Avaliação da capacidade de reutilização da inulinase imobilizada em gelatina.....	54
<b>Tabela 17</b> -Valores de RF (fator de retenção) apresentados pelos padrões e amostras na cromatografia de camada delgada.....	56

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> -Classificação dos métodos de imobilização enzimática.....	19
<b>Figura 2</b> -Atividade enzimática da inulinase livre e imobilizada em diferentes pHs de reação, utilizando os tampões citrato-fosfato (2,5-6,5) e fosfato (7,0-8,0), a 45 °C.....	47
<b>Figura 3</b> -Atividade da inulinase livre e imobilizada em diferentes temperaturas de reação.....	48
<b>Figura 4</b> -Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada a 45 °C.....	49
<b>Figura 5</b> -Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada a 50 °C.....	50
<b>Figura 6</b> -Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada a 55 °C.....	50
<b>Figura 7</b> -Regressão linear do logaritmo natural das velocidades de reação em função do inverso da temperatura para a obtenção da energia de ativação da inulinase livre.....	51
<b>Figura 8</b> -Regressão linear do logaritmo natural das velocidades de reação em função do inverso da temperatura para a obtenção da energia de ativação da inulinase imobilizada.....	52
<b>Figura 9</b> -Representação gráfica de Lineweaver-Burk para determinação de $K_m$ e $V_{max}$ da inulinase livre e imobilizada.....	53
<b>Figura 10</b> -Imagem do Reator com inulinase imobilizada em gelatina.....	55

**Figura 11**-Eficiência do reator com inulinase imobilizada em gelatina.....55

**Figura 12**-Cromatografia de camada delgada: análise qualitativa dos produtos obtidos durante as bioconversões no reator tubular nos tempos 52 (1), 104 (2), 205 (3), 302 (4), 425 (5), 518 (6), 639 (7) e 782 (8) horas. Padrões: frutose (F), glicose (G) e sacarose (S).....57

## RESUMO

O interesse pela inulinase iniciou-se com a descoberta de sua habilidade de hidrolisar inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura. A frutose é considerada uma alternativa segura como adoçante em relação à sacarose, sendo largamente utilizada na indústria de alimentos. As inulinases são geralmente termoestáveis e comercialmente viáveis para aplicações industriais. Entretanto, uma produção contínua de frutose requer a utilização de uma inulinase imobilizada. Neste trabalho, o caldo fermentado, isento de células, de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi imobilizado em vários suportes: carvão ativado, diatomito, casca de ovo, amberlite, sílica de porosidade controlada e gelatina. A mais alta taxa de imobilização foi obtida em gelatina (82,60%). Os métodos restantes avaliados não foram bem sucedidos, seja pela ausência de ligação protéica ou perda de atividade provocados pelo processo de imobilização. O pH ótimo da inulinase imobilizada foi o mesmo da enzima livre (3,5). As temperaturas ótimas foram 55 °C para a enzima livre e 60 °C para a inulinase imobilizada. O gráfico de Arrhenius apresentou-se linear e as energias de ativação foram 56,20 KJ/mol.°K (enzima livre) e 20,27 KJ/mol.°K (enzima imobilizada). Os parâmetros cinéticos foram calculados pelo gráfico de Lineweaver-Burk e os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram de 20,68 mg/mL e 37,73 UA/mg para a enzima livre; e 50,05 mg/mL e 31,64 UA/mg para a enzima imobilizada, respectivamente. A estabilidade operacional da inulinase imobilizada foi avaliada em reator tubular de leito fixo, durante 782 horas, apresentando 58,12% de atividade enzimática residual. Foi realizada uma cromatografia de camada delgada para uma análise qualitativa dos produtos da reação.

**Palavras-chave:** imobilização, inulinase, açúcar invertido, *Kluyveromyces marxianus*



## ABSTRACT

The interest for inulinase began when it was discovered its ability to hydrolyse inulin, a vegetal polymer, in fructose practically pure. Fructose is considered as a safe alternative sweetener to sucrose, widely used in food industries. The inulinases are usually thermostable and commercially available for industrial applications. However, a continuous production of fructose requires the use of an immobilized inulinase. In this work, the crude enzyme broth free cells from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* was immobilized on various supports: activated carbon, diatomite, hen egg shell, amberlite, porous silica and gelatin. The highest immobilization yield was obtained in gelatin (82,60%). The remaining methods screened were not successful either because no protein binding occurred or immobilization process resulted in activity loss. The optimum pH of immobilized inulinase remained the same as that of free enzyme (3,5). The optimum temperatures were 55 °C for free enzyme and 60 °C for the immobilized inulinase. The Arrhenius plot were linear and activation energies were 56,20 KJ/mol.°K (Free enzyme) and 20,27 KJ/mol.°K (Immobilized enzyme). The kinetic parameters were calculated from Lineweaver-Burk plots and the values of  $K_m$  and  $V_{max}$  were 20,68 mg/mL and 37,73 UA/mg for free inulinase; and 50,05 mg/mL and 31,64 UA/mg for immobilized enzyme, respectively. The operational stability of the immobilized inulinase was studied in continuous fixed bed column reactor for 782 hours with 58,12% of residual activity. Thin layer chromatography was used for qualitative analysis of the reaction products.

**Key words:** immobilization, inulinase, inverted sugar, *Kluyveromyces marxianus*

## **I-INTRODUÇÃO**

As enzimas foram utilizadas por milhares de anos na forma de preparações brutas de origem vegetal, animal ou microbiana, sem que sua natureza essencial fosse conhecida. Somente em meados do século XX surgiu, de maneira criteriosa, o uso de enzimas em processos industriais (SAID & PIETRO, 2002).

O desenvolvimento de tecnologias de produção, extração e purificação tornaram crescente a utilização de enzimas microbianas, sendo as mesmas amplamente empregadas nas indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Atualmente, o mercado de enzimas representa um dos maiores setores da indústria de biotecnologia, gerando uma renda anual de bilhões de dólares, com aplicações na indústria de amido (45%), detergentes (34%), têxteis (11%), polpa e papel (1,2%) (STROH, 1998). Entre estes, o mercado enzimático produtor de xarope de frutose atinge cerca de US\$ 1 bilhão (ROZELL, 1999).

As enzimas microbianas podem ser classificadas em três maiores campos de aplicação: aquelas utilizadas para sintetizar compostos; outras específicas para reações de bioconversão; e algumas capazes de hidrolisar polímeros em monômeros de interesse econômico. A inulinase pertence a esta última classe de enzimas, apresentando a capacidade de hidrolisar inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

A frutose vem tornando-se uma alternativa cada vez melhor como substância adoçante em relação à sacarose, pois é menos cariogênica, pode ser melhor indicada para diabéticos, devido ao seu maior poder adoçante, além de mascarar o sabor residual

amargo provocado pela sacarina (VANDAMME & DERYCKE, 1983). A sacarose é um importante adoçante utilizado em todo o mundo, porém implica em alguns aspectos negativos, contribuindo para a arteriosclerose, levando a obesidade, devido ao alto teor calórico, e ao ser contra-indicado para a maioria das pessoas diabéticas. Uma extensiva busca tem sido realizada para identificar adoçantes com baixo poder calórico, e ausente de efeitos tóxicos. A frutose por ocorrer naturalmente em mel e frutas vem sendo largamente testada para ser aplicada em alimentos (VANDAMME & DERYCKE, 1983). O xarope de frutose é normalmente obtido do amido de milho ou batata. A produção de frutose obtida pela inulinase microbiana oferece uma alternativa viável em comparação com sua produção convencional, a qual necessita de pelo menos três etapas enzimáticas, incluindo a ação de  $\alpha$ -amilases, amiloglicosídeos e glicose isomerases, produzindo cerca de 45% de frutose. Além de ocorrer através de uma única fase enzimática, a produção de frutose pela inulinase possui um rendimento superior a 95% na obtenção deste produto (VANDAMME & DERYCKE, 1983). A hidrólise enzimática ainda evita gastos com grandes quantidades de ácidos e energia requeridos pelo processo de hidrólise química, que provocam propriedades indesejáveis no xarope obtido, como sabores e odores residuais, coloração escura devido à caramelização do açúcar e reação de Maillard com proteínas. Além disso, o uso de minerais ácidos e subsequente neutralização acabam por interferir nas etapas posteriores de purificação do produto de interesse (VERACHTERT & DE MOT, 1990).

A produção de inulinase pode ser obtida a partir de fungos, como *Aspergillus niger* (DERYCKE & VANDAMME, 1984; VISWANATHAN & KULKARNI, 1995) e bactérias, como *Arthrobacter* sp. (KANG *et al.*, 1998) e *Xanthomonas* sp. (PARK *et al.*, 1999). No entanto, as leveduras são citadas como os microrganismos mais promissores para a produção desta enzima.

As inulinases de levedura mais estudadas são aquelas do gênero *Kluyveromyces* (*K. marxianus* var. *marxianus*, entre os quais são incluídos *K. marxianus* e *K. fragilis* se estendendo a *K. marxianus* var. *lactis* e *K. marxianus* var. *bulgaricus*). Essas leveduras são consideradas ideais na produção de inulinases, pois crescem rapidamente em altas concentrações celulares e produzem grandes quantidades desta enzima. As inulinases de *K. marxianus* possuem capacidade de hidrolisar tanto inulina, como sacarose, rafinose e levanas (SNYDER & PHAFF, 1960), apresentando alta atividade para sacarose e

rafinose e obtendo melhores resultados que as invertases (VERACHTERT & DE MOT, 1990).

Embora muitas vantagens sejam apresentadas pela catálise enzimática, sua utilização em processos industriais tem sido limitada devido à baixa estabilidade operacional e ao custo elevado na obtenção da enzima e no processo de separação entre o produto, substrato e enzima, ao final da reação. Na maioria das vezes, a eliminação da enzima e de outras proteínas é realizada por meio de variações de pH ou tratamento térmico, resultando na desnaturação da enzima e conseqüente perda da atividade, dessa forma, impedindo sua reutilização em experimentos posteriores (ZANIN & MORAES, 2004).

Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas e reunir suas vantagens sobre os catalisadores químicos, como alta especificidade pelo substrato e redução de subprodutos indesejáveis, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional, através de ligações destas a suportes sólidos insolúveis ou por ligações entre seus grupos químicos. Esta técnica é conhecida como imobilização enzimática e permite a obtenção de um sistema enzimático estável e contínuo (ZANIN & MORAES, 2004).

Vários autores têm avaliado sistemas com inulinase imobilizada (GUPTA *et al.*, 1992; KIM, BYUN, & UHM, 1982; NAKAMURA *et al.*, 1995; PETERS & KERKHOOF, 1983; WENLING, HUIYING, & SHIYUAN, 1999; YUN *et al.*, 1997; YUN *et al.*, 2000) ou de células imobilizadas com atividade inulinolítica (BARRANCO-FLORIDO *et al.*, 2001; YUN *et al.*, 1999). A utilização de um método de imobilização simples, eficiente e de baixo custo seria a solução para um experimento em larga escala (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; SCHIMID *et al.*, 2001). Dessa forma, este presente trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes métodos de imobilização da enzima inulinase, visando desenvolver um sistema de reação com inulinase imobilizada para a produção de açúcar invertido (glicose e frutose), utilizando sacarose como substrato.

## II-OBJETIVOS

Os objetivos deste presente trabalho foram:

- Produção da enzima inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus*.
- Estudo de métodos de imobilização da inulinase (extrato bruto) em diferentes suportes.
- Estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da inulinase livre e imobilizada.
- Estudo da estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada.
- Estudo dos parâmetros cinéticos da inulinase livre e imobilizada.
- Estudo da inulinase imobilizada em reator tubular (leito empacotado), visando à produção de açúcares redutores.

### **III-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **III.1-Enzimas**

As enzimas são macromoléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas (SAID & PIETRO, 2002). Com a exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas conhecidas são proteínas, altamente especializadas e com extraordinário poder catalítico, quando comparadas a catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Dessa forma, as enzimas possuem um alto grau de seletividade por seus substratos e aceleram reações químicas, podendo elevar suas taxas de velocidade da ordem de  $10^5$  até  $10^{17}$  (NELSON & COX, 2000).

As enzimas são imprescindíveis nos processos bioquímicos, pois catalisam centenas de reações pelas quais moléculas de nutrientes são degradadas e transformadas nos sistemas biológicos. Além disso, as enzimas reguladoras atuam de maneira altamente organizada sobre as vias metabólicas, produzindo uma harmoniosa interação entre os diferentes processos necessários à manutenção da vida. Portanto, o estudo das enzimas apresenta grande importância prática, seja em algumas doenças provocadas por desordem genética, onde ocorre a ausência ou deficiência de uma ou mais enzimas, ou em outras enfermidades causadas pelo excesso de atividade destas. Diagnósticos de diversas doenças são obtidos por exames que quantificam a atividade de determinadas enzimas no plasma sanguíneo, eritrócitos ou em amostras de tecidos vivos. Vários medicamentos exercem seus efeitos biológicos através da interação com enzimas. Contudo, a importância das enzimas não se limita apenas à medicina e indústria

farmacêutica. A ação catalítica destas macromoléculas tornou-se um grande atrativo para a indústria química, de alimentos e agricultura (NELSON & COX, 2000).

A aplicação das enzimas em produtos e processos industriais ganhou maior importância a partir do início do século XX, com os avanços tecnológicos e científicos em áreas como a bioquímica. Com isso, o mercado de enzimas tornou-se mais atrativo, sendo as mesmas comercializadas e empregadas em larga escala (SAID & PIETRO, 2004).

A substituição de catalisadores químicos em processos industriais por enzimas, deve-se principalmente às condições brandas de pH e temperatura que estas atuam. A utilização de enzimas pode reverter em benefícios econômicos do processo, como consequência da redução de tempo e de energia elétrica gastos, assim como na preservação de tanques reacionais, não mais submetidos a altas pressões, temperaturas e corrosões. Além disso, devido sua biodegradabilidade, as enzimas passaram a reduzir a quantidade de rejeitos industriais, os quais comprometem o meio ambiente. Estas macromoléculas, por serem mais específicas em suas reações, comparadas aos catalisadores sintéticos, proporcionam poucas reações secundárias e menor formação de resíduos no produto final, aumentando a qualidade de produção e reduzindo a poluição (SAID & PIETRO, 2004).

