

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

EFEITO DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
INULINASE EM PROCESSO DE BATELADA SIMPLES POR
KLUYVEROMYCES MARXIANUS VAR. *BULGARICUS* ATCC 16045

Bernardo Onagar Yépez Silva-Santisteban

Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias
UNALM, Lima, 1995

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Orientador

PARECER

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Alimentos

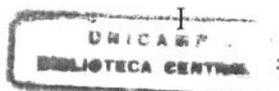
Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Bernardo Onagar Yépez Silva-
Santisteban, aprovada pela
Comissão Julgadora em 26 de
março de 2001.

Campinas, 26 de março de 2001



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

Campinas, 2001



200114232

UNIDADE	Be		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	Y43e		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	45206		
PROC.	16-892101		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00		
DATA	07/07/01		
N.º CPD			

CM00157757-1

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

Y43e Yépez Silva-Santisteban, Bernardo Onagar
Efeito da agitação e da aeração na produção de inulinase em processo de batelada simples por *Kluyveromyces Marxianus* Var. *Bulgaricus* ATCC 16045 / Bernardo Onagar Yépez Silva - Santisteban. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

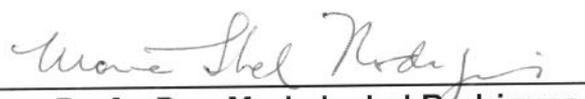
Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Kluyveromyces. 2.Inulinase. 3.Agitador. 4.Planejamento experimental. 5.*Coeficiente de transferência de oxigênio. Maugeri Filho, Francisco. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

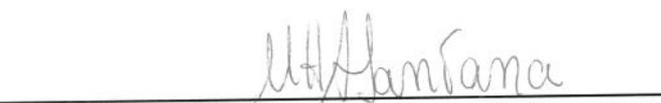
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador – FEA/UNICAMP



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Membro – FEA/UNICAMP



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Membro – FEQ/UNICAMP

Dr. Silvio Roberto Andrietta
Membro – CPQBA/UNICAMP

Campinas, 26 de março 2001

RESUMO

A enzima inulinase oferece uma alternativa interessante na produção de xaropes enriquecidos em frutose usando como matéria prima polímeros de reserva de inulina, os quais se encontram na natureza como reserva de carboidratos. Além disso as inulinases apresentam atividade de transferase o que permite a produção de frutoligosacarídeos a partir de dímeros como a sacarose. A frutose apresenta vantagens em relação à sacarose, como um adoçante confiável e alternativo por ser mais saudável, possuir maior poder adoçante e pode dissimular o sabor amargo da sacarina. A levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC16045 tem sido amplamente estudada por ser um microrganismo hiperprodutor de inulinase. Uma ampla revisão bibliográfica revela que a produção de muitos sistemas de enzimas é influenciada pelos parâmetros de aeração e agitação, por tanto e com base em estudos prévios sobre otimização de meio de cultivo estudou-se a influencia da agitação, aeração e tipo de agitador (Rushton, hélice naval e “pitched blade up”) na produção da enzima em fermentações em batelada simples. O efeito da agitação e aeração sobre a atividade da enzima foi estudado usando sistemas com duas turbinas de Rushton. A faixa estudada foi 50 a 250 rpm e 0,5 a 2,0 vvm. Os resultados experimentais mostraram que a aeração, com agitação maior de 150 rpm não influenciou a produção da enzima, portanto estudou-se o incremento da agitação hasta 550 rpm mantendo a aeração a 1,0 vvm. A melhor produção foi atingida a 450 rpm com uma produção de 121 UI/mL. O estudo com diferentes tipos de agitadores foi feito nesta condição ótima, verificando-se que o agitador “pitched blade up” apresentou o melhor desempenho, produzindo 176 UI/mL. Foram também, monitorados o pH, oxigênio dissolvido (OD), viabilidade celular e o k_{La} . Observou-se que com as turbinas de Rushton a atividade e a biomassa foram maiores quando o k_{La} foi maior. No entanto, com outros tipos de agitadores esta relação foi alterada provavelmente em função dos mecanismos de fluxo e cisalhamento que provocaram a queda da viabilidade. Observou-se, através da relação o k_{La} e o desempenho do pH e OD, que o k_{La} determinou o metabolismo usado pela levedura.

ABSTRACT

Inulinase offers an interesting alternative for the production of high fructose syrups, using inulin as raw material. This enzyme can also have fructosyltransferase activity, which enable the production of fructooligosacharides from sucrose. Fructose presents some advantages relating to sucrose, as a reliable and more healthier sweetener, as well as higher sweetness. The yeast *Kluyveromyces marxianus var bulgaricus* ATCC 16045 has been utilized for inulinase production since it has been proved as an excellent enzyme producer.

Factorial design and response surface techniques were used to optimize the fermentation conditions for the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. Sucrose was used as carbon source instead of inulin. Aeration, agitation and type of impeller (disk turbine, marine and pitched blade) were studied in a stirred reactor. Two factorial designs 2^2 were carried out. Agitation speed varied from 50 to 550 rpm, aeration rate from 0.5 to 2.0 vvm. From the factorial designs, it has been concluded that the aeration rate didn't influence the inulinase production, only the agitation speed has significant effect. The best result with the disk impeller at 450 rpm and aeration at 1.0 vvm was an activity of 121 UI/ml, after 72 hours of fermentation. Since only agitation is a significant factor, it was increased up to 550 rpm, using the three impellers. High agitation velocity with disk impeller enhanced death rate and decreased enzyme production. The marine impeller didn't improve the enzyme production. The best production was achieved with the pitched blade impeller. The enzyme production with this impeller achieved 176 UI/ml, at 450 rpm and 1.0 vvm. It has been shown that the inulinase production was strongly influenced by aeration and agitation parameters and impeller type. Also, it was observed an important relation between $K_L a$ and pH and dissolved oxygen through out the fermentation.

1. Introdução

A inulina é um polímero de frutose que se encontra na natureza como reserva de carboidratos de diversos vegetais. Apresenta vantagens em relação a outros polímeros convencionalmente usados na produção de xaropes ricos em frutose, pela simplicidade do processo e maior grau de pureza do produto final. A inulinase é uma enzima usada na transformação da inulina em frutose. O processo tem uma única etapa de hidrólise da qual se obtém xaropes de até 95% de frutose. Deste fato surgiu o interesse da produção industrial desta enzima.

A frutose possui maior poder adoçante em relação à sacarose, e é usada como adoçante natural para diabéticos. A importância das fontes de frutose tem aumentado, e os processos para sua obtenção têm sido amplamente estudados.

A inulinase devido a sua capacidade de formar alguns tipos de polímeros, e também de hidrolisar a sacarose, adquire uma posição importante no mercado de enzimas produtoras de polímeros dietéticos e invertases.

Tem sido comprovado que através de processos fermentativos que utilizam fungos, leveduras e bactérias é possível a produção de inulinase em grande escala, sendo em geral a inulina a melhor fonte de carbono em relação a outros açúcares. Não obstante, o uso de sacarose como fonte de carbono neste processo de fermentação representa uma diminuição dos custos. Os processos de produção de inulinase usando como matéria prima a sacarose têm sido estudados quanto à otimização de meios de cultivo e de parâmetros de fermentação. Contreiro e Maugeri (1993) estudaram a produção de inulinase em reator contínuo. Santos (1998) caracterizou esta enzima como inulinase e comprovou a sua capacidade de formar polímeros de frutose. Kalil *et al* (1999) usando cepa *Kluyveromyces marxianus* de variedade ATCC 16045, otimizaram o meio sintético para a produção da inulinase em frascos agitados. Outros trabalhos estão conduzidos com esta e outras cepas que têm mostrado maior produção de

enzima, com o propósito de otimizar meios complexos, caracterizar a síntese de polímeros e melhorar a purificação da enzima.

O *Kluyveromyces marxianus* foi extensamente estudado por ser uma levedura hiperprodutora de inulinase. Com base em uma ampla revisão bibliográfica e de testes preliminares identificou-se a necessidade de otimização das condições de agitação e aeração deste processo fermentativo.

O presente trabalho pretende definir a influência da agitação e aeração e otimizar suas condições operacionais no processo fermentativo de batelada simples de produção de inulinase com *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, ATCC 16045 usando como fonte de carbono a sacarose.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Inulinase

A inulina é um polímero de origem vegetal que serve como reserva de carboidratos nos *Compositae* e *Gramineae* (Vandamme e Derycke, 1983). A inulina e análogos são polifrutanos formados por cadeias de frutose unidas por ligações lineares β -2-1 com uma unidade de glicose terminal (Grootwassink and Fleming, 1980). Linder já em 1900 tinha observado que a levedura *Saccharomyces marxianus* foi capaz de consumir inulina (Vandamme e Derycke, 1983). Vandamme e Derycke (1983) cita a Grafe e Vouk (1913) e Kluyver (1914) que confirmaram essas observações, e a Sacchetti (1933) que provou que *Kluyveromyces fragilis* cresceu tendo a inulina como única fonte de carbono.