A maioria das enzimas aplicadas industrialmente, aproximadamente 75 %, são hidrolases, utilizadas na despolimerização de substâncias naturais. Entre as enzimas classificadas como hidrolases, as proteases dominam o mercado enzimático, representando cerca de 40% de todas as enzimas comercializadas. As proteases são empregadas em vários setores como a indústria de alimentos, detergentes, couro e farmacêutica. O segundo grande grupo de hidrolases com aplicação industrial é composto pelas carbohidrases, utilizadas em cervejarias, panificação, na indústria do amido, têxtil e de papel. Além destes setores, estas enzimas têm sido utilizadas na fabricação de ração animal, em biotransformação de produtos químicos, em análises diagnósticas e no tratamento de resíduos. Outras classes de enzimas encontram aplicação industrial pontual, como a glicose isomerase, as oxidases, glicose oxidase, colesterol oxidase e algumas enzimas usadas em técnicas de biologia molecular (SAID & PIETRO, 2004).

Como pôde ser verificado o mercado enzimático é bastante promissor e a utilização de enzimas no setor de alimentos domina o mercado destes insumos. Neste segmento industrial, liderando as aplicações, encontram-se os xaropes derivados de amido, bebidas alcoólicas, produtos de laticínios e alimentos para animais. Com menor aplicação, ainda se encontram produtos de padaria; processamento de frutas, vegetais e proteínas; e extração de óleos vegetais. Dentre as enzimas utilizadas no setor de alimentos, as inulinases microbianas podem ser destacadas como uma importante classe de enzimas industriais, a qual vem recebendo especial atenção nos últimos anos (CONTIERO, 2004).

### **III.2-Inulinases**

#### **III.2.1-Definição**

Várias enzimas produzidas por microrganismos e vegetais são capazes de degradar frutanas. De acordo com seus mecanismos catalíticos, estas enzimas podem ser incluídas entre as transferases (EC 2. 4. 1), com produção de anidrido difrutose, ou entre as hidrolases (EC 3. 2. 1), com hidrólise de polifrutosanas baseada em um processo de endo ou exo-degradação. Além disso, essas enzimas podem ser distinguidas pela sua especificidade por ligações  $\beta$ -1,2 (encontradas em inulina e sacarose),  $\beta$ -2,6 (encontradas em levanas) ou para ambos os tipos de ligação (VERACHTERT & DE MOT, 1990).

As inulinases são enzimas que degradam ligações  $\beta$ -2,1 de cadeias de  $\beta$ -frutanas através de um processo de endo ou exo-degradação. As endo-inulinases ( $\beta$ -D-frutano frutanohidrolase, EC 3. 2. 1. 7) hidrolisam ligações internas da inulina para formar inulo-oligossacarídeos como produto principal da reação, enquanto as exo- inulinases ( $\beta$ -D-frutopiranosídeo frutohidrolase, EC 3. 2. 1. 80) hidrolisam ligações frutofuranosídicas sequencialmente (UHM *et al.*, 1999).

Entre diversos microrganismos capazes de utilizar ou fermentar inulina, um seletivo grupo de leveduras vem sendo exaustivamente estudado por produzirem  $\beta$ -frutosidases não específicas, capazes de hidrolisar levanas, inulina, sacarose, rafinose, etc. Muitos autores classificam estas enzimas entre as endo-inulinases: EC 3. 2. 1. 7. Há uma clara diferença de especificidade destas inulinases em comparação às exo-



inulinasas provenientes de plantas, pois apresentam uma alta atividade sobre a sacarose e rafinose, sendo algumas vezes classificadas entre as invertases (EC 3. 2. 1. 26). Porém, as invertases apresentam atividade nula ou muito baixa sobre a inulina, resultando em uma razão I/S (atividade enzimática sobre inulina/sacarose) com valores baixos, enquanto as inulinasas apresentam boa atividade sobre a sacarose e inulina, resultando em uma alta razão I/S (VERACHTERT & DE MOT, 1990).

### III.2.2-Aplicações das inulinasas

A maior aplicação de inulinasas está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose. A indústria utiliza-se de grande quantidade de polissacarídeos naturais e novas fontes têm sido procuradas com o intuito de suprir a demanda. Assim, a utilização das inulinasas apresenta-se como uma alternativa para sua obtenção (CONTIERO, 2004).

A dificuldade de se encontrar um adoçante sintético, sem restrições médicas, transformou a frutose, um monossacarídeo natural, em uma viável alternativa, devido a um considerável número de vantagens em relação a outros adoçantes. A frutose possui um poder adoçante até 1,5 vezes maior, comparado à sacarose (HANOVER & WHITE, 1993). Ao apresentar maior poder adoçante, a frutose pode ser utilizada em menores quantidades, reduzindo o consumo de calorias, contribuindo para a diminuição da hiperglicemia, sendo assim, mais tolerada por diabéticos. Devido a seu elevado poder higroscópico, é atrativa na produção de confeitos, também sendo utilizada na indústria de sorvetes, para evitar a textura granular provocada pela cristalização da lactose (VICENTE, 2000). Além disso, a frutose é adicionada em muitos adoçantes sintéticos, como a sacarina, com o objetivo de mascarar o sabor residual amargo provocado por esta substância (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

A frutose pode ser encontrada em muitos vegetais, associada com demais açúcares, como a glicose, em frutas, raízes como a beterraba e em caules como a cana-de-açúcar. Em sua forma polimérica, a inulina, é encontrada em algumas raízes e tubérculos, como a alcachofra, chicória, dália e dente-de-leão. A frutose também ocorre naturalmente no mel (VICENTE, 2000).

Atualmente, o processo mais utilizado na obtenção de xaropes de frutose, envolve a hidrólise ácida do amido de milho, incluindo a ação de enzimas como  $\alpha$ -

amilases e amiloglicosidasas para melhorar o rendimento desta reação. Em seguida, ocorre a isomerização, através da ação de glicose isomerases, obtendo-se uma mistura equimolar de frutose e glicose. Após a obtenção do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido), a separação da frutose é realizada em colunas cromatográficas, produzindo-se xaropes com 42 até 90% de frutose, denominados como “high fructose corn syrup (HFCS)” (VICENTE, 2000).

Um outro processo para a produção de xaropes com alto teor de frutose foi desenvolvido, utilizando a inulina como matéria-prima. A conversão deste polímero ocorre a partir de uma única etapa, empregando-se a enzima inulinase, apresentando um rendimento superior a 95% na produção de frutose. A hidrólise realizada pela inulinase tornou-se uma boa alternativa, considerando-se a qualidade do produto obtido, pois o processo de hidrólise ácida provoca propriedades indesejáveis no xarope obtido, como sabores e odores residuais, coloração escura, devido à caramelização de açúcares, e reação de Maillard com proteínas. A utilização de minerais ácidos e subsequente neutralização dos mesmos interferem nas etapas posteriores de purificação do produto final (VERACHTERT & DE MOT, 1990). Contudo, a falta de produção em larga escala de inulina acaba por limitar a produção de xaropes com alto teor de frutose a partir deste polímero. A mais promissora fonte de inulina é a Alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) e, apesar das técnicas de plantio e colheita bem definidas, a escala de produção é muito baixa em comparação a outras fontes de açúcar, como a cana-de-açúcar e o milho (VICENTE, 2000).

Para países produtores de cana-de-açúcar, como o Brasil, surge como nova possibilidade, o emprego de sacarose como matéria-prima na produção de xaropes de frutose. A obtenção de açúcar invertido (glicose e frutose) a partir da sacarose pode ser efetuada através da inversão química por ácidos ou pela inversão biológica, utilizando inulinases ou invertases. Industrialmente, a inversão química torna-se um processo mais simples, porém, a conversões biológicas a partir da ação enzimática resultam em produtos de maior qualidade (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

As inulinases também são aplicadas na produção de inulo-oligossacarídeos, bem como na produção de ácido glicônico, pululana e acetona butanol. Porém, a produção de xaropes de frutose através destas enzimas continua a ser a alternativa mais promissora,

principalmente quando comparada às outras formas de obtenção destes produtos (CONTIERO, 2004).

### III.2.3-Substratos utilizados na produção de inulinase

A inulina é o substrato mais utilizado como fonte de carbono para a produção de inulinase. Porém, uma grande variedade de insumos de cultivo é empregada para uma diversidade de microrganismos, na obtenção desta enzima. Entre estes, podemos destacar substâncias puras (monossacarídeo, dissacarídeo ou polissacarídeo), compostos ricos em inulina e substratos mistos. Em microrganismos produtores de inulinase com atividade de invertase, pode ser utilizado inulina ou sacarose como fontes de carbono no meio de cultivo. Outros substratos também são utilizados, como derivados de inulina, amidalina, arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, melesitose, metanol, rafinose, salicina e amido (CONTIERO, 2004).

Raízes e tubérculos de várias plantas da família Compositae e Gramineae, ou frutanas e inulina, isoladas destas, tem sido utilizados como fonte de carbono para a produção da enzima. Comercialmente, a inulina é obtida dos tubérculos de dália (*Dahlia pinnata*), os quais possuem elevadas quantidades deste produto. Entretanto, esta planta é bastante sensível a condições climáticas, o que dificulta a sua colheita (VERACHTERT & DE MOT, 1990). Dessa forma, ricos extratos de inulina podem ser preparados a partir de tubérculos de alcaçofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) e raízes de chicória (*Cichorium intybus*). O processo de extração pode ser efetuado através de pressionamento e filtração de raízes de chicória ou cubos de tubérculos de alcachofra (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979).

### III.2.4-Microrganismos produtores de inulinases

A produção da enzima inulinase pode ser obtida a partir de um grande número de microrganismos (Tabela 1). No entanto, as cepas de leveduras *Kluyveromyces* sp. e do fungo filamentosos *Aspergillus* sp. têm obtido maior ênfase na produção desta enzima. Alguns microrganismos isolados a partir da rizosfera de dália apresentam potencial para a produção de inulinase. Entre estes, pode-se destacar aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Cladosporium* e *Streptomyces* (VISWANATHAN & KULKARNI, 1995).

Snyder & Phaff (1960) foram os primeiros a relatar a produção de uma enzima de *Saccharomyces fragilis* capaz de hidrolisar o polímero inulina, descobrindo, após a purificação desta enzima (SNYDER & PHAFF, 1962), seu mecanismo de endo-degradação sobre a molécula de inulina.

Dentre os microrganismos estudados, as leveduras têm sido amplamente utilizadas na produção de inulinases. Muitos trabalhos foram divulgados para as cepas de *Candida* sp., *Sporotrichum* sp., *Pichia* sp. e *Kluyveromyces* sp. Negro & Kito (1973) observaram a atividade intra e extra-celular da inulinase de *Candida kefir*, cujo níveis de produção acompanhavam o crescimento celular. Guiraud *et al.* (1980) relataram sobre a inulinase produzida por *Candida salmanticensis*, presente na parede celular, a qual é facilmente liberada no meio de cultura durante a fermentação. Passador-Gurgel *et al.* (1996) isolaram linhagens de *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e *Schizosaccharomyces*, com boas produções de inulinase para quatro cepas de *Kluyveromyces*, apresentando melhores produções da enzima.

Também foram relatadas diversas linhagens de fungos produtores de inulinase. Ferreira *et al.* (1991) observaram a atividade da inulinase de *Cladosporium cladosporioides*, com crescimento celular em diferentes substratos, através de um mecanismo de exo-degradação. A produção máxima de inulinase extra-celular de *Fusarium oxysporum* foi observada em 9 dias por Gupta *et al.* (1990). Ongen-Baysal *et al.* (1994) obtiveram uma alta produção de inulinase em cultivo com *Aspergillus niger*, enquanto Poorna & Kulkarni (1995), ao verificar os parâmetros do processo de produção, também observaram uma produção elevada de inulinase por este microrganismo. Ettalibi & Baratti (1990) caracterizaram três tipos de  $\beta$ -frutósídease provenientes de uma linhagem de *Aspergillus ficuum*.

A obtenção de cepas mutantes, com o intuito de melhorar a produção da enzima, tem sido verificada por pesquisadores. Nakamura *et al.* (1994) produziram uma linhagem mutante a partir de *Aspergillus niger* 12, através de radiação  $\gamma$  com cobalto 60. A cepa mutante *A. niger* 817 apresentou uma atividade 4 vezes maior em relação à linhagem selvagem.

A produção de inulinase por bactérias não são comparáveis à imensidade de leveduras e fungos produtores desta enzima (GILL, 2005). Porém, vários autores verificaram a produção de inulinase envolvendo gêneros de bactéria, como *Arthrobacter*

sp., *Bacillus* sp. e *Streptococcus* sp. (CONTIERO, 2004). Elyachioui *et al.* (1992) estudaram as exo-inulinases de *Arthrobacter* sp. relatando a termoestabilidade destas enzimas. Foram também verificadas produções de inulinase por *Streptococcus salivarius* (TAKAHASHI *et al.*, 1985), a qual apresentava atividade de hidrólise sobre inulina, levanas, sacarose e rafinose. Katto *et al.* (1999) relataram a produção de inulinase por *Bacillus stearothermophilus* KP 1289, uma bactéria termofílica, com atividade ótima a 60 °C. Ainda produzem inulinase, bactérias do gênero *Clostridium* sp. (LOOTEN *et al.*, 1987), *Pseudomonas* sp. (YUN *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 1998), *Xanthomonas* sp. (PARK *et al.*, 1999) e *Staphylococcus* sp. (SELVAKUMAR & PANDEY, 1999).

Algumas fontes de inulinase entre os actinomicetos são relatadas para *Actinomyces logisporus*, *Acyanoalbus lavendotoliae* (VANDAMME & DERYCKE, 1983) e *Streptomyces* sp. (VISWANATHAN & KULKARNI, 1996; GILL *et al.*, 2003).

**Tabela 1** – Microrganismos produtores de inulinase.

<b>Leveduras</b>	<b>Natureza da enzima</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Candida kefir</i>	Extracelular (E)	Manzoni & Cavazzoni (1998)
<i>Candida kefir</i> 0616	E	Negoro & Kito (1973)
<i>Candida kefir</i> DSM 79106	E	Guiraud & Galzy (1990)
<i>Candida macedoniensis</i>	E	Guiraud & Galzy (1990)
<i>Candida pseudotropicalis</i> IP513	E	Guiraud & Galzy (1990)
<i>Debaryomyces cantarellii</i> capriotti	Intracelular (I)	Beluche <i>et al.</i> (1980); Viswanathan & Kulkarni (1995)
<i>Debaryomyces phaffi</i> capriotti	I	Viswanathan & Kulkarni (1995)
<i>Hansenula beijerinckii</i> LG	E	Viswanathan & Kulkarni (1995)

<i>Kluyveromyces fragilis</i>	E, I	Workman & Day (1984); Manzoni & Cavazzoni (1988)
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ATCC 12424	E, I	Thonart <i>et al.</i> (1988)
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CCY 51-1-4	E, I	Abraham & Klaushofer (1989)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E, I	Nahm & Byum (1977)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	E	Rouwenhorst <i>et al.</i> (1991)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	E, I	Kushi <i>et al.</i> (2000)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	E	Passador <i>et al.</i> (1996)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 52466	E	Selvakumar & Pandey (1998)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CDBB-L-278	E	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> (1995)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS 6556	E	Rouwenhorst <i>et al.</i> (1991)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UDC (FST) 55-82	E, I	Parekh & Margaritis (1986)
<i>Pichia polymorpha</i>	E	Chautard <i>et al.</i> (1981)
<i>Saccharomyces fermentati</i> CBS 818	E	Guiraud (1981); Willians & Ziobro (1982)
<i>Saccharomyces florenzani</i>	E	Willians & Ziobro (1982)
<i>Schwanniomyces alluvius</i> CBS 4516	E	Guiraud (1981); Willians & Ziobro (1982)
<b>Fungos</b>	<b>Natureza da enzima</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	E	Viswanathan & Kulkarni (1995); Yun <i>et al.</i> (1997)
<i>Aspergillus aureus</i> MTCC 151	E	Gupta <i>et al.</i> (1994)

<i>Aspergillus ficcum</i>	E	Kim & Rhee (1989)
<i>Aspergillus fischeri</i> MTCC 150	E	Gupta <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus flavus</i> MTCC 277	E	Gupta <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus nidulans</i> MTCC 344	E	Ongen-Baysal <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus niger</i> A42	E	Gupta <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 281	E	Nakamura <i>et al.</i> (1995)
<i>Aspergillus niger</i> mutant UV1	E	Viswanathan & Kulkarni (1995)
<i>Aspergillus niger</i> mutant 817	E	Poorna & Kulkarni (1995)
<i>Aspergillus niger van teighem</i>	E	Thonart <i>et al.</i> (1988)
<i>Cladosporium pannorum</i>	E	Gupta <i>et al.</i> (1988); Gupta <i>et al.</i> (1990)
<i>Fusarium oxysporum</i> NCIM 1072	E	Viswanathan & Kulkarni (1995)
<i>Penicillium</i> sp.	E	Barthomeuf <i>et al.</i> (1991)
<i>Penicillium rugulosum</i>	E	Ohta <i>et al.</i> (2002)
<i>Rhizopus</i> sp.	E	Yokota <i>et al.</i> (1995)
<b>Bactérias</b>	<b>Natureza da enzima</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Arthrobacter</i> sp.	E	Elyachioui <i>et al.</i> (1992)
<i>Bacillus</i> sp.	E, I	Baron <i>et al.</i> (1996)
<i>Bacillus subtilis</i> 430 A	E, I	Vullo <i>et al.</i> (1991)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> IFP 912	E, I	Drent & Gottschal (1991)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ABKn8	E	Drent <i>et al.</i> (1991)
<i>Clostridium thermoautothrophicum</i> T1	E, I	Vullo <i>et al.</i> (1991)
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	E, I	Vullo <i>et al.</i> (1990)

<i>Escherichia coli</i>	I	Efsthou <i>et al.</i> (1986); Yun <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas</i> sp. 65	E	Cho <i>et al.</i> (2001)
<i>Staphylococcus</i> sp.	E	Allais <i>et al.</i> (1987); Selvakumar & Pandey (1998)
<i>Streptomyces rochei</i> E87	E, I	Yokota <i>et al.</i> (1995)
<i>Xanthomonas</i> sp.	E	Negoro & Kito (1973); Park <i>et al.</i> (1999); Cho <i>et al.</i> (2001)
<i>Xanthomonas oryzae</i> nº 5	E	Cho & Yun (2002)

Fonte: CONTIERO, 2004

### III.2.5-Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*

As leveduras produtoras de inulinase possuem a capacidade de crescer em diversas fontes de carbono. No entanto, maiores produções da enzima são verificadas em cultivos com inulina. Porém, devido ao custo deste polímero, a utilização de meios de cultivo com inulina pura não é economicamente viável em escala industrial. Dessa forma, extratos de algumas plantas ricas em inulina, como a Alcachofra de Jerusalém e o Agave, têm sido utilizados na produção da enzima. Contudo, a excreção enzimática é limitada nestes meios de cultivo, os quais interferem em posteriores etapas de purificação do produto (BYUM & NAHM, 1978). Em fermentações contínuas, outros substratos, além da inulina, podem ser utilizados com boas taxas de produção de inulinase. Porém, estes processos de produção da enzima são influenciados por vários problemas, relacionados à repressão catabólica enzimática (GROOTWASSINK & HEWITT, 1983).

A composição do meio de cultivo afeta sensivelmente a excreção enzimática realizada por estes microrganismos. Meios de fermentação contendo compostos nitrogenados, como extrato de levedura, aminoácidos e uréia, aumentam as taxas de produção da enzima. Nos estudos de Snyder & Phaff (1960), a adição de sulfato de amônio aumentou 10 vezes a produção de inulinase em *K. fragilis*. O pH de cultivo também é um importante fator na produção desta enzima. Em meios de cultivo com pHs



próximos de 5,5, pode ser observado um aumento na produção de inulinases em diversas linhagens de microrganismos (VERACHTERT & DE MOT, 1990).

As inulinases de leveduras mais estudadas são aquelas produzidas pelo gênero *Kluyveromyces*, sendo descritos como os microrganismos mais promissores na produção desta enzima. As leveduras deste gênero podem crescer rapidamente atingindo alta concentração celular em um curto período de tempo, produzindo grandes quantidades da enzima inulinase (HENSING *et al.*, 1994).

A levedura *Kluyveromyces marxianus*, também conhecida como *K. fragilis* e *Saccharomyces fragilis* (CRUZ-GUERRERO *et al.*, 1999; CORTEZ *et al.*, 2005), possui uma habilidade natural de excretar inulinase, uma propriedade desejável para baixar custos com técnicas de extração enzimática (ROUWENHORST *et al.*, 1990). Embora, esta levedura apresente maior produção da enzima quando se utiliza a inulina como fonte de carbono (SNYDER & PHAFF, 1960), outros substratos vêm sendo empregados com sucesso na produção de inulinase por *K. marxianus*. Yee & Blanch (1992), utilizando sacarose como fonte de carbono em cultivo contínuo, relataram uma atividade enzimática 2,7 vezes maior do que em inulina.

Rouwenhorst *et al.* (1988) e Hewitt & Grootwassink (1984), em seus estudos da produção de inulinase por estas leveduras, observaram um aumento nos níveis de produção da enzima, em cultivos contínuos e batelada, ao empregar fontes limitantes de carbono. Dessa forma, concluiu-se que baixas concentrações de carboidratos são um pré-requisito para uma melhor síntese desta enzima. Aparentemente, o aumento da concentração de açúcares redutores no início da fermentação leva à repressão e queda da atividade enzimática (ONGEN-BAYSAL *et al.*, 1994).

A fermentação em batelada alimentada (“fed-batch”) é um processo efetivo para cultivos onde ocorre inibição pelo substrato, produto da reação ou repressão catabólica (LIU *et al.*, 2000). Essa fermentação caracteriza-se pela suplementação de nutrientes durante o cultivo. A adição de substrato provoca uma extensão da fase de crescimento, possibilitando o aumento da biomassa e concentração de metabólitos (KLEMAN, 1994). Vários microrganismos têm sido utilizados neste tipo de fermentação, como *Pichia pastoris* (SHAY *et al.*, 1987), *S. cerevisiae* (SHAY *et al.*, 1987; TURNER *et al.*, 1991; HENSING *et al.*, 1995), *Candida* sp. (SUZUKI *et al.*, 1985; SHAY *et al.*, 1987),

*Streptomyces* sp (SUZUKI *et al.*, 1987). Entre estes, incluem *Kluyveromyces lactis* (BLONDEAU *et al.*, 1994) e *Kluyveromyces marxianus* (HENSING *et al.*, 1994).

A inulinase obtida no cultivo da levedura *K. marxianus* possui atividade sobre a inulina, sacarose, rafinose e levanas. A biossíntese e excreção da inulinase de *K. marxianus* possuem várias características em comum com a invertase de *S. cerevisiae*. A maior parte desta enzima está associada à parede celular (KIRBY & DAVIES, 1970), cuja arquitetura é mantida por ligações dissulfeto (WORKMAN & DAY, 1984). A atividade enzimática pode ser detectada, tanto em meio de cultura, como na preparação de células, pois possui atividade intra e extra-celular. Durante o crescimento celular a excreção desta enzima é limitada, sendo mais elevada na fase estacionária (VERACHTERT & DE MOT, 1990). As propriedades das enzimas intra e extra-celular são similares, assumindo caráter de glicoproteína, contendo 66% de carboidratos (WORKMAN & DAY, 1983). A liberação de frutose pela enzima ocorre a partir do final da molécula de substrato, resultando no aparecimento de açúcares redutores paralelamente a produção de frutose. A glicose aparece quando as moléculas do substrato foram completamente degradadas. A reação de liberação de frutose ocorre, em sua maior parte, como um mecanismo de cadeia simples, sob uma série de pHs e condições de temperatura. Contudo, em baixos valores de pH (pH 3) pode aparecer uma ação de multicadeias (SNYDER & PHAFF, 1962).

### **III.3-Imobilização enzimática**

#### **III.3.1-Definição e classificação das enzimas imobilizadas**

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia, e maior atividade catalítica, sua utilização em processos industriais têm sido limitada. Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e a dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos. Com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, têm-se estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio de reação, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (ZANIN & MORAES, 2004).

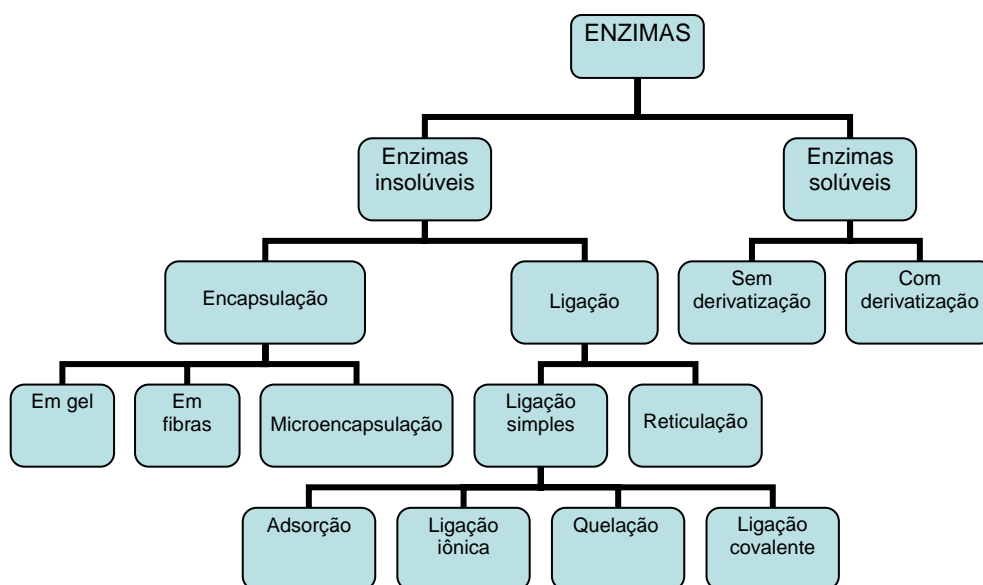
A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971: “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (WINGARD, 1972). A enzima pode estar ligada a um suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz. Assim, obtêm-se um sistema catalítico facilmente separável do meio reacional, podendo ser utilizado em reatores contínuos ou em repetidas bateladas, enquanto este sistema enzimático estiver ativo (ZANIN & MORAES, 2004).

Na literatura encontram-se diversas classificações para enzimas imobilizadas, todas em concordância com a definição apresentada. Na figura 1, está esquematizada a classificação dos métodos de imobilização proposta por Kenedy & Roig, que procura integrar a natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado. O diagrama apresenta a subdivisão entre enzimas modificadas pela técnica de imobilização, tornando-se insolúveis através de ligações a suportes ou reticulação (“crosslinking”); e enzimas que permaneceram solúveis após o processo de imobilização. Entre estas, incluem as enzimas solúveis imobilizadas sem derivatização, utilizadas em reatores com membranas semipermeáveis de ultrafiltração e fibras ocas, as quais retêm a enzima em seu interior; e enzimas solúveis imobilizadas com derivatização, através da ligação da enzima com outra macromolécula, apresentando mobilidade restrita, apesar de permanecer solúvel no meio de reação (ZANIN & MORAES, 2004).

### III.3.2-Aplicações das enzimas imobilizadas

As enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores de purificação do mesmo. A imobilização enzimática permite a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das

propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade ao pH e a temperatura (ASSIS, 2004).