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

2.2. Especificidade da inulinase

As inulinases podem ser subdivididas segundo sua especificidade com respeito ao substrato. Muitas inulinases recebem a designação 2,1- β -D-frutan-frutano-hidrolases, por liberarem uma unidade de frutose terminal da molécula de inulina. Algumas inulinases como as de *Penicillium spp.* e de *Kluyveromyces fragilis* hidrolisam levanas de bactérias, o que implica que cortam tanto as unidades de frutose nas cadeias de levanas unidas por ligações β -2-6, tanto quanto as unidades de frutose unidas por ligações β -2-1 nas ramificações (Vandamme e Derycke, 1983).

As inulinases podem ser classificadas em endo-inulinases e exo-inulinases. As exo-inulinases desempenham importante papel na hidrólise de inulina agindo sobre as ligações β -2-1 (Vandamme e Derycke, 1983).

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

A atividade de inulinase é usualmente comparada com a atividade de invertase de um mesmo microrganismo ou extrato enzimático através da razão entre as suas atividades expressa como S/I. As verdadeiras invertases apresentam um valor para esta razão muito alto (1600-28300) (Grootwassink and Fleming, 1979, citado por Vandamme e Derycke, 1983). Por outro lado os valores de S/I para as inulinases são menores que 50 (Vandamme e Derycke, 1983). Na tabela 1 pode-se observar valores de S/I para extratos de culturas de fungos.

Tabela 1: Hidrólise de extrato de alcachofra de Jerusalem por inulinase de monocultivos e cultivo misto de *A. niger* e *K. marxianus*.

Fonte de enzima	Atividade enzimática (U/g substrato)		S/I
	Invertase	Inulinase	
<i>A. niger</i>	4.8	16.3	0.3
<i>K. marxianus</i>	4.9	12.2	0.4
Cultivo misto	13.8	0.5	28.0

Ongen-Baysal e Sukan (1996)

Kushi *et al* (1996) mencionam que a ação da inulinase sobre a inulina resulta em uma grande quantidade de D-frutose, com uma pequena quantidade de glicose.

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

Alguns autores como Contiero e Maugeri (1993), Rouwenhorst *et al* (1990); Hensing *et al* (1994) e Manzoni e Cavazzoni (1988) têm reportado a produção da inulinase extracelular. Mazoni e Cavazzoni (1988), Rouwenhorst *et al* (1988) e Rouwenhorst *et al* (1990) reportaram também a inulinase associada à parede celular produzida por *Kluyveromyces*. Rouwenhorst *et al* (1988), Rouwenhorst *et al* (1990) e Espinoza *et al* (1992) também fazem referencia a inulinase contida no interior da célula do mesmo microrganismo.

2.3. Produção Microbial de Inulinase

A produção de inulinases de diversos microrganismos tem sido reportada na literatura. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 produziu 52,84 UI/mg de biomassa tendo como fonte de carbono 0,25% de inulina pelo que é considerado um hiperprodutor de inulinase (Cruz-Guerrero *et al*, 1995). *Staphylococcus sp.* RRL1 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC52466 produziram 618 UI/L e 470,4 UI/L, respectivamente, de inulinase extracelular quando crescidos em meio líquido contendo inulina como única fonte de carbono, sendo que o primeiro produziu maior atividade nas condições estudadas (Selvakumar e Pandey, 1999).

Kluyveromyces fragilis em cultivo contínuo em meio contendo sacarose como única fonte de carbono e substrato limitante produz inulinase, sendo que a máxima quantidade de enzima foi formada a baixas taxas de diluição (0.09h^{-1}) devido ao efeito da repressão catabólica. No entanto, o pH não influenciou a produção na faixa de 3.5 até 6.0 e a concentração de oxigênio dissolvido entre 2,5 e 40 % de saturação. O rendimento de atividade-biomassa foi 38888,9 UI/g. Usando cultivos contínuos, pode-se obter o dobro de enzima em comparação a cultivos em batelada (GrootWanssink e Fleming, 1980).

O meio de cultivo tem grande influência na produção de inulinase por *Candida kefir*, sendo que a inulina permite obter maiores rendimentos comparados com sacarose, frutose e glicose; além disso, adição de altas concentrações de peptona e extrato de levedura melhora a produção de inulinase (Pessoa e Vitolo, s.n.t.). Kalil *et al* (1999) otimizaram um meio sintético para produção de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em shaker após 48 horas de fermentação, obtendo na condição ótima 72 UI/mL. Os resultados coincidem com aqueles obtidos por Pessoa e Vitolo (s.n.t) em que altas concentrações de fontes de nitrogênio melhoram a produção da inulinase. Mas contrariamente a GrootWanssink e Fleming (1980), Kalil *et al* (1999) observou que o pH da fermentação influenciou muito na produção da inulinase.

Uma parte importante da atividade de inulinase, obtida de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em cultivo contínuo produzindo 52000 UI/g de biomassa tendo a sacarose como única fonte de carbono, foi relacionada à parede celular e teve uma S/I de 15. Entretanto com sacarose e inulina obteve-se rendimentos maiores quando comparados com os obtidos usando glicose e lactose (Rouwenhorst *et al*, 1988). Os mesmos autores observaram que aparentemente a temperatura ótima de produção da enzima, entre 37 e 42°C, coincide com a temperatura ótima de crescimento da levedura.

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

Ruowenhorst *et al* (1988) explicam que independentemente das condições de cultivo, aproximadamente 50% do conteúdo da inulinase em cultivos de *Kluyveromyces marxianus* são excretados no meio de crescimento em um quimiostato, enquanto que outros trabalhos indicaram que a maior produção de inulinase acontecia com sacarose limitante.

2.4. Agitação e aeração em processos de fermentação

A agitação e aeração nos processos de fermentação têm dois objetivos segundo Wang *et al* (1979). O primeiro é fornecer oxigênio aos microrganismos com o propósito de atingir as atividades metabólicas próprias. A segunda função é manter os microrganismos em suspensão, além de que só uma pequena fração da agitação total é requerida para isto.

O mesmo autor explica que a velocidade específica de crescimento dos microrganismos responde frente a concentrações de oxigênio de forma

semelhante à resposta frente a outros nutrientes. O mecanismo de transferência de massa de oxigênio desde a fase gasosa até o microrganismo é controlado pela resistência a transferência de massa na fase líquida. Assim, pode-se estabelecer que a transferência de massa é descrita pela seguinte expressão matemática:

$$N_A = K_L a (C^* - C_L) \quad (2.1)$$

Onde N_A é a velocidade de transferência de massa em mM O₂/L*h, K_L é o coeficiente de transferência de massa na fase líquida em cm/h, a é a área interfacial de transferência de massa em cm²/cm³, C^* é a concentração de equilíbrio de oxigênio em mM/litro, e C_L é a concentração de oxigênio dissolvido em mM/litro.

Segundo Chen *et al* (1999) a influência do oxigênio na produção de lipase por *Acinetobacter radiorasistens* pode ser estudada de duas formas: com o controle da concentração de oxigênio dissolvido e com o controle da vazão de aeração. Observaram, também, que o fator intrínseco que determina o crescimento celular e a produção de lipase foi a velocidade de transferência de oxigênio prioritariamente em relação à concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, a produtividade global de lipase, a qual depende mais da agitação que da aeração, poderia estar relacionada com o $K_L a$.

O processo fermentativo para a produção de xantana também foi influenciado pela velocidade do agitador como foi considerado por Serrano-Carreón *et al* (1998). A concentração da goma foi uma função da velocidade do agitador devido as características da mistura. A produção de proteína através de cultivo de *Aspergillus oryzae* foi independente da velocidade de agitação na faixa de 550 a 1000 RPM, embora as mudanças na morfologia dos micélios foram medidas para mudanças similares nas condições de agitação (Amanullah *et al*, 1999).

Influência semelhante foi observada na produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum* por Justen *et al* (1998) quando a velocidade específica de produção de penicilina foi geralmente maior quanto menor foi a velocidade de agitação para um determinado tipo de agitador.