**Figura 1** – Classificação dos métodos de imobilização enzimática (ZANIN & MORAES, 2004).

O processo de imobilização enzimática teve início em 1916, quando Nelson & Griffin realizaram a adsorção da enzima invertase em carvão ativado, com retenção de sua atividade catalítica. Apesar desta descoberta, a primeira tentativa de imobilizar uma enzima, com a finalidade de melhorar suas propriedades, foi efetuada em 1953 por Grubhofer e Schleith, quando carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease foram imobilizadas em uma resina de poliaminopoliestireno diazotizada (VICENTE, 2000).

A partir de 1960, foi observado um aumento progressivo nas publicações de trabalhos científicos com enzimas imobilizadas, refletindo o interesse mundial despertado por esta tecnologia. Entretanto, o primeiro processo industrial de imobilização enzimática foi implantando no Japão em 1969, para a produção de L-aminoácidos; seguido da aplicação de glicose isomerase imobilizada, implantada nos Estados Unidos em 1972, para a isomerização de glicose em frutose. Desde então, novos processos de imobilização e novas aplicações industriais têm sido relatados na literatura (ZANIN & MORAES, 2004).

Dentre as aplicações das enzimas imobilizadas em larga escala, pode-se citar a produção de xaropes de glicose e frutose a partir do amido de milho; a produção do ácido 6-amino penicilínico e penicilina semi-sintética, com a enzima penicilina-G ou L-acilase; produção de acrilamida empregando células imobilizadas; produção de aspartame com termolisina imobilizada; e a hidrólise de lactose presente no soro de leite (ZANIN & MOARAES, 2004).

Apesar do grande número de trabalhos publicados no campo da imobilização enzimática, poucos processos são aplicados em escala industrial. Tal fato deve-se ao elevado custo dos suportes e reagentes utilizados no processo de imobilização, baixa eficiência de retenção catalítica da maioria dos processos, baixa estabilidade operacional de muitas enzimas imobilizadas e equipamentos de operação contínua pouco versáteis. Além disso, a pequena demanda do produto, normalmente, não incentiva a produção em larga escala (ZANIN & MORAES, 2004).

### III.3.3-Reatores para enzimas imobilizadas

Entre todas as possíveis aplicações para as enzimas imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante. Em processos industriais, a utilização de enzimas imobilizadas é realizada em reatores similares aos utilizados na catálise química (VICENTE, 2000).

Os reatores enzimáticos podem ser classificados em reatores para sistemas particulados, reatores tipo placas e reatores lineares, os quais podem operar em modo batelada ou contínuo.

Os reatores para sistemas particulados compreendem os tipos: tanque agitado batelada, tanque agitado contínuo, leito fixo e leito fluidizado. A vantagem destes tipos

de reatores é o fato da enzima ser independente do tamanho e forma do reator, apresentando grande flexibilidade, pois as partículas de biocatalisadores se acomodam à forma do reator. No tanque agitado batelada, as partículas são dispersas na solução com substrato, sendo a agitação promovida por agitadores mecânicos ou orbitais. No final da reação o biocatalisador é separado da solução por centrifugação ou filtração. Nos reatores contínuos (tanque agitado contínuo, leito fixo e leito fluidizado), o biocatalisador é mantido no interior do reator, enquanto o fluido passa através do leito de forma contínua.

Os reatores de placa são caracterizados pelo escoamento do substrato através de uma membrana disposta em camadas ou espiral, a qual retém o biocatalisador em seu interior. Na classe de reatores lineares, encontram-se fibras arrançadas em diferentes configurações (ZANIN & MORAES, 2004).

#### III.3.4-Imobilização de inulinases

A imobilização de inulinases deve ser considerada devido a sua similaridade com as invertases, as quais têm sido imobilizadas com sucesso. Kierstan & Bucke (1977) avaliaram processos de imobilização para várias enzimas, incluindo a inulinase de *K. fragilis*, em gel de alginato de cálcio. Kim *et al.* (1979) imobilizaram a inulinase em Tygon e aminoetilcelulose, pelo método de ligação covalente, com a enzima imobilizada apresentando baixa estabilidade térmica. Guiraud *et al.* (1981) obtiveram 100 % da inulinase de *Debaryomyces phaffii* imobilizada em DEAE-celulose.

Workman & Day (1983) realizaram experimentos de imobilização com *K. fragilis*, utilizando glutaraldeído. Bajpai & Margaritis (1987) realizaram a imobilização da inulinase de *K. marxianus* por ligação metálica, com 72% de retenção da atividade enzimática original. A inulinase parcialmente purificada de *Kluyveromyces* sp. Y-85 foi imobilizada covalentemente em microesferas de polistireno (WENLING *et al.*, 1999) com retenção de 75% de sua atividade.

Kim & Rhee (1989) obtiveram uma eficiência de 55% da hidrólise de extratos de Alcachofra de Jerusalém, ao utilizar a inulinase imobilizada de *A. ficuum* em quitina, para reatores tubulares de leito fluidizado. Nakamura *et al.* (1995) imobilizaram uma preparação enzimática parcialmente purificada de *A. niger* mutant 817 em amino-cellulofine, obtendo uma taxa de imobilização de 96%. Kochhar *et al.* (1998)

imobilizaram a inulinase de *A. versicolor* em quitina e caseína, utilizando glutaraldeído, e em celulose, por ligação metálica (quelação). Ettalibi & Baratti (2001) obtiveram alta estabilidade térmica após a imobilização da inulinase de *A. ficcum* em vidro poroso, por ligação covalente, utilizando reagentes de silanização e reticulação, apresentando valores de 29% a 71% de proteínas aderidas ao suporte e conservando até 77,20% da atividade imobilizada. A temperatura ótima da enzima aumentou de 60 °C para 70°C. Yun *et al.* (2000) avaliaram vários suportes na imobilização da inulinase de *Pseudomonas* sp. Os melhores resultados de eficiência e estabilidade operacional foram obtidos para um suporte de polistireno.

Inulinases de *A. fumigatus* (GILL *et al.*, 2006b) e *A. niger* (ROCHA *et al.*, 2006) tem sido imobilizadas em resina Amberlite. Gill *et al.*(2006b) imobilizaram a inulinase de *A. fumigatus* em resinas Dowex e Amberlite, obtendo 63% e 39% de retenção da atividade enzimática, respectivamente. Em seus experimentos, ainda obtiveram total retenção enzimática ao imobilizar a inulinase em quitina e em matrizes de afinidade QAE-Sephadex e DEAE-Sephacel e Concanavalina A ligada a esferas de sílica aminoativadas. Kochhar *et al.* (1998), ao imobilizar a inulinase de *A. versicolor*, obtiveram 56% de retenção da atividade enzimática em quitina e 10% em caseína. Gupta *et al.* (1992) atingiram de 30% a 40% de retenção da atividade enzimática ao imobilizar a inulinase de *F. oxysporum* em DEAE-celulose. Gaspari *et al.* (1999) obtiveram seus melhores resultados ao imobilizar a inulinase de *K. marxianus* em sílica de porosidade controlada.

## **IV-MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.1-Obtenção do caldo enzimático**

#### **IV.1.1-Microrganismo**

Na realização deste trabalho foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, fornecida pelo Departamento de Engenharia de Alimentos-UNICAMP. O microrganismo foi preservado em tubos criogênicos com glicerol a 20%, sendo mantido sob congelamento.

#### **IV.1.2-Cultivo em batelada alimentada**

O experimento para obtenção do caldo enzimático foi realizado em reator de 5 litros, contendo 2 litros de meio de fermentação. O meio era constituído de sacarose 1%; extrato de levedura 0,5%; peptona 1%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5%;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15%;  $\text{KCl}$  0,12%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,07% (p/v); sendo esterilizado em autoclave a 121 °C durante 30 minutos. O inóculo foi mantido sob agitação a 180 rpm e 30 °C durante 16 horas, sendo equivalente a 10% do volume do meio reacional. O meio de alimentação era composto pelos mesmos nutrientes do meio de cultivo, porém com sacarose a 20% (p/v). O pH foi ajustado pela adição de ácido orto-fosfórico concentrado. A fermentação foi conduzida a 30 °C e pH 5,0 controlado pela adição de hidróxido de potássio 1 M. A taxa de aeração e a agitação foram elevadas ao longo do tempo chegando a 1,0 vvm e 600 rpm, respectivamente, segundo os melhores resultados de atividade enzimática obtidos por Cazzeta (2005).



#### IV.1.3-Caldo enzimático

Após o cultivo, o caldo resultante da fermentação foi centrifugado a 5600 x g por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado na determinação de atividade enzimática, açúcares redutores totais, proteínas e nos experimentos de imobilização enzimática.

### **IV.2-Determinação de açúcares redutores**

#### IV.2.1-Determinação de açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores das amostras analisadas foi efetuada pelo método de Miller (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico. Utilizou-se glicose como padrão.

#### IV.2.2-Determinação das taxas de conversão de sacarose

As taxas de conversão de sacarose em açúcares redutores, realizada pela enzima, foram expressas pela porcentagem da concentração de açúcares redutores produzidos na reação enzimática em relação à concentração de açúcares redutores totais, presentes no meio de reação.

### **IV.3-Determinação da atividade e atividade específica da enzima inulinase**

#### IV.3.1-Determinação da atividade da inulinase livre

A atividade enzimática da inulinase foi determinada de acordo com Suzuki *et al.* (1988), através da quantificação dos açúcares redutores formados durante a reação enzimática. Em um reator encamisado tipo “basket”, foram utilizados 5 mL de sacarose 2% (p/v); 2,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0; 1,5 mL de água destilada, adicionando 1 mL da amostra enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (UA) da inulinase, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

#### IV.3.2-Determinação da atividade específica e conteúdo protéico total

A proteína total foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. A atividade específica (AE) foi expressa em unidade de atividade (UA) por miligrama (mg) de proteína.

#### IV.3.3-Determinação da atividade da inulinase e proteína imobilizados no suporte

A atividade enzimática e proteína imobilizados foram determinados através da diferença de atividade da inulinase (UA) e proteína (mg), apresentados entre o caldo enzimático utilizado e o sobrenadante, resultante do processo de imobilização.

#### IV.3.4-Determinação da atividade da inulinase no derivado do processo de imobilização

Devido aos efeitos estéricos e conformacionais, ou mesmo desnaturação da enzima, resultantes de diversos métodos de imobilização, determinou-se a atividade da inulinase no derivado (complexo enzima-suporte), visando expressar a atividade enzimática imobilizada funcional retida no suporte. Esta atividade foi determinada experimentalmente nas mesmas condições do item IV.3.1, sendo expressa em unidade de atividade (UA) por grama (g) de derivado do processo de imobilização.

#### IV.3.5-Determinação da eficiência da imobilização enzimática

A eficiência da imobilização foi determinada através da razão entre as atividades específicas da inulinase no derivado do processo de imobilização e inulinase livre, sendo expressa em porcentagem.

### **IV.4-Imobilização do caldo enzimático em diferentes suportes**

#### IV.4.1-Imobilização em carvão ativado, por adsorção

O caldo enzimático foi imobilizado em carvão ativado (Carbomafra), com partículas de 1,19 mm a 1,68 mm. A solução com 2 mL de caldo, contendo 7,6 mg de proteína, foi deixada em contato com 300 mg de carvão ativado, durante 3 horas, a temperatura ambiente.

#### IV.4.2-Imobilização em carvão ativado, por adsorção, mediante tratamento com etanol

Realizou-se a imobilização do caldo enzimático em carvão ativado tratado com etanol, visando à remoção de possíveis compostos indesejáveis aderidos ao suporte. As condições de ensaio foram as mesmas do item IV.4.1.

#### IV.4.3-Imobilização em diatomito, por adsorção

A imobilização do caldo enzimático foi realizada em partículas de diatomito (Mallinckrodt). A solução enzimática, contendo 2 mL de caldo e 7,6 mg de proteína, foi deixada em contato com 300 mg de diatomito, durante 3 horas, a temperatura ambiente.

#### IV.4.4-Imobilização em casca de ovo, por adsorção

Imobilizou-se o caldo enzimático em casca de ovo segundo Nighojkar *et al* (1995). Uma solução com 10 mL de caldo (contendo 38 mg de proteína) foi adicionada a 500 mg de casca de ovo triturada, mantendo-se sob agitação constante, durante 48 horas e a 25 °C. O resíduo obtido após centrifugação (5600 x g durante 10 minutos) foi lavado com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0 até que não fosse detectada a presença de proteína nas águas de lavagem.

#### IV.4.5-Imobilização em casca de ovo com glutaraldeído

O caldo enzimático foi imobilizado segundo o item IV.4.4. Após este processo, adicionou-se glutaraldeído à solução, resultando numa concentração de 1,2 % (v/v). O resíduo obtido após centrifugação foi lavado com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0 até que não fosse detectada a presença de proteína nas águas de lavagem.

#### IV.4.6- Imobilização em resina amberlite XAD-2, por adsorção

O caldo enzimático foi imobilizado em resina amberlite XAD-2 da Supelco (Sigma-Aldrich Co.) com poro médio de 90 Å, 20-60 mesh. Inicialmente, a resina foi lavada com água destilada para remover os agentes de preservação, sendo posteriormente lavada com metanol para a remoção de compostos residuais. Uma solução, contendo 2 mL de caldo enzimático e com 7,6 mg de proteína, foi submetida ao contato com 100 mg de suporte, sob agitação constante, durante 3 horas a 25 °C.

#### IV.4.7-Imobilização em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente

O caldo enzimático foi imobilizado em sílica de porosidade controlada, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Gisela M. Zanin (Departamento de Engenharia Química - Universidade Estadual de Maringá), pelo método de ligação covalente de Weetall (1993); compreendendo as etapas de silanização do suporte com  $\gamma$ -aminopropil trietóxisilano 0,5% (v/v); ativação do suporte com agente bifuncional glurraldeído 2,5% (v/v); e imobilização da enzima, com adição de 20 mg de proteína por grama de suporte seco.

#### IV.4.8-Imobilização do caldo parcialmente purificado, por uma coluna com carvão ativado, em sílica de porosidade controlada

##### IV.4.8.1- Filtração do caldo enzimático em coluna com carvão ativado

Realizou-se uma filtração do caldo enzimático em uma coluna (23 x 1,4 cm) contendo 15g de carvão ativado com uma vazão de 15 mL/h, a temperatura ambiente. O caldo filtrado foi utilizado nos experimentos de imobilização em sílica de porosidade controlada, visando obter melhores resultados através da purificação parcial do caldo enzimático empregado nos processos de imobilização.

##### IV.4.8.2-Imobilização do caldo parcialmente purificado em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente

O caldo enzimático parcialmente purificado, através do processo de filtração em uma coluna com carvão ativado, foi submetido à imobilização em sílica de porosidade controlada nas mesmas condições do item IV.4.7.

#### IV.4.9-Imobilização em resina amberlite XAD-2, por ligação covalente

O caldo enzimático foi submetido à imobilização em resina amberlite XAD-2 pelo método de ligação covalente de Weetall (1993), nas mesmas condições do item IV.4.7.

#### IV.4.10-Imobilização em gelatina

Imobilizou-se o caldo enzimático em gelatina (J.T.Baker) pelo método de Assis *et al* (2004). Dissolveu-se 0,5 g de gelatina em 4,5 mL de água destilada, a 50 °C. Logo em seguida, adicionou-se a solução 0,5 mL do caldo enzimático (contendo 1,69 mg de proteína), sendo a mesma transferida para um recipiente de base alta e arrefecida lentamente até a solidificação. Cobriu-se a mistura resultante com 10 mL de uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, mantendo-a em contato durante 30 minutos. Após este processo, a solução de glutaraldeído foi removida e o gel resultante foi fracionado em cubos, sendo estes lavados e estocados em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0.

#### IV.5-Otimização das condições de imobilização em gelatina

Foram avaliadas variações no método de imobilização enzimática em gelatina, visando aumentar a eficiência deste processo. Ao invés de água, dissolveu-se a gelatina em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0. A solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) também foi preparada com tampão citrato-fosfato. Para verificar a quantidade ideal de caldo imobilizado, foram utilizados 0,5 mL e 1 mL de caldo, com 1,69 mg e 3,38 mg de proteína, respectivamente. Também foram avaliados diferentes tamanhos de partículas no fracionamento do gel resultante, utilizando-se cubos com arestas medindo aproximadamente 2 mm, 2,5 mm e 3 mm.

#### IV.6-Determinação do pH ótimo de atividade da inulinase livre e imobilizada em gelatina

O efeito do pH de reação na atividade da inulinase livre e imobilizada foi avaliado através da determinação da atividade enzimática em diferentes valores de pH, com tampão citrato-fosfato 0,05 M na faixa de 2,5-6,5 e tampão fosfato 0,05 M na faixa de 7,0-8,0.

#### IV.7-Determinação da temperatura ótima de atividade e estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada em gelatina

A temperatura ótima de atividade da inulinase livre e imobilizada foi obtida através da determinação da atividade enzimática em diferentes temperaturas, numa faixa

de 25 °C a 70 °C. A estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi avaliada incubando-se amostras enzimáticas nas temperaturas de 45 °C, 50 °C e 55°C durante 24 horas.

#### **IV.8-Determinação da energia de ativação da inulinase livre e imobilizada**

A energia de ativação ( $E_a$ ) para a inulinase livre e imobilizada foi obtida pela regressão linear do logaritmo natural das velocidades de reação em função do inverso da temperatura (°K), seguido da aplicação da equação de Arrhenius.

#### **IV.9-Cálculos das constantes $K_m$ e $V_{max}$ da inulinase livre e imobilizada em gelatina**

As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , características da inulinase livre e imobilizada, foram obtidas realizando-se a cinética enzimática em concentrações de sacarose numa faixa de 5,0-125 mg/mL, em pH 3,5 a 45 °C. Os cálculos dos valores das constantes cinéticas foram efetuados graficamente pelo método duplo recíproco de Lineweaver & Burk (1934).

#### **IV.10-Capacidade de reutilização da inulinase imobilizada em gelatina**

Em um reator tipo “basket”, foram realizados quatro ciclos de bioconversão para verificar se o suporte seria adequado ao uso contínuo. O meio de reação continha 5 mL de sacarose 2% (p/v), 2,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 3,5 e 2,5 mL de água destilada. Os ensaios foram conduzidos a 45 °C, sendo o meio reacional substituído por um novo meio após 8 horas de reação, quando eram verificadas a atividade enzimática residual e a taxa de conversão de sacarose em açúcares redutores (ciclos 1, 2, 3 e 4).

#### **IV.11-Reator tubular com inulinase imobilizada em gelatina (leito empacotado)**

Devido à inulinase imobilizada em gelatina ter apresentado resultados satisfatórios para o uso contínuo, estudou-se a eficiência desta em um reator do tipo tubular, com leito empacotado. O reator possuía uma capacidade de 15 mL, contendo 12,5 g de gelatina. O meio de alimentação foi constituído de sacarose 1% (p/v), com pH 3,5. Os experimentos foram conduzidos a uma temperatura de 45 °C e vazão de 25 mL/hora. A eficiência do reator foi expressa pelas taxas de conversão de sacarose em

açúcares redutores. As bioconversões foram realizadas até que a eficiência do reator apresentasse redução significativa.

#### **IV.12-Cromatografia de camada delgada**

A cromatografia de camada delgada foi realizada visando uma análise qualitativa dos produtos obtidos durante as bioconversões promovidas pela enzima imobilizada em gelatina, no reator tubular. Utilizou-se como fase móvel uma solução contendo n-butanol: etanol: água (5: 3: 2 v/v/v) e como agente revelador uma solução contendo orcinol 0,2% (p/v): ácido sulfúrico: metanol (1: 1: 9 v/v/v). Foram analisadas oito amostras referentes aos tempos 52, 104, 205, 302, 425, 518, 639 e 782 horas de reação contínua da inulinase no reator. Os padrões utilizados foram: frutose, glicose e sacarose.

## **V-RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **V.1-Imobilização do caldo enzimático em diferentes suportes**

Foram avaliados diferentes métodos de imobilização (item IV.4, Material e Métodos) utilizando como suportes partículas de carvão ativado, diatomito, e casca de ovo; resina amberlite XAD-2; sílica de porosidade controlada; e gelatina.

#### **V.1.1-Imobilização em carvão ativado, por adsorção**

Realizou-se a imobilização da inulinase em partículas de carvão ativado, obtendo-se uma eficiência 2,25 %. Como pode ser verificado na Tabela 2, este método de imobilização apresentou uma baixa retenção de atividade enzimática no derivado deste processo (8,00 UA/g) e uma alta absorção de proteína (6,95mg), demonstrando um maior potencial para a purificação do caldo enzimático.



**Tabela 2** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em carvão ativado.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>114,84 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>7,60 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>75,36 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>0,65 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>39,48 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>6,95 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>8,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,34 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>2,25%</b>

#### V.1.2-Imobilização em carvão ativado, por adsorção, mediante tratamento com etanol

A imobilização foi realizada em carvão ativado tratado com etanol, visando à remoção de possíveis compostos indesejáveis aderidos ao suporte, ou mesmo, dos agentes de preservação. Este pré-tratamento com etanol foi realizado na tentativa de aumentar a capacidade de absorção do suporte avaliado.

Embora este método tenha aumentado a eficiência do processo de imobilização em carvão ativado, apresentou baixa retenção de atividade enzimática no derivado da imobilização e uma menor absorção de proteína, comparada ao processo inicial (Tabela 3).

**Tabela 3** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em carvão ativado, com etanol.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>114,84 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>7,60 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>86,45 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>1,08 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>28,39 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>6,52 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>10,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,46 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>3,04 %</b>

#### V.1.3-Imobilização em diatomito, por adsorção

O método de imobilização em partículas de diatomito não apresentou qualquer eficiência, não sendo observado retenção de atividade enzimática e proteína no suporte avaliado (Tabela 4).

**Tabela 4** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em diatomito.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>114,84 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>7,60 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>114,84 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>7,60 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>0,00 %</b>

#### V.1.4-Imobilização em casca de ovo, por adsorção

Realizou-se o método de imobilização em casca de ovo, segundo o procedimento de Nighojkar *et al.* (1995). Na Tabela 5, observa-se que este processo não apresentou qualquer retenção da atividade enzimática e proteína neste suporte.

**Tabela 5** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em casca de ovo.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>574,20 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>38,00 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>574,20 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>38,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>0,00 %</b>

#### V.1.5-Imobilização em casca de ovo com glutaraldeído

O método de imobilização em casca de ovo foi realizado adicionando-se glutaraldeído ao final deste processo, como agente bifuncional reticulante, visando obter melhor resultado para esta metodologia de imobilização. Como pode ser verificado na Tabela 6, embora tenha ocorrido um decréscimo no valor inicial de atividade da inulinase, observado no sobrenadante, não houve retenção de proteína no suporte, demonstrando perda de atividade enzimática provocada pelo método utilizado. O derivado do processo de imobilização não apresentou qualquer atividade da inulinase.

**Tabela 6** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em casca de ovo, com glutaraldeído.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>574,20 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>38,00 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>537,53 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>38,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>36,67 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>0,00 %</b>

#### V.1.6- Imobilização em resina amberlite XAD-2, por adsorção

A Tabela 7 apresenta os resultados do processo de imobilização em resina amberlite XAD-2. Pode ser observado retenção de atividade enzimática (24,26 UA) e proteína (2,20 mg) no suporte. No entanto, a atividade da inulinase no derivado da imobilização foi 0,00 UA/g.

**Tabela 7** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em amberlite XAD-2, por adsorção.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>114,84 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>7,60 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>90,58 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>5,40 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>24,26 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>2,20 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>0,00 %</b>

#### V.1.7-Imobilização em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente

Realizou-se a imobilização em sílica de porosidade controlada através do método de Weetal (1993). O processo de imobilização utilizado não obteve qualquer retenção de atividade enzimática e proteína no suporte (Tabela 8).

**Tabela 8** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em sílica de porosidade controlada, caldo bruto.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>1297,69 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>83,62 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>1297,69 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>83,62 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>0,00 %</b>

V.1.8-Imobilização do caldo parcialmente purificado, por uma coluna com carvão ativado, em sílica de porosidade controlada

V.1.8.1- Filtração do caldo enzimático em coluna com carvão ativado

Devido aos resultados obtidos na imobilização com carvão ativado, apresentando baixa retenção da atividade enzimática e alta absorção de proteínas, provocando um aumento significativo na atividade específica do sobrenadante da imobilização, realizou-se uma filtração do caldo enzimático em uma coluna (23 x 1,4 cm) contendo 15 g de carvão ativado, com uma vazão de 15 mL/h, a temperatura ambiente.

Este processo de filtração foi realizado devido aos resultados insatisfatórios obtidos na imobilização em sílica de porosidade controlada, visando purificar

parcialmente o caldo enzimático e, conseqüentemente, tentar obter melhores resultados neste processo de imobilização.

Como se pode observar (Tabela 9), este método de purificação, em uma coluna com carvão ativado, resultou em um fator de purificação de 9,09 vezes, mantendo 74,14 % da atividade inicial da inulinase do caldo, além de ter possibilitado a imobilização em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente, a qual apresentou uma eficiência de 16,98 % (Tabela 10).

Muitas enzimas são purificadas parcialmente através da precipitação por sulfato de amônio, porém, os experimentos de Kushi *et al.* (2000) mostraram perda total da atividade da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus*, quando submetida a este processo. Melhores resultados para atividade específica foram obtidos na precipitação com solventes orgânicos, como acetona (18,80 UA/mg) e etanol (15,60 UA/mg). Gill *et al.* (2006a) obtiveram um fator de purificação de 5,40 vezes, conservando 30 % da atividade inicial da inulinase de *A. fumigatus*, ao precipitar o caldo enzimático com sulfato de amônio, apresentando uma atividade específica de 40,00 UA/mg. Em seus experimentos de imobilização, Gill *et al.* (2006b) purificaram parcialmente a inulinase de *A. fumigatus* através da precipitação do caldo enzimático com sulfato de amônio, seguido de uma cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. A enzima apresentou um fator de purificação de 10,00 vezes e atividade específica de 75,00 UA/mg de proteína.



**Tabela 9** – Purificação parcial da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em carvão ativado.

<b>Etapa de purificação</b>	<b>Atividade enzimática (UA/mL)</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>Atividade específica (UA/mg)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Fator de purificação (x)</b>
Caldo bruto	57,42	3,80	15,11	100,00	1,00
Caldo filtrado em carvão ativado	42,57	0,31	137,32	74,14	9,09

#### V.1.8.2-Imobilização do caldo parcialmente purificado em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente

A imobilização do caldo parcialmente purificado em carvão ativado foi realizada em sílica de porosidade controlada, através do método de Weetal (1993), empregado anteriormente na imobilização do caldo bruto. Embora o primeiro experimento de imobilização em sílica tenha obtido uma eficiência nula, a utilização do caldo enzimático parcialmente purificado resultou em uma eficiência de 16,98 % (Tabela 10).

**Tabela 10** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em sílica de porosidade controlada, caldo parcialmente purificado.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>2979,90 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>21,70 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>137,32 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>2551,91 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>19,90 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>427,99 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>1,8 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>15,97 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>23,32 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>16,98 %</b>

#### V.1.9-Imobilização em resina amberlite XAD-2, por ligação covalente

Realizou-se o método de imobilização, por ligação covalente, de Weetal (1993) para a resina amberlite XAD-2. Não foi observada qualquer atividade enzimática ou proteína imobilizada neste suporte (Tabela 11).

**Tabela 11** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em amberlite XAD-2, por ligação covalente.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>620,14 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>39,96 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>15,11 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>620,14 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>39,96 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>0,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>0,00 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>0,00 %</b>

#### V.1.10-Imobilização em gelatina

A imobilização do caldo enzimático em gelatina foi realizada através de encapsulação da enzima no gel resultante deste processo, seguido por tratamento com glutaraldeído para obtenção de ligações cruzadas, visando uma maior estabilidade da enzima e maior resistência mecânica para o suporte.