Em relação à produção de xantana por fermentação, Amanullah *et al* (1998) esclareceram que a velocidade de agitação afeta o grau do movimento dos caldos de fermentação, em razão da complexidade reológica dos caldos, e da velocidade de transferência de oxigênio. A combinação destes dois efeitos originou o aumento da concentração do oxigênio dissolvido e mudanças na uniformidade espacial com a velocidade do agitador. Além disso, em determinadas condições controladas de oxigênio dissolvido, os autores demonstraram que a performance biológica do microrganismo foi independente da velocidade de agitação na medida em que a homogeneidade do caldo fosse assegurada.

Também nos processos contínuos se tem observado a influência da vazão de aeração, como no caso da produção de oligonucleotídeos por *Kluyveromyces marxianus*, estudado por Belem e Lee (1999), onde uma aeração de 2 vvm (volume de ar/volume de meio*minuto) resultou em maior rendimento, biomassa, produtividade e velocidade específica de crescimento. No caso da produção em batelada de alfa amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*, também se observou que maiores velocidades de aeração foram essenciais para rendimentos altos de produção da enzima (Milner, 1996).

Na produção de quitinase de *Trichoderma harzianum*, em um cultivo em batelada, foi testado uma faixa de vazão de aeração de 1,0 até 2,0 vvm e velocidade de agitação entre 162 e 303 rpm. Observou-se que um balanço adequado, entre a vazão de aeração e velocidade de agitação foi requerido para atingir a produção máxima de quitinase (Artur Felse e Panda, 1999).

Amanullah *et al* (1998) verificaram, no processo de produção de xantana por fermentação em fase exponencial, que a velocidade de absorção de oxigênio foi independente da concentração de oxigênio dissolvido quando maior que 6% de saturação de oxigênio no meio de fermentação. A velocidade específica de crescimento não foi influenciada pelo oxigênio dissolvido, em níveis menores que 3%, embora houvesse diminuição da velocidade de produção de xantana. Na fase de produção a concentração crítica de oxigênio esteve entre 6% e 10%, sendo que abaixo destes valores tanto a velocidade específica de produção de xantana como a velocidade de absorção de oxigênio diminuíram significativamente.

A influência do tipo de agitador nos processos de fermentação também tem sido estudada. Justen *et al* (1998) constataram que na produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, a velocidade específica de crescimento, e a velocidade específica de produção de penicilina dependeu da geometria do agitador, quando fixado a potência por unidade de volume.

2.5. Influência da aeração e agitação na produção de inulinase

Snider e Phaff (1962), citado por Vandamme e Derycke (1983), observaram que *Kluyveromyces fragilis*, cultivado sem aeração cresceu pouco e a síntese de inulinase foi baixa. Grootwassink e Fleming (1980) estudaram o efeito da aeração no mesmo microrganismo com mais detalhes, encontrando que uma variação da concentração de oxigênio dissolvido (TOD) desde 2,5 até 40% de saturação aparentemente não influencia a formação de biomassa e inulinase. Usando *Penicillium sp*, Kim (1975) citado por Vandamme e Derycke (1983), os rendimentos máximos de inulinase foram obtidos depois de 72 horas de crescimento em cultura em "shaker" a 120 RPM. Cultivos em superfície produziram menores rendimentos, inclusive depois de 120 horas de incubação.

Wei *et al* (1998) observaram que o volume de meio de cultivo na fermentação de *Kluyveromyces sp* Y-85 em shaker foi inversamente proporcional

à produção de inulinase e biomassa, enquanto que o volume do meio influenciou principalmente o coeficiente de transferência de oxigênio. No mesmo trabalho foi feita a ampliação de escala de 15 L até 1000 L usando as mesmas condições de aeração, pressão, inoculo, temperatura de fermentação e velocidade de agitação, obtendo-se em ambos os casos atividades mais altas que aquelas obtidas em “shaker”.

Pessoa *et al* (1996) usou como critério de aumento de escala em um processo de produção de inulinase com *Candida kefir* manter constante o K_La (coeficiente volumétrico de transferência de massa). A maior produção de inulinase foi atingida com um K_La de 46 h^{-1} para um volume de 15 L. O aumento de escala até 300 L foi feito mantendo o K_La constante e usando o mesmo meio de cultivo e as mesmas condições. Os resultados mostraram que ambos os processos resultaram em atividades de inulinase semelhantes.

Parekh e Margaritis (1985), em uma fermentação em sacarose pelo método de batelada simples por *Kluyveromyces marxianus*, produziram 60 U/mL. Nesse processo usaram velocidade de agitação de 250 rpm e aeração de 1,0 vvm.

2.6. Aplicações da inulinase

Xaropes de alto conteúdo de frutose são produzidos usando hidrólise de amido de milho e uma isomerização enzimática da glicose; a inulinase microbiana aparece como uma alternativa, pois permite obter-se alta conversão em frutose, partindo de inulina (Vandamme e Derycke, 1983).

Manzoni e Cavazzoni (1992) conseguiram rendimentos de até 80% de hidrólise de inulina pura e de extratos de alcachofra de Jerusalém usando inulinase extracelular de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*.

Guiraud et al (1981) concluíram que as leveduras com atividade de inulinase podem ser usadas na produção de etanol, tendo como matéria prima um extrato fermentescível de alcachofra de Jerusalém. Os autores propõem um método que permite atingir rendimentos entre 25 e 65 hL etanol/ha , além da forragem. Pejin et al (1993) estudaram outro método com o mesmo objetivo usando *Kluyveromyces marxianus*, e comparado com a *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se vantajosa devido à matéria prima não precisar de acondicionamento e ao menor consumo de energia. Segundo Klaushofer (1986), a levedura *Kluyveromyces marxianus* contem inulinase e invertase o que a torna satisfatória para a fermentação de inulina.

Bajpai e Margaritis (1986) otimizaram a produção de xaropes concentrados de frutose a partir de extrato de alcachofra de Jerusalém, fonte natural de inulina, usando células inativas de *Kluyveromyces marxianus* e imobilizadas em alginato de sódio. As células imobilizadas foram acondicionadas em reator de leito empacotado e usadas em processo contínuo.

Além dos usos hidrolíticos da inulinase, é factível a síntese de polímeros insolúveis em água atingindo níveis de até 51g/L, segundo foi observado por Santos (1998). Esses polímeros caracterizados como frutooligossacarídeos foram identificados como kestose e nistose, que apresentam efeitos benéficos à saúde semelhantes àqueles atribuídos às fibras(Tomomatsu, 1994, mencionado por Santos(1998)). Sobotka et al (1997) avaliou a inulina como fibra afirmando que a boa tolerância, torna-a uma fonte potencial de fibra em nutrição clínica enteral.

3. Material e Métodos

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC16045 (American Type Culture Collection). As linhagens das culturas foram mantidas em tubos com meio YM (yeast malt agar) (Tabela 2), em temperatura de refrigeração.

Tabela 2. Ágar YM para manutenção do microrganismo.

Composto	Concentração
Extrato de levedura	3,0 g/L
Peptona	5,0 g/L
Glicose	10,0 g/L
Ágar	2,0 g/L
Extrato de malte	3,0 g/L
Temperatura	30 °C
Tempo	24 h

3.2. Fermentação

Para realizar as fermentações o microrganismo foi submetido a um processo de ativação. Culturas contidas em meio foram transferidas para dois tubos com 10 mL de médio líquido YM (Tabela 3) e incubados por 24 horas a 30°C. Em seguida, foram transferidos para dois erlenmeyers trialetados contendo 100 mL de meio de inóculo (Tabela 4), e incubados por 24 horas a 30°C. Para inocular o fermentador foram juntados os dois erlenmeyers em um especialmente adaptado com uma conexão que permitiu a inoculação estéril.

As fermentações foram realizadas em um fermentador de 3L com volume útil de 2,2L tipo Bioflo III New Brunswick Scientific–Edison N.J. USA, ao qual foi adicionados 200 mL de inóculo e pequenas quantidades de antiespumante Aratrop. Foi utilizado o meio apresentado na tabela 5, o qual foi otimizado por Kalil

et al (1999). Durante as fermentações foram tiradas amostras de 5 a 10 mL desde o tempo zero até as 72 horas de fermentação. As amostras foram tiradas em espaços regulares de tempo e medidos a atividade enzimática (sobre inulina e sacarose), biomassa, açúcares totais, viabilidade e proteína total. Além disso, para cada tratamento foi determinado o K_La .

Tabela 3. Meio YM para pre-inóculo do microrganismo.

Composto	Concentração
Extrato de levedura	3,0 g/L
Peptona	5,0 g/L
Glicose	10,0 g/L
Extrato de malta	3,0 g/L
Temperatura	30 °C
Tempo	24 h

Tabela 4. Meio de inóculo.

Composto	Concentração
Sacarose	20,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
K_2HPO_4	5,0 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,65 g/L
NH_4Cl	1,5 g/L
KCl	0,567 g/L
pH	6,8
Temperatura	30°C
Tempo	24 h

Tabela 5. Meio de fermentação.

Composto	Concentração
Sacarose	14,0 g/L
Extrato de levedura	10,0 g/L
Peptona	20,0 g/L
K ₂ HPO ₄	1,0 g/L
pH	3,5
Temperatura	30°C
Tempo	24 h

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Massa seca

Para determinação da massa celular foi construída uma curva padrão de densidade ótica em função da massa seca (m.s.) (Santos, 1998). Foram retiradas amostras de 10 mL de caldo fermentado. As amostras foram centrifugadas a 5000g por 10 minutos em centrífuga refrigerada, marca SORVALL®RC 26 PLUS, a 5 °C. A massa celular foi suspensa em 10 mL de água destilada e a absorbância determinada a 600 nm. A atividade enzimática, proteína total e açúcares redutores foram determinados no sobrenadante do meio de cultura.

3.3.2. Açúcares redutores totais

Para as análises de açúcares redutores, foi utilizado o método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). O reagente DNS é composto de 1416 mL de água destilada, 10,6g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8g de NaOH.

Dissolveram-se tudo a quente e se adicionou em seguida 7,6 mL de fenol fundido a 50°C.

Na determinação das amostras misturou-se 1,0 mL da amostra convenientemente diluída tal que a concentração da amostra esteve no máximo a 1,0 g/L, com 1,0 mL de DNS. A mistura foi mantida em banho-maria a 100°C por 5 minutos e resfriada logo em seguida em banho de gelo. Na mistura adicionaram-se 16,0 mL de tartarato duplo de sódio e potássio, o que age como estabilizante da cor. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Micronal B342II a 540 nm. Na curva padrão se usará sacarose.

3.3.3. Curva padrão de açúcar redutor total

Tubos de ensaios com 1,0 mL de solução de sacarose em concentrações diferentes na faixa de 0,1-1,0 g/L (sensibilidade do método). Em seguida realizou-se a hidrólise da sacarose adicionando 1,0 mL de HCl 1N, deixando-se cinco minutos em banho-maria. A amostra foi colocada em banho de gelo e adicionaram-se 1,0 mL de NaOH 1N e 1,0 mL do reagente DNS por cinco minutos em banho-maria, seguido de banho de gelo. Adicionaram-se 16,0 mL de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura foi realizada a 540 nm. Para calibração do aparelho substituiu-se amostra por água destilada, correspondendo desta maneira ao branco. Em seguida construiu-se um gráfico de concentrações em função da absorbância Santos (1998).

3.3.4. Atividade Enzimática (Invertase e Inulinase)

A dosagem da atividade enzimática foi realizada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. O método consistiu na utilização de um micro-reator encamisado sob agitação e controle de temperatura com auxílio de um banho termostaticado TECNAL TE-184. No reator adicionou-se 5,0 mL de solução de sacarose a 0,06 M, 2,5 mL de tampão fosfato

de sódio 0,05 M a pH 5,2, 1,5 mL de água destilada e 1,0 mL da amostra convenientemente diluída. O mesmo procedimento foi efetuado substituindo a solução de sacarose por inulina (Fluka), para determinar atividade de inulinase. A reação para sacarose ocorre na temperatura de 50°C e por 10 minutos, e para inulina a 50°C por 45 minutos (Santos, 1998).

Foram retiradas amostras de 1,0 mL em intervalos regulares de tempo, e analisaram-se os açúcares redutores totais. Construiu-se a curva de absorbância em função do tempo e com auxílio da curva de calibração de açúcar redutor foram determinadas as atividades enzimáticas. Uma unidade por mL de solução enzimática (UI/mL) foi definida como sendo a capacidade da enzima de hidrolisar 1 μ mol/mL de substrato por minuto.

3.3.5. Proteína total

Na dosagem de proteínas foi usado o método de Lowry (Costa, 1986). Foram usados os seguintes reagentes:

Reagente A: 2% de Na_2CO_3 em uma solução 0.1 N de NaOH.

Reagente B: 0,5% CuSO_4 em uma solução de 1% de tartarato duplo de sódio e potássio.

Reagente C: 50,0 ml do reagente A mais 1,0 ml do reagente B.

O reagente de Folin Ciocalteu foi misturado com água destilada na proporção 1:1. Misturou-se 1,0 ml da amostra com 5,0 ml do reagente C, sendo a mesma homogeneizada e mantida em repouso por 10 minutos. Em seguida adicionaram-se 0.5 ml de Folin Ciocalteu diluído 50%. Deixou-se novamente em repouso por 30 minutos e foi feita a leitura no espectrofotômetro a 750 nm. Para calibração do espectrofotômetro substituiu-se a amostra por 1,0 ml de água destilada. Com o auxílio de uma curva padrão de albumina bovina quantificou-se a proteína da amostra.

3.3.6. Viabilidade celular

Foi utilizado o método de coloração por azul de metileno. Misturou-se uma amostra contendo uma quantidade conhecida de células e uma solução de azul de metileno. As células vivas permanecem incolores, e as mortas ficam coloridas de azul, as mesmas que foram contadas na câmara de Newbauer. Foi calculada como a porcentagem de células vivas em referencia a o total de células.

3.3.7. Coeficiente Volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida ($K_L a$)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado pelo método do borbulhamento, sendo que foi determinado em médio de fermentação sem microrganismo para cada combinação de agitação, aeração e tipo de agitador estudado. As leituras de oxigênio dissolvido(OD) foram feitas com um eletrodo de oxigênio polarográfico. O meio foi borbulhado com nitrogênio até as leituras de OD estiveram entre 0 e 0,2. Em seguida, injectou-se ar e tomaram-se as leituras de OD em função do tempo. Supondo transferência de massa em duas fases em serie a seguinte dedução foi usada para o calculo do $k_L a$:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) \quad (3.1)$$

onde C_L é a concentração de oxigênio no meio e C^* é a concentração de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar, logo integrando:

$$\int_0^C \frac{dC_L}{(C^* - C_L)} = \int_0^t K_L a * t \quad (3.2)$$

temos :

$$-\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = K_L a * t \quad (3.3)$$

fazendo $OD = \frac{C * 100}{C^*}$ temos:

$$-K_L a^* t = \ln\left(\frac{100 - OD}{100}\right) \quad (3.4)$$

3.4. Cálculo das velocidades específicas, rendimentos e produtividade

Aos dados de biomassa, atividade, açúcares redutores em função do tempo foram ajustadas para funções matemáticas com o auxílio do programa Table Curve 2D da Jandel Scientific versão 2.0, levando em conta que o valor do coeficiente de correlação seja elevado, a continuidade da curva e que seja representativa de uma cinética. Após o ajuste foi gerada uma tabela da função e da sua primeira derivada versus tempo para intervalos de tempo de 0,2 h. Usando estas tabelas foram calculadas as velocidades específicas, rendimentos globais e produtividade global.

Estas tabelas foram transformadas em arquivos de dados do programa Statistica versão 5.0 da StatSoft e então delineados os seguintes gráficos:

- Biomassa, atividade sacarolítica, e açúcares redutores totais vs tempo.
- Velocidades específicas de crescimento (μ_X), produção (μ_P) e consumo de substrato (μ_S) vs tempo.
- Rendimentos globais para 72 h de fermentação de biomassa-substrato ($Y_{X/S}$), produto-substrato ($Y_{P/S}$) e produto-biomassa ($Y_{P/X}$), e produtividade global ($Prdtv$) vs tempo.
- Velocidades de crescimento (μ_X) vs açúcares redutores.
- Log X vs tempo.
- $\mu_X / \mu_{X \max}$, $\mu_P / \mu_{P \max}$ vs tempo.
- dX/dt vs biomassa.

Destes gráficos foram resgatados os seguintes dados:

- Atividade sacarolítica máxima (72h)
- Biomassa máxima (72h)
- μ_x máxima e tempo
- μ_p máxima e tempo
- μ_s máxima e tempo
- Produtividade máxima e tempo
- Rendimento biomassa substrato (72h)
- Rendimento produto substrato (72h)
- Rendimento produto biomassa (72h)
- Produtividade global (72h)

Estes dados foram submetidos à análise segundo o planejamento estatístico, determinando-se os efeitos significativos e então ajustados modelos empíricos lineares segundo a técnica de superfície de resposta.