Na Tabela 12, observa-se uma eficiência de 82,60 % obtida neste processo de imobilização.

**Tabela 12** - Eficiência da imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em gelatina.

<b>Atividade total da inulinase livre (caldo enzimático)</b>	<b>27,30 UA</b>
<b>Proteína total do caldo</b>	<b>1,69 mg</b>
<b>Atividade específica da inulinase livre</b>	<b>16,15 UA/mg de proteína</b>
<b>Atividade da inulinase no sobrenadante da imobilização</b>	<b>0,00 UA</b>
<b>Proteína no sobrenadante da imobilização</b>	<b>0,00 mg</b>
<b>Atividade da inulinase imobilizada no suporte</b>	<b>27,30 UA</b>
<b>Proteína imobilizada no suporte</b>	<b>1,69 mg</b>
<b>Atividade da inulinase no derivado da imobilização</b>	<b>45,08 UA/g de derivado</b>
<b>Atividade específica no derivado da imobilização</b>	<b>13,34 UA/mg de proteína</b>
<b>Eficiência da imobilização</b>	<b>82,60 %</b>

## **V.2-Comparação entre os resultados obtidos nos processos de imobilização enzimática**

Como pode ser verificado na Tabela 13, o processo de imobilização em gelatina apresentou maior eficiência, atingindo 82,60 %. Os demais suportes avaliados apresentaram eficiência baixa ou nula.

Embora a utilização de um caldo parcialmente purificado tenha possibilitado a imobilização da enzima em sílica de porosidade controlada, a eficiência de 16,98 % apresentada neste processo de imobilização, por ligação covalente, tornou inviável a aplicação destas enzimas imobilizadas em um reator contínuo, comparado ao baixo custo, praticidade e eficiência apresentados pelo processo de imobilização em gelatina.

**Tabela 13** – Eficiência da imobilização enzimática em diferentes suportes.

<b>Suporte</b>	<b>Eficiência da imobilização (%)</b>
Carvão ativado	2,25
Carvão ativado, com etanol	3,04
Diatomito	0,00
Casca de ovo	0,00
Casca de ovo, com glutaraldeído	0,00
Amberlite XAD-2, adsorção	0,00
Amberlite XAD-2, ligação covalente	0,00
Sílica de porosidade controlada, caldo bruto	0,00
Sílica de porosidade controlada, caldo parcialmente purificado	16,98
Gelatina	82,60

### V.3-Otimização das condições de imobilização em gelatina

Devido à imobilização em gelatina ter apresentado maior eficiência, foram avaliadas variações na mesma, visando aperfeiçoar as condições deste processo. Ao invés de água, dissolveu-se a gelatina e preparou-se a solução de glutaraldeído 2,5% em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 4,0, em condições já descritas, provocando uma redução na eficiência da imobilização para 37,96%. Imobilizou-se 0,5 mL e 1mL de caldo enzimático, contendo 1,69 mg e 3,38 mg de proteína, respectivamente. Como pode ser verificado na Tabela 14, o aumento da quantidade de caldo resultou em uma diminuição da atividade específica da enzima imobilizada, reduzindo a eficiência no processo de imobilização. Também foram avaliados diferentes tamanhos de partículas no fracionamento do gel resultante. A maior eficiência foi obtida por partículas de gelatina com 2 mm (Tabela 15), evidenciando a influência do tamanho destas na atividade específica da enzima imobilizada.

**Tabela 14** – Avaliação da quantidade ideal de inulinase imobilizada em gelatina.

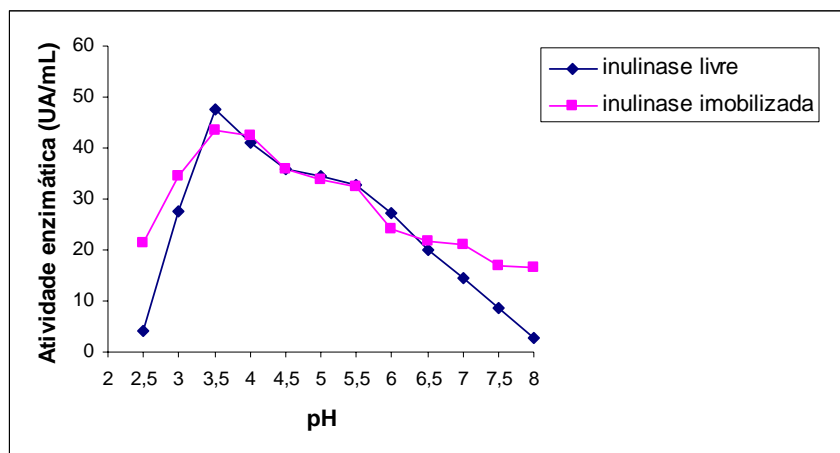
<b>Quantidade de caldo enzimático (mL)</b>	<b>Quantidade de proteína (mg)</b>	<b>Atividade específica (UA/mg)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
0,50	1,69	11,52	71,33
1,00	3,38	9,16	56,72

**Tabela 15** – Avaliação do tamanho ideal das partículas de gelatina no processo de imobilização.

<b>Tamanho da partícula de gelatina (mm)</b>	<b>Atividade específica (UA/mg)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
2,00	13,34	82,60
2,50	11,52	71,33
3,00	9,14	56,59

#### **V.4-Determinação do pH ótimo de atividade da inulinase livre e imobilizada em gelatina**

Avaliou-se o efeito do pH de reação na atividade da inulinase livre e imobilizada através da determinação da atividade enzimática em diferentes valores de pH, numa faixa de 2,5 a 8,0. As inulinasas livre e imobilizada apresentaram um ótimo de atividade enzimática em pH 3,5 (Figura 2). Kushi *et al.*(2000) obtiveram máxima atividade da inulinase purificada de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em pH 4,75. A inulinase comercial de *A. niger* apresentou um pH ótimo de 4,5 para a enzima livre e 5,5 para a enzima imobilizada em Amberlite (ROCHA *et al.*, 2006). Gill *et al.* (2006b) obtiveram o mesmo pH ótimo de 5,5 para inulinase livre de *A. fumigatus* e para a enzima imobilizada em quitina, caseína, DEAE-Sephacel e concanavalina A; enquanto a inulinase imobilizada em QAE-Sephadex apresentou um pH ótimo de 6,5. Ettalibi & Baratti (2001) obtiveram valores de pH ótimo de 4,7 para a inulinase livre de *A. ficuum* e 5,0 para a inulinase imobilizada em vidro poroso. Segundo Vandamme & Derycke (1983), as inulinasas de vários microrganismos apresentam pH ótimo numa faixa de 3,5 a 6,0.



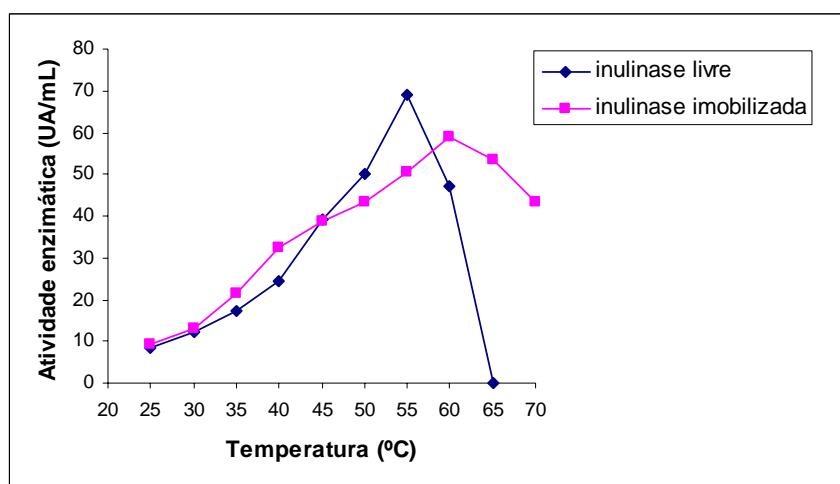
**Figura 2** – Atividade enzimática da inulinase livre e imobilizada em diferentes pHs de reação, utilizando os tampões citrato-fosfato (2,5-6,5) e fosfato (7,0-8,0), a 45 °C.

### V.5-Determinação da temperatura ótima de atividade da inulinase livre e imobilizada em gelatina

A temperatura ótima de atividade da inulinase livre e imobilizada foi determinada através da determinação da atividade enzimática numa faixa de temperatura de 25 °C a 70 °C. Como pode ser observado na figura 3, a inulinase livre e imobilizada apresentaram temperatura ótima de 55 °C e 60 °C, respectivamente. Kushi *et al.* (2000) obtiveram uma temperatura ótima de 55 °C para a inulinase livre de *K. marxianus* var. *bulgaricus*. A inulinase imobilizada de *A. fumigatus* apresentou uma temperatura ótima de 60 °C (GILL *et al.*, 2006b), enquanto as inulinasas imobilizadas de *K. marxianus* (BAJPAI & MARGARITIS, 1987), *F. oxysporum* (GUPTA *et al.*, 1992), *A. niger* (KOCHHAR *et al.*, 1999) e *A. candidus* (NAKAMURA *et al.*, 1995) apresentaram valores de temperatura ótima de 55 °C, 45 °C, 50 °C e 55 °C, respectivamente. Rocha *et al.* (2006) obtiveram atividade máxima da inulinase de *A. niger* a uma temperatura de 55 °C para enzima livre e 50 °C para a enzima imobilizada,



enquanto Catana *et al.* (2005) obtiveram temperaturas ótimas de 55 °C para a enzima livre e 60 °C para a enzima imobilizada, produzidas pelo mesmo microrganismo.



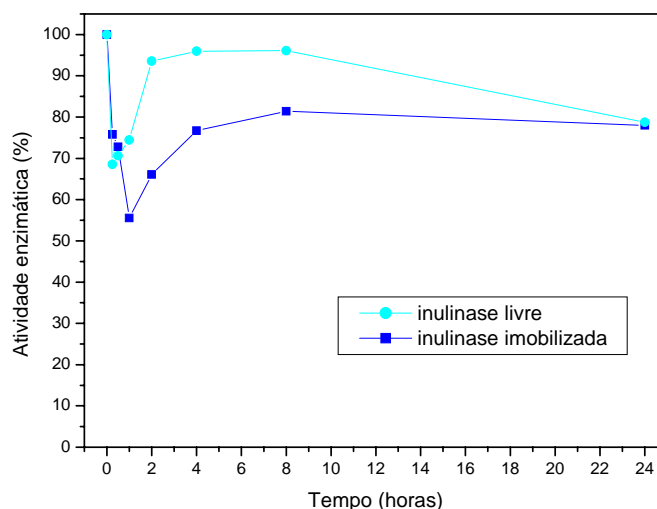
**Figura 3** – Atividade da inulinase livre e imobilizada em diferentes temperaturas de reação.

#### V.6-Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada em gelatina

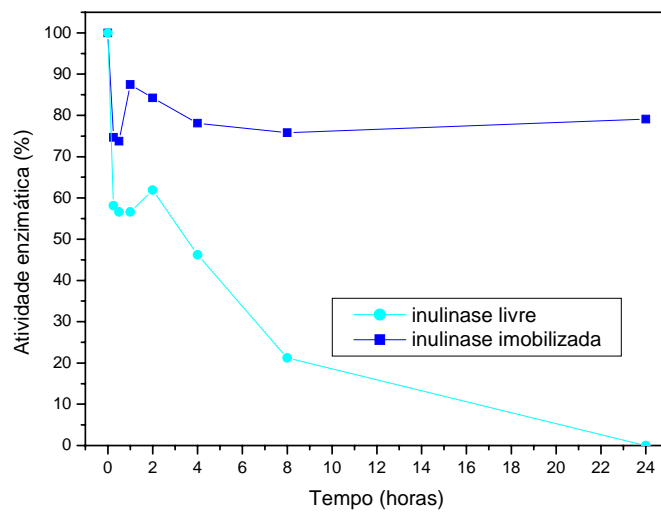
A estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi avaliada através da atividade enzimática residual (%) observada durante 24 horas de incubação nas temperaturas de 45 °C, 50 °C e 55 °C. Na temperatura de 45 °C, a inulinase livre manteve-se estável até 8 horas de incubação, enquanto a inulinase imobilizada permaneceu estável após 24 horas de reação, quando foi observada uma atividade residual de 78,02% (Figura 4). A 50 °C, a enzima livre apresentou uma atividade residual de 61,91% após 2 horas de reação, quando começa a perder atividade gradativamente, chegando a zero depois de 24 horas (Figura 5). Nesta mesma

temperatura, a inulinase imobilizada apresentou uma atividade residual de 79,14% após 24 horas, mantendo-se estável durante este período de incubação. A 55 °C, a inulinase livre perdeu toda sua atividade após 2 horas e a enzima imobilizada manteve sua estabilidade térmica durante 24 horas, apresentando um valor de atividade residual de 60,45% (Figura 6).

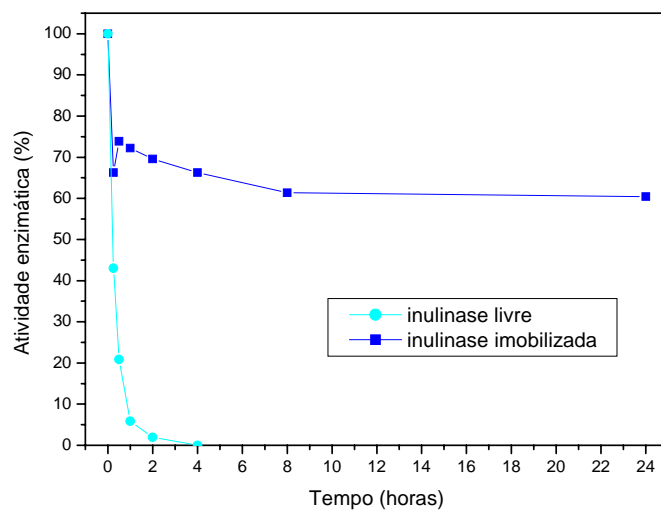
Passador-Gurgel *et al.* (1996) constataram perda de atividade para a inulinase livre de *K. marxianus* após 1 hora de incubação a 50 °C. Cruz-Guerrero *et al.* (1995), avaliando a estabilidade térmica da inulinase livre de *K. marxianus* CDBB-L-278, observaram perda de atividade após 2 horas. Bajpai & Margaritis (1987) obtiveram 70% de atividade residual da inulinase imobilizada de *K. marxianus*, durante 140 minutos a 60 °C. Gupta *et al.* (1992) relataram uma atividade residual de 50% da inulinase imobilizada de *F. oxysporum*, depois de 45 minutos a 50 °C. A inulinase imobilizada de *A. niger* manteve-se estável por 30 minutos a 60 °C (KOCHHAR *et al.*, 1999), enquanto a inulinase imobilizada de *A. candidus* permaneceu estável durante 60 minutos a 55 °C (NAKAMURA *et al.*, 1995).