3.4.1. Rendimentos e produtividade

Os rendimentos e produtividade foram calculados globalmente, de forma que foram considerados para o cálculo as concentrações no final da fermentação (72h) tendo como referencia as concentrações no inicio da mesma. As equações 3.5 e 3.6 apresentam o cálculo do rendimento e da produtividade.

$$Y_{C/B} = \frac{(C_f - C_i)}{(B_f - B_i)} \quad (3.5)$$

Sendo:

- $Y_{C/B}$ = Rendimento de C em referencia a B.
- C_f = Concentração de C no final da fermentação.
- C_i = Concentração de C no inicio da fermentação.
- B_f = Concentração de B no final da fermentação.
- B_i = Concentração de B no inicio da fermentação.

$$\text{Pr } dtv = \frac{P_t}{t} \quad (3.6)$$

Sendo:

$\text{Pr } dtv =$ Produtividade no tempo t de fermentação.

$P_t =$ Produto no tempo t .

3.4.2. Velocidades específicas

As velocidades específicas foram calculadas segundo as equações seguintes:

$$\mu_X = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \quad (3.7)$$

$$q_P = \frac{1}{X} * \frac{dP}{dt} \quad (3.8)$$

$$q_S = -\frac{1}{X} * \frac{dS}{dt} \quad (3.9)$$

Sendo:

$X =$ Concentração de biomassa em g/L.

$P =$ Concentração de produto em U/mL.

$S =$ Concentração de substrato em g/L.

$t =$ Tempo em horas.

3.5. Planejamento experimental

Os experimentos foram planejados como sendo dois planejamentos fatoriais de duas variáveis em dois níveis com ponto central. Em cada planejamento foram estudados níveis diferentes de agitação e aeração. Cada fatorial tem por sua vez o propósito de testar o efeito da velocidade de agitação e vazão de aeração sobre a produção de atividade de inulinase (expressada como atividade sobre sacarose). A figura 1 representa de forma esquemática o trabalho experimental seguido durante cada fermentação.

Os tipos de agitadores estudados foram o tipo turbina de disco com seis pás planas, o tipo naval e o tipo "pitched blade up". Os dois primeiros foram usados em duplas, enquanto que o "pitched blade up" foi um único agitador. Os planejamentos foram desenvolvidos com turbinas de Rushton e foi definida a condição ótima de agitação e aeração, testou-se então com esta condição os outros tipos de agitadores.

Durante o processo de fermentação foram mantidos constantes a temperatura de fermentação a 30 °C, o pH inicial a 3,5 e o meio de fermentação segundo especificado no item 3.2.

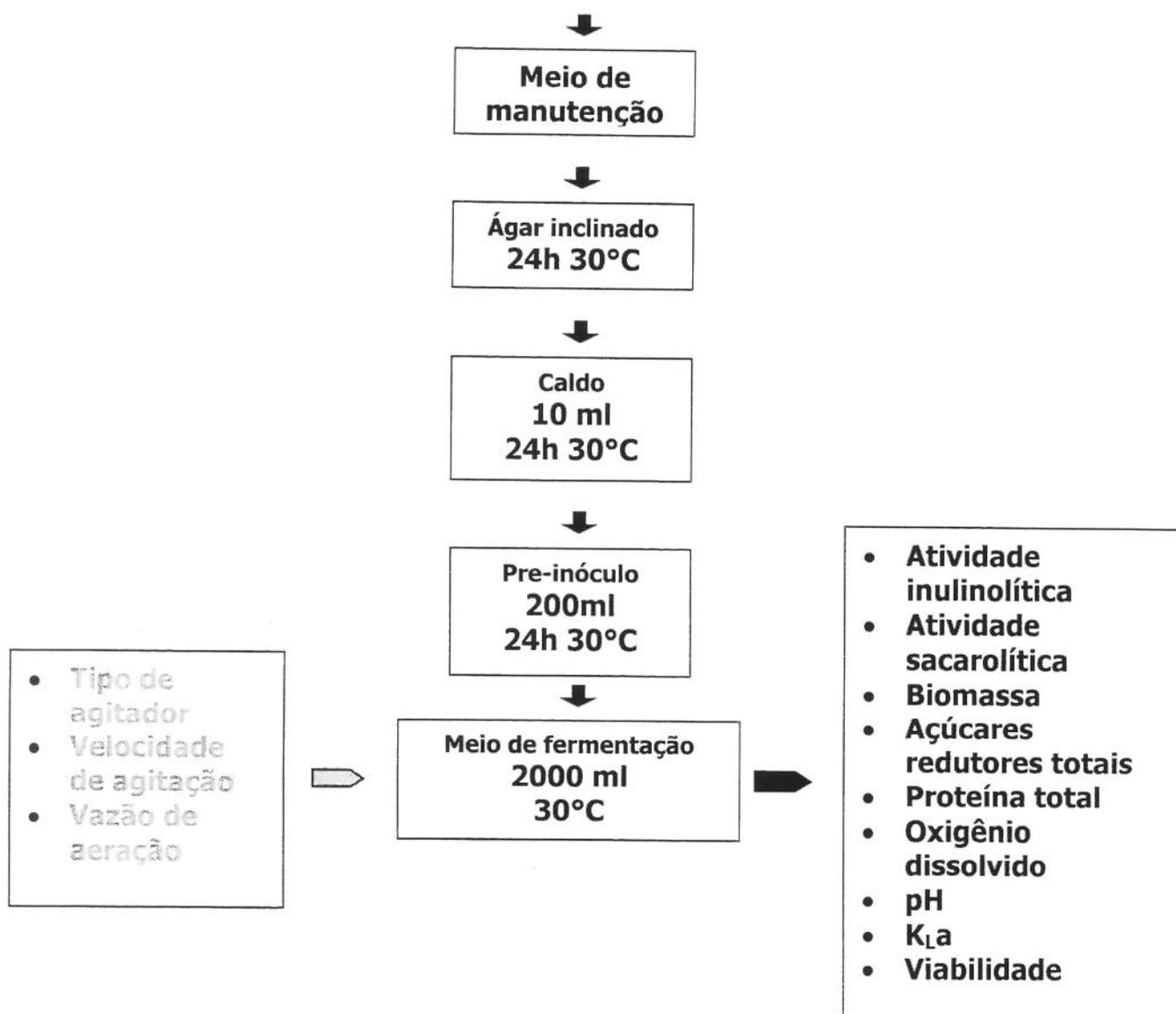
Kluyveromyces marxianus var bulgaricus ATCC16045

Figura 1. Fluxograma do trabalho experimental para a determinação do efeito do tipo de agitador, a velocidade de agitação e vazão de aeração na produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus var bulgaricus*.

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaio preliminares

Foram realizados quatro fermentações, com o objetivo de conhecer a cinética da fermentação e poder definir os intervalos de amostragem. Também, foram testados os níveis dos fatores de variação e a necessidade de controle de pH. Estes testes foram realizados usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

Os resultados dos ensaios são apresentados nas figura 2 a 6. O primeiro ensaio foi conduzido a 200 rpm e 0,5 vvm com controle de pH chegando a produzir (20 UI/mL). Observou-se depois da inoculação, que durante as duas primeiras horas as leituras de OD caíram desde o nível de saturação até valores entre 0 e 1%, mantendo-se até as 18 horas de fermentação. Esta tendência foi conferida nos ensaios posteriores.

O segundo ensaio foi conduzido a 200 rpm e 1,5 vvm com controle de pH, observando-se melhor produção de atividade (60 UI/mL), quando comparado com o primeiro ensaio. Além disso o incremento do volume de meio de fermentação pela adição de ácido e base causou um efeito de diluição.

O terceiro ensaio foi conduzido a 50 rpm e 0,5 vvm com controle de pH, observando-se baixa atividade (9 UI/mL) comparada com os ensaios anteriores. Nos três primeiros ensaios verificou-se o rápido aumento da biomassa, e o consumo do substrato durante as primeiras horas. A partir destes resultados, definiu-se que para o estudo cinético a amostragem seria feita a intervalos de 30 min até às primeiras seis horas.

Para conferir o efeito da diluição realizou-se uma quarta fermentação nas mesmas condições da segunda, mas sem controle de pH. Os resultados mostram que a melhor produção de atividade foi obtida sem controle de pH, atingindo 143

UI/mL em 72 h de fermentação quando comparada com a segunda fermentação (60 U/mL). O pH no início diminuiu ligeiramente até às seis horas, logo aumentando em seguida até às quarenta horas e mantendo-se constante até às 72 horas. Além disso, comparando a figura 3 e 6, observa-se que existe um incremento nas leituras de OD entre as 40 e 45 horas. Isto é um sinal de troca de metabolismo que não é influenciado pelo pH. Portanto, definiu-se que as fermentações posteriores seriam realizadas sem controle de pH. Também, foi observado que o uso de diferentes lotes de peptona influenciaram a produção da enzima, pois a fermentação representada na figura 5 atingiu 143 U/mL, e repetindo-a usando com outro lote de peptona, não conseguiu-se produzir mais que 100 U/mL. Usou-se portanto o mesmo lote de peptona para as fermentações.

Considerando a faixa de níveis de produção de biomassa e atividade com os níveis de agitação e aeração testados, o primeiro planejamento para o estudo da influência da agitação e aeração foi conduzido na faixa de 200-50 rpm e 1,5-0,5 vvm.

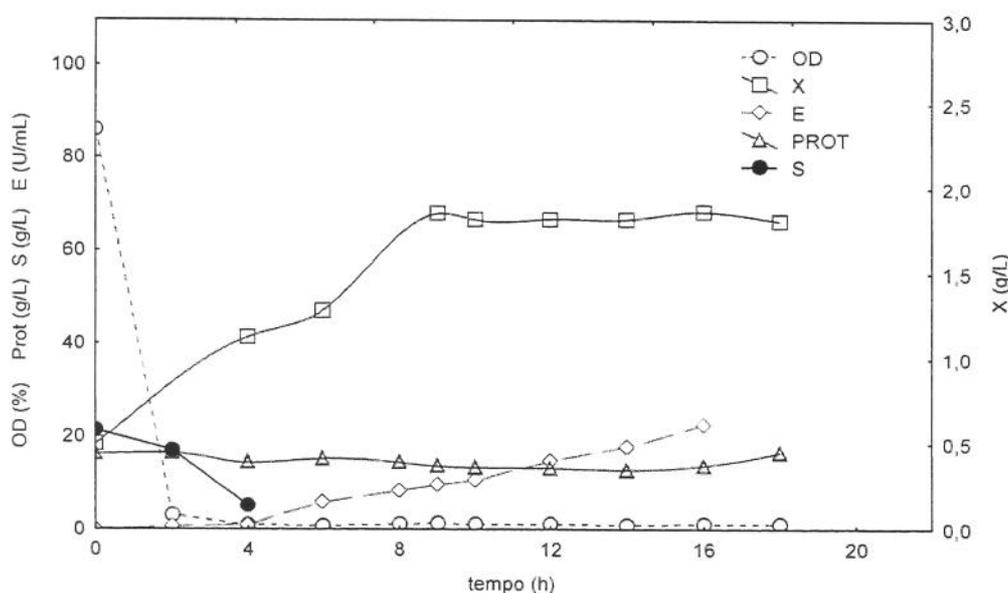


Figura 2. Evolução do oxigênio dissolvido (OD), biomassa (X), atividade enzimática (E), proteína (PROT) e açúcares redutores totais (S) na fermentação de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* a 200 rpm e 0,5 vvm, com pH controlado em 3,5.

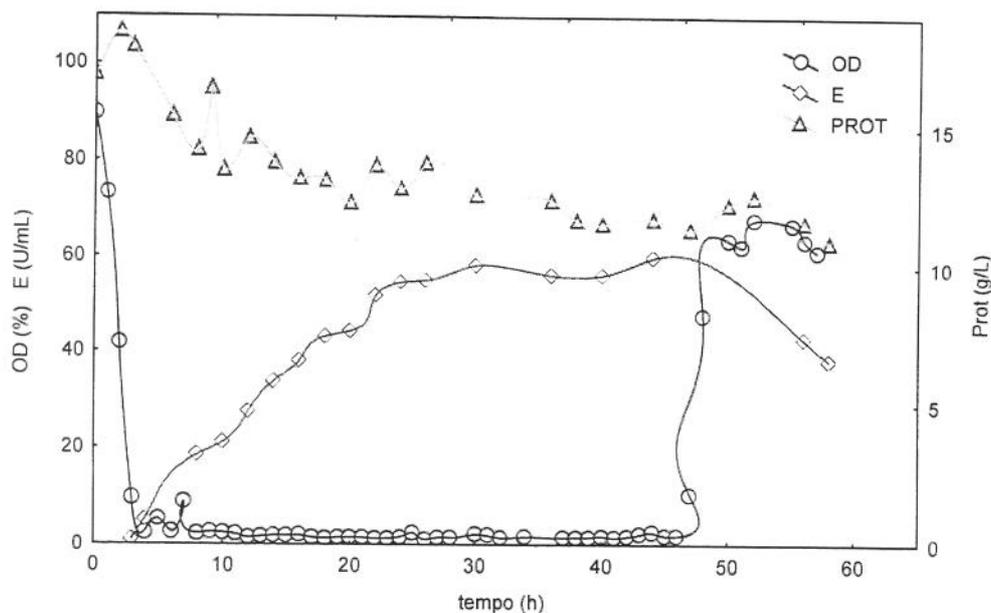


Figura 3. Evolução do oxigênio dissolvido (OD), atividade enzimática (E) e proteína (PROT) na fermentação de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* a 200 rpm e 1,5 vvm, com pH controlado em 3,5.

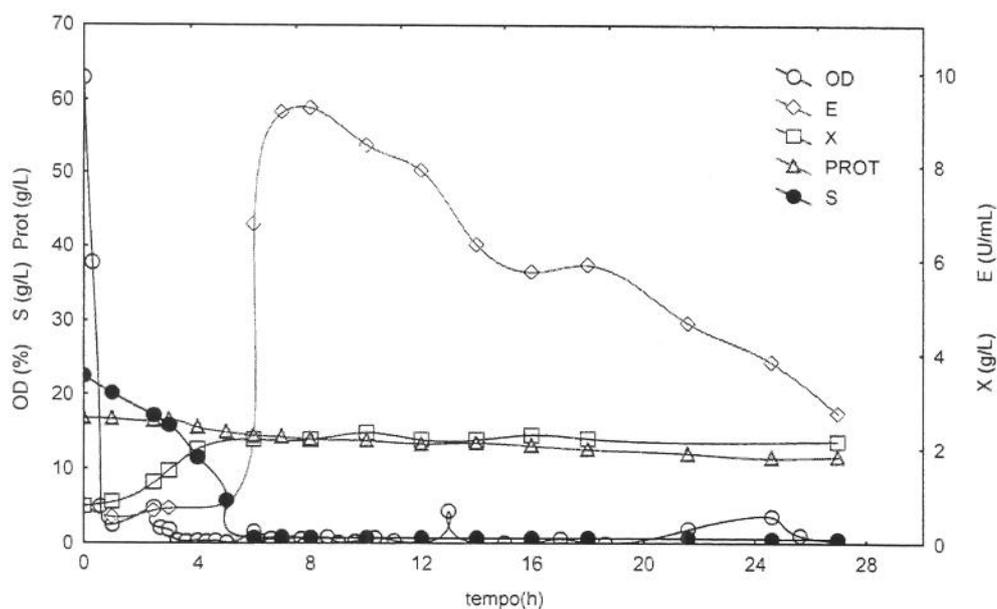


Figura 4. Evolução do oxigênio dissolvido (OD), biomassa (X), atividade enzimática (E), proteína (PROT) e açúcares redutores totais (S) na fermentação de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* a 50 rpm e 0,5 vvm, com pH controlado em 3,5.