**Figura 4** – Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada a 45 °C.



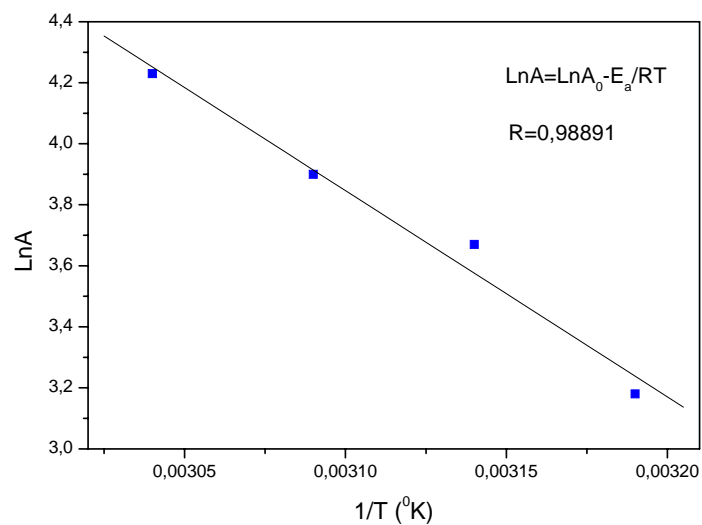
**Figura 5** – Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada a 50 °C.



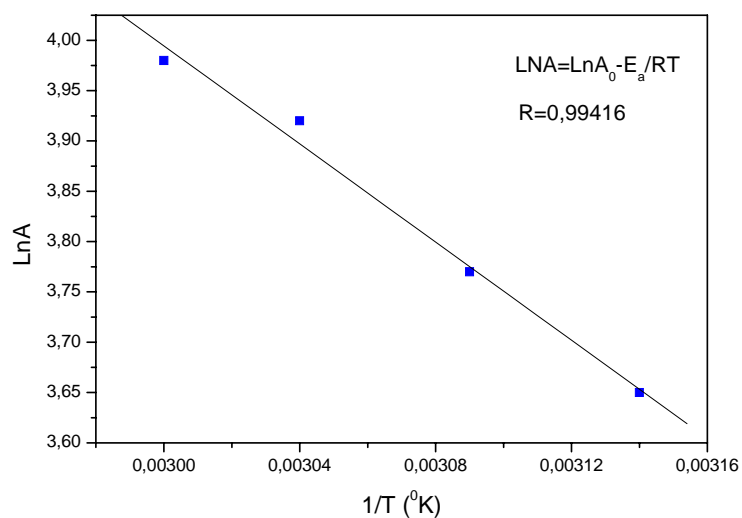
**Figura 6** – Estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada a 55 °C.

### V.7-Determinação da energia de ativação da inulinase livre e imobilizada

Realizou-se a regressão linear do logaritmo natural das velocidades de reação em função do inverso da temperatura ( $^{\circ}\text{K}$ ) para as enzimas livre e imobilizada, representadas pelas figuras 7 e 8, respectivamente. O cálculo de energia de ativação foi efetuado pela equação de Arrhenius, obtendo-se valores de energia de ativação de 56,20 KJ/mol. $^{\circ}\text{K}$  para a inulinase livre e 20,27 KJ/mol. $^{\circ}\text{K}$  para a inulinase imobilizada.



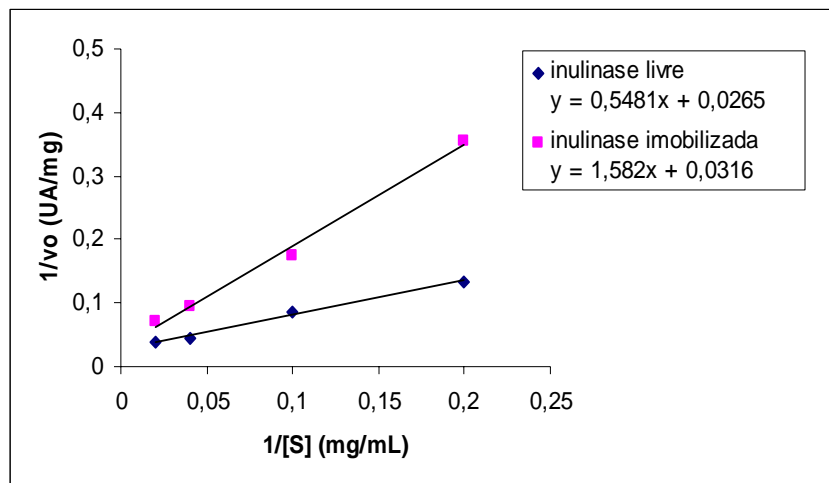
**Figura 7** - Regressão linear do logaritmo natural das velocidades de reação em função do inverso da temperatura para a obtenção da energia de ativação da inulinase livre.



**Figura 8** – Regressão linear do logaritmo natural das velocidades de reação em função do inverso da temperatura para a obtenção da energia de ativação da inulinase imobilizada.

### V.8-Cálculos das constantes $K_m$ e $V_{max}$ da inulinase livre e imobilizada em gelatina

Realizou-se a cinética enzimática em diferentes concentrações de sacarose (item IV.9, Material e Métodos) para a obtenção das constantes  $K_m$  e  $V_{max}$  da inulinase livre e imobilizada. Os valores de velocidade inicial de reação foram obtidos pelo método duplo recíproco (Figura 9). Obteve-se valores de  $K_m$  de 20,68 mg/mL para a enzima livre e 50,05 mg/mL para a enzima imobilizada. Os valores de  $V_{max}$ , apresentados pela enzima livre e imobilizada foram 37,73 UA/mg e 31,64 UA/mg de proteína, respectivamente.



**Figura 9** – Representação gráfica de Lineweaver-Burk para determinação de  $K_m$  e  $V_{max}$  da inulinase livre e imobilizada.

### V.9-Capacidade de reutilização da inulinase imobilizada em gelatina

Realizaram-se quatro ciclos de bioconversão em um reator tipo “basket” para verificar se o suporte seria adequado ao uso contínuo. Após 8 horas, o meio de reação era substituído por um novo meio, iniciando um novo ciclo de bioconversão. Ao final de cada ciclo, foi verificada a atividade enzimática residual e a taxa de conversão de sacarose em açúcares redutores.

Como pode ser observado na Tabela 16, a atividade enzimática manteve-se constante durante os ciclos de reação. As taxas de conversão de sacarose apresentaram valores de 100%, 100%, 99,08% e 98,84% para os ciclos 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Tabela 16).

**Tabela 16** – Avaliação da capacidade de reutilização da inulinase imobilizada em gelatina.

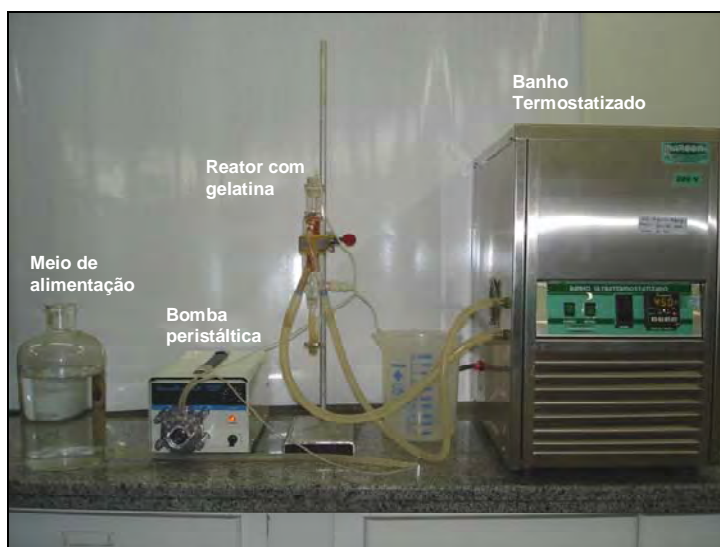
<b>Ciclo de bioconversão</b>	<b>Atividade enzimática (%)</b>	<b>Conversão (%)</b>
1	100,00	100,00
2	100,00	100,00
3	100,00	99,08
4	100,00	98,84

#### **V.10-Reator tubular com inulinase imobilizada em gelatina (leito empacotado)**

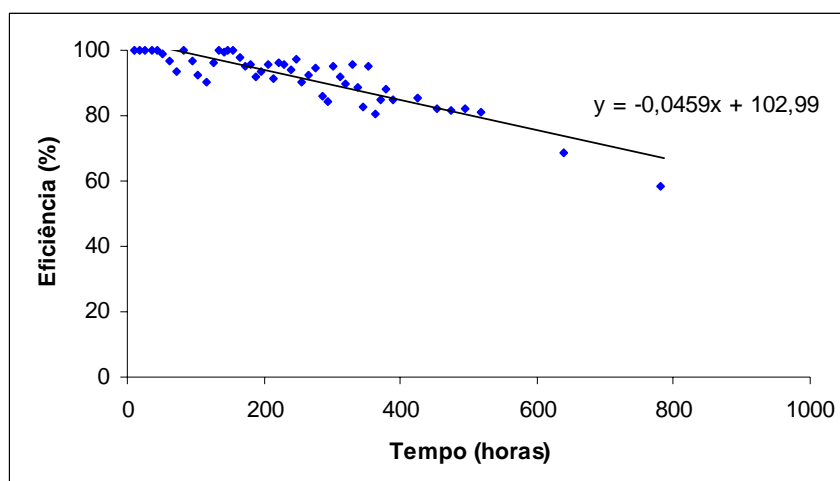
Avaliou-se a eficiência da inulinase imobilizada em um reator tubular com leito empacotado, devido aos resultados satisfatórios apresentados pela mesma para o uso contínuo. O reator possuía uma capacidade de 15 mL e continha 12,5 g de gelatina com enzima imobilizada (Figura 10). O meio de alimentação foi constituído de sacarose 1% (p/v), com pH 3,5. Os experimentos foram conduzidos a uma temperatura de 45 °C, na qual a enzima imobilizada em gelatina apresentou melhores condições de operação, não ocorrendo dissolução da mesma. A vazão foi ajustada para 25 mL/hora para que os experimentos fossem iniciados com uma taxa de conversão de sacarose de 100%.

Realizou-se a quantificação de açúcares redutores totais no meio de alimentação, com o objetivo de verificar se as condições de temperatura e pH deste experimento promoveriam a hidrólise de sacarose. Dessa forma, incubou-se 100 mL do meio de alimentação a 45 °C durante 24 horas, não sendo observada qualquer hidrólise de sacarose.

As bioconversões foram realizadas até 782 horas, quando a inulinase imobilizada apresentou uma eficiência de 58,12% (Figura 11), não sendo observado perda de massa pelo suporte avaliado.



**Figura 10** – Imagem do Reator com inulinase imobilizada em gelatina.



**Figura 11** – Eficiência do reator com inulinase imobilizada em gelatina.

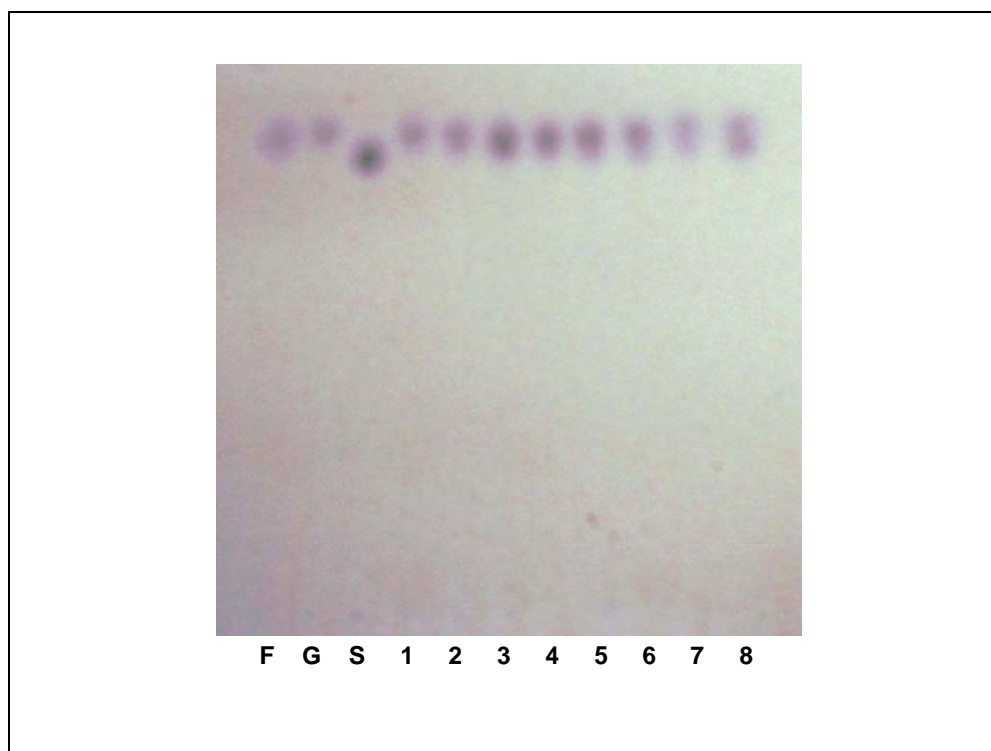


### V.11-Cromatografia de camada delgada

A cromatografia de camada delgada foi realizada visando uma caracterização do produto obtido durante as bioconversões promovidas no reator tubular, com inulinase imobilizada em gelatina (Figura 12). Na Tabela 17, pode-se verificar valores de RF das amostras analisadas mais próximos dos valores apresentados para os padrões frutose e glicose, evidenciando a produção de açúcares redutores durante todo o processo avaliado.