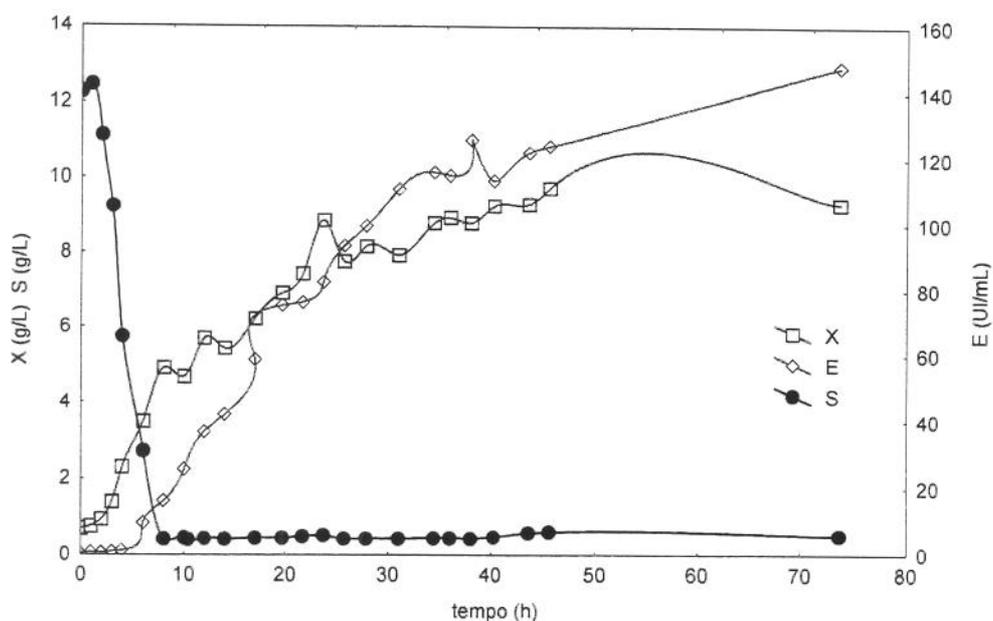


Figura 5. Evolução de biomassa (X), atividade enzimática (E) e açúcares redutores totais (S) na fermentação de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* a 200 rpm e 1,5 vvm, sem controle de pH.

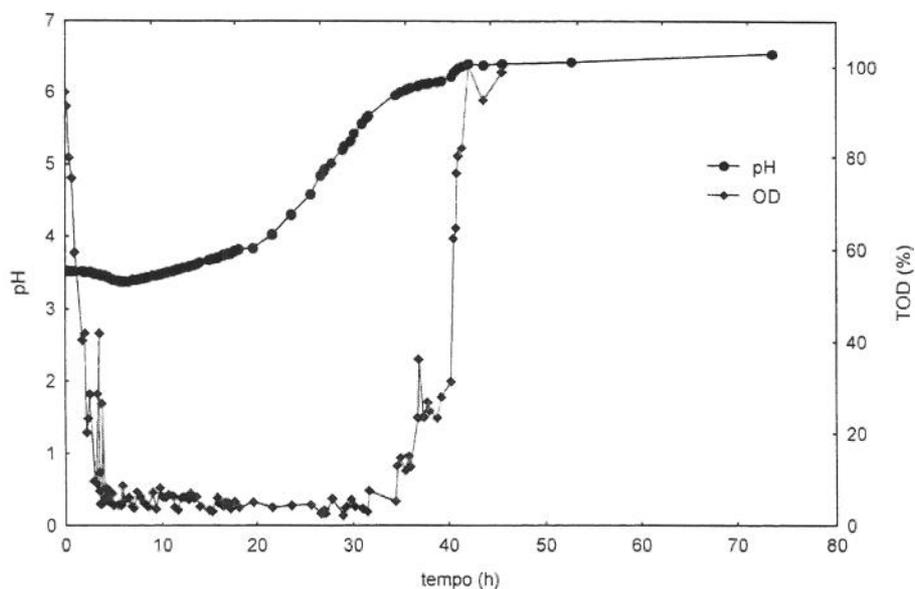


Figura 6. Perfil de pH e OD na fermentação a 200 rpm 1,5 vvm, sem controle de pH.

4.2. Estudo de Otimização da produção de Inulinase

4.2.1. Primeiro Planejamento

Neste planejamento estudou-se a influência da agitação e aeração na produção de atividade sacarolítica e de crescimento de biomassa, sendo que a faixa estudada foi 200 a 50 rpm para agitação e 1,5 a 0,5 vvm para aeração. O planejamento fatorial realizado e as respostas obtidas estão apresentados na tabela 6. No apêndice I são apresentados na forma de gráficos os perfis de biomassa, atividade e substrato de cada tratamento considerado neste planejamento.

Tabela 6. Primeiro planejamento: tratamentos, coeficientes de contraste e respostas.

Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Coeficientes de contraste		Atividade sacarolítica(UI/mL)	Biomassa (g/L)
200	1,5	1	1	101,1	5,98
200	1,5	1	1	88,1	7,36
200	1,5	1	1	87,1	6,50
200	0,5	1	-1	94,7	4,96
150	1,0	0,333	0	73,9	5,65
150	1,0	0,333	0	89,1	5,63
150	1,0	0,333	0	79,3	5,03
50	1,5	-1	1	109,7	4,90
50	0,5	-1	-1	41,2	2,79

Na faixa estudada observou-se que os efeitos principais e a interação agitação-aeração foram significativos a um nível de confiança de 90% sobre a atividade sacarolítica, sendo que os efeitos da aeração e da interação agitação-aeração foram maiores que o efeito da agitação. Os efeitos da aeração e da agitação foram positivos enquanto que o efeito da interação agitação-aeração foi negativo. A tabela 7 apresenta esses efeitos e o erro padrão.

Tabela 7. Efeito das variáveis estudadas (agitação e aeração) e erro padrão sendo a atividade como resposta.

Fatores	Efeito	Erro padrão
Media	82,02	2,99
Agitação	17,3	7,32
Aeração	34,33	7,24
Agitação x Aeração	-34,19	7,24

A atividade sacarolítica (E) foi descrita, significativamente (90%) e sem falta de ajuste, por um modelo linear em função da aeração, agitação e interação de ambas, representado pela superfície de resposta apresentada na figura 7. A análise de variância (ANOVA) é apresentada na tabela 8.

$$E = 82,02 + 17,16 \cdot \text{vvm} + 8,65 \cdot \text{rpm} - 17,1 \cdot \text{vvm} \cdot \text{rpm}$$

(+2,99) (+3,62) (+3,66) (+3,62)

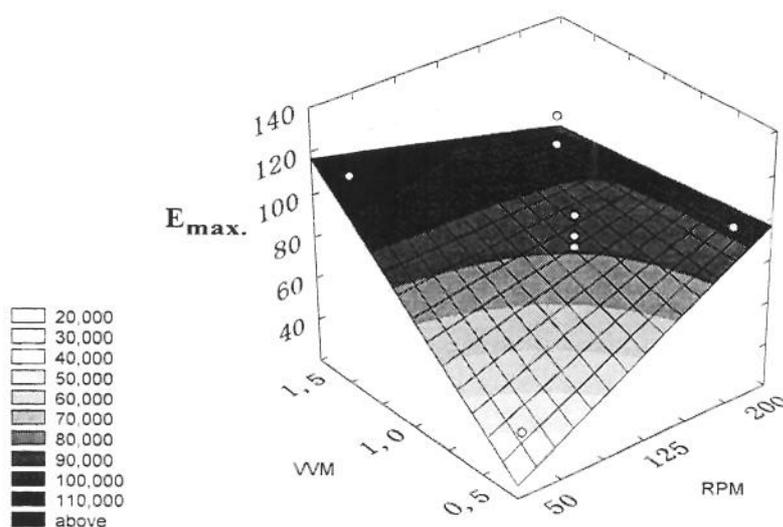


Figura 7. Superfície de resposta que representa o modelo linear ajustado à atividade sacarolítica (E) no primeiro planejamento.

Tabela 8. Análise de variância para o ajuste da atividade enzimática a um modelo linear.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	3258,51	3	1086,17	17,97
Resíduos	323,32	5	64,66	1,07
Falta de ajuste	81,59	1	81,59	1,35
Erro Puro	241,73	4	60,43	
Total	3581,83	8		

% de variação explicada: 90,97% $F_{0,90, 3, 5}=3,62$
 Coeficiente de correlação: 0,95

Os resultados deste planejamento sugerem, através dos efeitos positivos de ambos fatores sobre a atividade enzimática, um incremento nos níveis dos fatores visando uma maior produção.