**Tabela 17** – Valores de RF (fator de retenção) apresentados pelos padrões e amostras na cromatografia de camada delgada.

Padrão / Amostra	RF
Frutose (F)	0,754
Glicose (G)	0,762
Sacarose (S)	0,719
52 horas (1)	0,754
104 horas (2)	0,750
205 horas (3)	0,750
302 horas (4)	0,746
425 horas (5)	0,746
518 horas (6)	0,754
639 horas (7)	0,750
782 horas (8)	0,750



**Figura 12** – Cromatografia de camada delgada: análise qualitativa dos produtos obtidos durante as bioconversões no reator tubular nos tempos 52 (1), 104 (2), 205 (3), 302 (4), 425 (5), 518 (6), 639 (7) e 782 (8) horas. Padrões: frutose (F), glicose (G) e sacarose (S).

## VI-CONCLUSÕES

- Nos experimentos de imobilização enzimática em diferentes suportes, a gelatina apresentou melhor resultado, com uma eficiência de 82,60 %.
- Os maiores valores de atividade para a enzima livre e imobilizada foram obtidos em pH 3,5. A temperatura ótima de atividade para a inulinase livre foi 55 °C, enquanto a inulinase imobilizada apresentou maior atividade enzimática a 60 °C.
- A inulinase imobilizada manteve-se estável nas temperaturas de 45 °C, 50 °C e 55 °C. A inulinase livre manteve-se estável durante 8 horas a 45 °C e 2 horas a 50 °C. Na temperatura de 55 °C a enzima livre perdeu toda sua atividade após 2 horas de reação.
- As enzimas livre e imobilizada apresentaram valores de  $K_m$  de 20,68 mg/mL e 50,05 mg/mL, respectivamente. A inulinase livre apresentou um  $V_{max}$  de 37,73 UA/mg, enquanto a inulinase livre apresentou um valor de 31,64 UA/mg de proteína.
- As conversões de sacarose em açúcares redutores foram realizadas no reator tubular até 782 horas, quando a inulinase imobilizada em gelatina apresentou uma eficiência de 58,12%.

## VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S.A. **Enzima pectinametilesterase de acerola (*Malpighia emarginata* DC): purificação e produção de pectina de baixa metoxilação usando biorreatores contendo PME**. 2004. 158 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

ASSIS, S.A.; FERNANDES, P.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 79, p. 277-280, 2004.

BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. Characterization of molecular-sieve bound inulinase. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 65, p. 239-242, 1987.

BARRANCO-FLORIDO, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L.; AZAOLA, A. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 513-519, 2001.

BLONDEAU, K.; BOUTUR, O.; BOZE, H.; JUNG, G.; MOULIN, G.; GALZY, P. Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1 $\beta$  production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the POH5 promoter. **Applied and Microbiology Biotechnology**, Washington, v. 41, p. 324-329, 1994.

BYUM, S.M.; NAHM, B.H. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, Chigaco, v. 43, p. 1871-1873, 1978.

CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, p. 517-520, 2005.

CAZZETA, M.L. **Estudo da produção de biomassa e inulinase por *K. marxianus* var. *bulgaricus*: influência das condições de cultivo**. 2005. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

CONTIERO, J. Inulinases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 381-398.

CORTEZ, G.; TRUJILLO-ROLDAN, M.A.; RAMIREZ, O.T.; GALINDO, E. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 773-778, 2005.

CRUZ-GUERRERO, A.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, London, v. 34, p. 621-624, 1999.

CRUZ-GUERRERO, A.; GARCIA-PENA, L.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, p. 159-163, 1995.

DERYCKE, D.G.; VANDAMME, E.J. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 34, p. 45-51, 1984.

ELYACHIOUI, M.; HOREIZ, J.P.; TAILLEZ, R. General properties of extracellular bacterial inulinase. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, p. 514-519, 1992.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, p. 61-68, 1990.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.28, p.596-691, 2001.

FERREIRA, M.S.; DE ANDRADE, A.V.; KENNEDY, J.F. Properties of thermostable nonspecific fructofuranosidase produced by *Cladosporium cladosporioides* cells for hydrolysis of Jerusalem artichoke extract. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 31, p. 1-9, 1991.

FLEMING, S.E.; GROOTWASSINK, J.W.D. Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 11, p. 1-28, 1979.

GASPARI, J.W.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1135-1140, 1999.

GILL, P.K. **Purification and characterization of thermostable inulinase from *Aspergillus fumigatus***. 2005. 172 f. Tese (Doctor of Philosophy). Department of Biotechnology, Guru Nanak Dev University, Amritsar, 2005.

GILL, P.K.; MANHAS, R.K.; SINGH, P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 894-902, 2006a.

GILL, P.K.; MANHAS, R.K.; SINGH, P. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, p. 369-375, 2006b.

GILL, P.K.; SHARMA, A.D.; HARCHAND, R.K.; SINGH, P. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. **Bioresource Technology**, Essex, v. 87, p. 359-362, 2003

GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 1, p. 138-146, 1955.

GROOTWASSINK, J.W.D.; HEWITT, G.M. Inducible and constitutive formation of  $\beta$ -fructofuranosidase (inulase) in batch and continuous culture of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, Edinburgh, v. 129, p. 31-41, 1983.

GUIRAUD, J.P.; VIARD-GAUDIN, C.; GALZY, P. Etude de l'inulinase de *Candida salmanticensis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 44, p. 1245-1252, 1980.

GUPTA, A.K.; KAUR, M.; SINGH, R. A comparison of properties of inulinases of *Fusarium oxysporum* immobilized on various supports. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 53, p. 293-296, 1992.

GUPTA, A.K.; RATHORE, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, thermal stability and immobilization of inulinase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 47, p. 245-257, 1990.

HANOVER, L.; WHITE, J. Manufacturing, composition and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 5, p. 724-732, 1993.

HENSING, M.C.M.; ROUWENHORST, R.J.; HEIJNEN, J.J.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 67, p. 261-279, 1995.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, R.; BAARTMANS, R.; van DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 42, p. 516-521, 1994.

HEWITT, G.M.; GROOTWASSINK, J.W.D. Simultaneous production of inulase and lactase in batch and continuous culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme Microbiology and Technology**, Atlanta, v. 6, p. 263-270, 1984.

KANG, S.; CHANG, Y.J.; OH, S.J.; KIM, S. Purification and properties of an endo-inulinase from *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.20, n.10, p.983-986, 1998.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit<sup>®</sup> C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, Amsterdam, v 10, p. 157-176, 2000.

KATO, K.; ARAKI, T.; KITAMURA, T.; MORITA, N.; MOORI, M.; SUZUKI, Y. Purification and properties of a thermostable inulinase ( $\beta$ -D-fructanfructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. **Starch-Stärke**, Weinheim, v. 51, p. 253-258, 1999.

KIERSTAN, M.; BUCKE, C. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium-alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 19, p. 387-397, 1977.



KIM, W.Y.; BYUN, S.M.; NAHM, B.H. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. **Korean Journal of Food Science Technology**, Seoul, v. 11, p. 238-290, 1979.

KIM, W.Y.; BYUN, S.M.; UHM, T.B. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on amino ethyl cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v 4, p. 239-244, 1982.

KIM, D.H.; RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 11, p. 201-206, 1989.

KIRBY, D.K.; DAVIES, R. Thiol induced release of invertase from cell walls of *Saccharomyces fragilis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Baltimore, v. 201, p. 261-266, 1970.

KLEMAN, G.L. **Development and analysis of glucose controlled fermentation of *Escherichia coli***. 1994. 287f. Tese (Doctor of Philosophy), Ohio State University, Ohio, 1994.

KOCHHAR, A.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. Inulinase from *Aspergillus versicolor*. A potent enzyme for producing fructose from inulin. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 56, p. 721-726, 1998

KUSHI, R.T.; Monti, R.; Contiero, J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 25, p. 63-69, 2000.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 56, p. 658-666, 1934.

LIU, Y.; LIAO, L.; WU, W. Cultivation of recombinant *Escherichia coli* to achieve high cell density with a high level of penicillin G acylase activity. **Proceedings of the National Science Council**, Pequin, v. 24, n. 4, p. 156-160, 2000.

LOOTEN, P.; BLANCHET, P.D.; VANDECASTEELE, J.P. The  $\beta$ -fructofuranosidase activities of a strain of *Clostridium acetobutylicum* grown on inulin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 25, p. 419-425, 1987.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n.3, p. 426-429, 1959.

NAKAMURA, T.; NAGATOMO, Y.; HAMADA, Y.; NISHINO, Y.; OHTA, K. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 84, p. 134-139, 1994.

NAKAMURA, T.; OGATA, Y.; SHITARA, A.; NAKAMURA, A.; OHTA, K. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, p. 164-169, 1995.

NEGORO, H.; KITO, E.  $\beta$ -Fructosidase from *Candida kefyr*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 51, p. 96-102, 1973.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York: W. Publishers, 2000. p. 243-288.

NIGHOJKAR, A.; SRIVASTAVAS, S.; KUMAR, A. Production of low methoxyl pectin using immobilized pectinesterase bioreactors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v 80, n.4, p. 346-349, 1995.

ONGEN-BAYSAL, G.; SUKAN, S.S.; VASSILEV, N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 16, p. 275-280, 1994.

PARK, J.P.; BAE, J.T.; YOU, D.J.; KIM, B.W.; YUN, J.W. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.21, n. 12, p. 1043-1046, 1999.

PARK, J.P.; KIM, K.H.; KIM, D.S.; YUN, J.W. Enzymatic production of inulo-oligosaccharides from chicory juice. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, p. 385-388, 1998.

PASSADOR-GURGEL, G.C.; FURLAN, S.A.; MELLER, J.K.; JONAS, R. Application of a microtitre reader system to the screening of inulinase producing yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, p. 158-161, 1996.

PETERS, P.J.H.; KERKHOOPS, P.L. Preparation and immobilization of inulinase. US Patent US4397949, 1983.

POORNA, V.; KULKARNI, P.R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. **Bioresource Technology**, Essex, v. 54, p. 315-320, 1995.

ROCHA, J.R.; CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, p. 77-82, 2006.

ROUWENHORST, R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.A.; DJKEN, J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 11, p. 3337-3345, 1990.

ROZELL, J.D. Biocatalysis at commercial scale: myths and realities. **Chimica Oggi**, Milano, v. 17, p. 42-47, 1999.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Teresópolis: Eventos, 2002. p. 1-20.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 1-9.

SCHIMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, London, v. 409, p. 258-268, 2001.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, London, v. 34, p. 851-855, 1999.

SHAY, L.K.; HUNT, H.R.; WEONER, G.H. High productivity fermentation process for cultivation industrial microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 79-85, 1987.

SNYDER, H.E.; PHAFF, J.H. Studies on a  $\beta$ -fructosidase produced by *Saccharomyces fragilis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 26, p. 433-452, 1960.

SNYDER, H.E.; PHAFF, J.H. The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 237, p. 2438-2441, 1962.

STROH, W.H. Industrial enzymes market. **Gen Engineering News**, New York, v. 18, n. 5, p. 11-38, 1998.

SUZUKI, T.; KORL, H.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, p. 192-201, 1985.

SUZUKI, H.; OZAWA, Y.; MAEDA, H. Studies of water-insoluble yeast invertase. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 30, p. 807-812, 1988.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Mass production of thiostrepton by fed-batch culture of *Streptomyces taurentii* with pH-state modal feeding of multi-substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 25, p. 526-531, 1987.

TAKAHASHI, N.; MIZUNO, F.; TAKAMORI, K. Purification and preliminary characterization of exo- $\beta$ -D-fructosidase in *Streptococcus salivarius* KTA-19. **Infection and Immunity**, Philadelphia, v. 47, p. 271-276, 1985.

TURNER, B.G.; AUGERINOS, G.C.; MELNICK, L.M.; MOIR, D.T. Optimization of pirurokinase secretion from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, p. 869-875, 1991.

UHM, T.B.; CHUNG, M.S.; LEE, S.H.; GOURRONC, F.; HOUSEN, I.; KIM, J.H.; VAN BEEUMEN, J.; HAYE, B.; VANDENHAUTE, J. Purification and Characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. In: **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 146-151, 1999.

VANDAME, E.; DERYCKE, D. Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 29, p. 139-176, 1983.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Yeast: biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Decker, Inc, 1990. p. 257-296.

VICENTE, A.A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

VISWANATHAN, P.; KULKARNI, P.R. *Saussurea lappa* (kuth) as a new source of inulin for fermentative production of inulinase in a laboratory stirred fermenter. **Bioresource Technology**, Essex, v. 52, n. 2, p. 181-184, 1995.

WEETALL, H.H. Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 41, p. 157-188, 1993.

WENLING, W.; HUIYING, W.W.L.; SHIYUAN, W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. **Process Biochemistry**, London, v. 34, p. 643-646, 1999.

WINGARD JR., L.B. Enzyme engineering: a new area of specialization. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, n. 3, p. 3-13, 1972.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. Purification and properties of the  $\beta$ -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 160, p. 16-20, 1983.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. The cell wall associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 50, p. 353-394, 1984.

YUN, J.W.; KIM, K.H.; KIM, B.W.; SONG, S.K. Production of inulooligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 84, p. 369-371, 1997.

YUN, J.W.; SONG, C.H.; CHOI, J.W.; CHOI, Y.J.; SONG, S.K. Production of inulooligosaccharides from inulin by recombinant *E. coli* containing endoinulinase activity. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 21, p. 101-106, 1999.

YUN, J.W.; PARK, J.P.; SONG, J.P.; LEE, C.Y.; KIM, J.H.; SONG, S.K. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 22, p. 189-194, 2000.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 35-86.