Em relação à produção de biomassa (X), verificou-se a influência da agitação e aeração, ajustando-se também a um modelo linear. Os efeitos de ambos os fatores foram positivos e semelhantes. A tabela 9 apresenta os efeitos e o erro padrão. A figura 8 representa o modelo linear e a tabela 10 apresenta a ANOVA para o seguinte modelo:

$$X = 4,91 + 0,96 \cdot \text{rpm} + 0,88 \cdot \text{vvm}$$

$$(\pm 0,2) \quad (\pm 0,25) \quad (\pm 0,24)$$

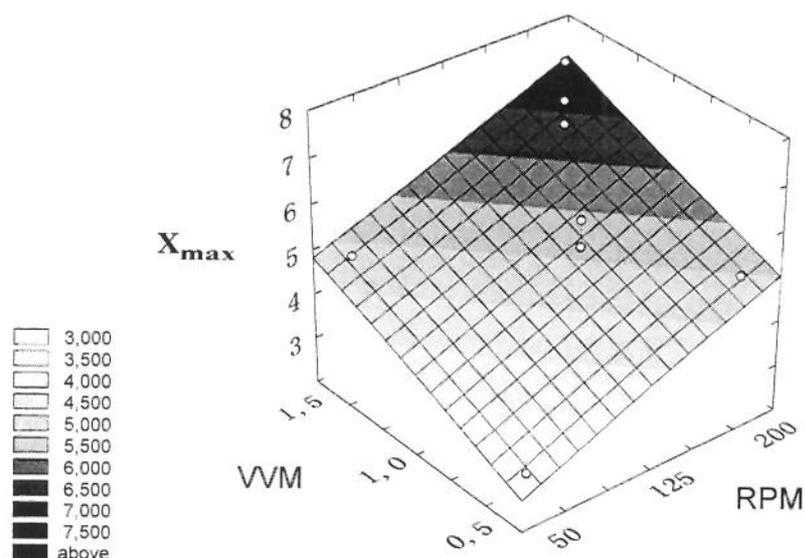


Figura 8. Superfície de resposta que representa o modelo linear ajustado à biomassa (X) no primeiro planejamento.

Tabela 9. Efeitos e erro padrão das variáveis estudadas (agitação e aeração) na produção de biomassa.

Fatores	Efeito	Erro padrão
Media	4,91	0,2
Agitação	1,92	0,49
Aeração	1,75	0,48

Nestas condições de produção foi possível atingir níveis de atividade (109 UI/mL) e de biomassa (7,36g/L), mas elas tiveram um coeficiente de correlação de 0,58 não significativo a um 95% de confiança.

Tabela 10. Análise de variância para o ajuste da biomassa num modelo linear

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	8,62	2	4,31	14,16
Resíduos	1,49	6	0,25	0,81
Falta de ajuste	0,27	2	0,13	0,44
Erro Puro	1,22	4	0,3	
Total	10,1	8		

% de variação explicada: 85,28%

$F_{0,90,2,6}=3,46$

Coefficiente de correlação: 0,92

4.2.2. Segundo planejamento

O segundo planejamento realizou-se em níveis maiores de ambas variáveis, agitação e aeração, sendo a faixa estudada de 150 a 250 rpm e 1,0 a 2,0 vvm. A tabela 11 apresenta os tratamentos, coeficientes de contraste e as respostas obtidas. No apêndice I são apresentados na forma de figuras os perfis de atividade, biomassa e substrato para cada tratamento considerado neste planejamento.

Tabela 11. Segundo planejamento: tratamentos, coeficientes de contraste e respostas.

Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Coeficientes de contraste		Atividade sacarolítica(Ul/mL)	Biomassa (g/L)
250	2,0	1	1	100,8	7,18
250	1,0	1	-1	93,5	6,63
200	1,5	0	0	101,1	5,98
200	1,5	0	0	88,1	7,36
200	1,5	0	0	87,1	6,50
150	2,0	-1	1	77,8	5,65
150	1,0	-1	-1	73,9	5,65
150	1,0	-1	-1	89,1	5,63
150	1,0	-1	-1	79,3	5,03

A atividade sacarolítica (E) foi afetada positivamente pela agitação, enquanto que a aeração não apresentou influência significativa nesta faixa de estudo, o efeito da agitação de 17,92 é quantitativamente semelhante ao mesmo do primeiro planejamento. Os dados se ajustaram ao seguinte modelo linear, representado na figura 9:

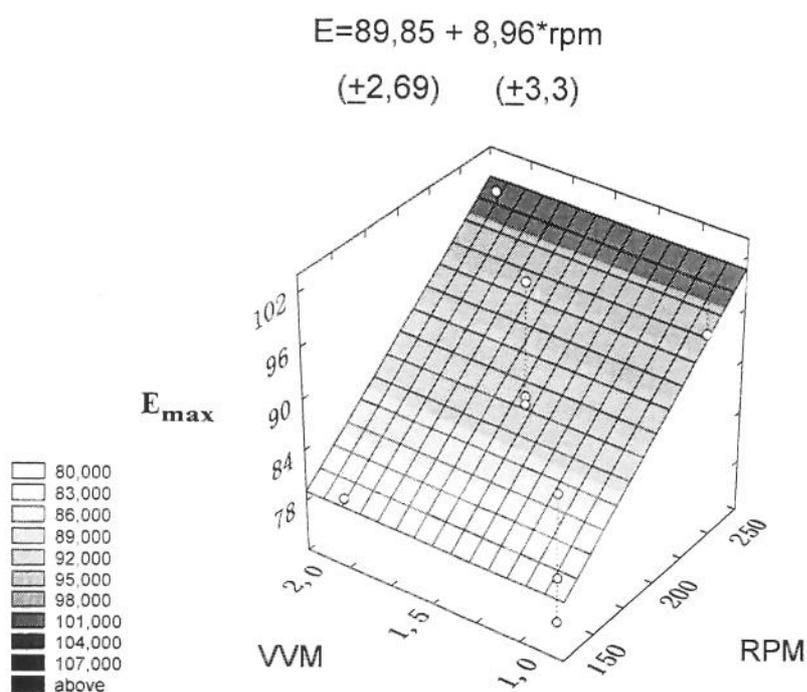


Figura 9. Superfície de resposta que representa o modelo linear que ajusto a atividade sacarolítica no segundo planejamento.

A tabela 12 apresenta os efeitos e erro padrão e a tabela 13 apresenta a análise de variância do modelo linear ajustado.

Tabela 12. Efeito e erro padrão da agitação na atividade sacarolítica no segundo planejamento.

Fatores	Efeito	Erro padrão
Media	89,85	2,69
Agitação	17,92	6,6

Tabela 13. Análise de variância para o ajuste da atividade sacarolítica num modelo linear.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	445,85	1	445,85	7,37
Resíduos	299,12	7	42,73	0,707
Falta de ajuste	57,39	3	19,13	0,317
Erro Puro	241,73	4	60,43	
Total	744,97	8		

% de variação explicada: 59,85%

$F_{0,90, 1, 7}=3,59$

Coefficiente de correlação: 0,77

Em relação à produção de biomassa, nesta faixa de estudo também se verificou que foi unicamente influenciada pela agitação como mostra a tabela 14. Os dados se ajustaram ao seguinte modelo linear, representado na figura 10:

$$X = 6,35 + 0,76 \cdot \text{rpm}$$

$$(\pm 0,19) \quad (\pm 0,23)$$

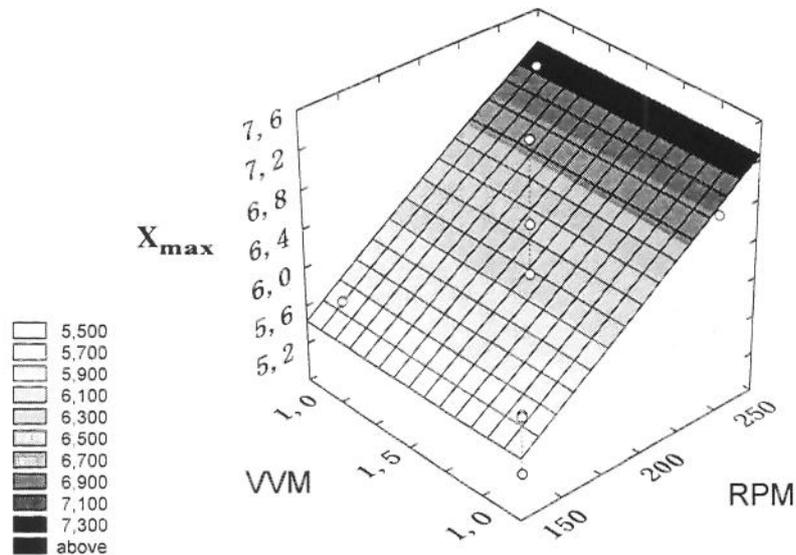


Figura 10. Superfície de resposta que representa o modelo linear ajustado à biomassa (X) no segundo planejamento.

Tabela 14. Efeito e erro padrão da agitação na biomassa no segundo planejamento.

Fatores	Efeito	Erro padrão
Media	6,35	0,19
Agitação	1,52	0,47

Tabela 15. Análise de variância para o ajuste da biomassa num modelo linear.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Media Quadrática	F
Regressão	3,19	1	3,19	10,47
Resíduos	1,73	7	0,25	0,81
Falta de ajuste	0,51	3	0,17	0,56
Erro Puro	1,22	4	0,3	
Total	4,92			

% de variação explicada: 64,81% $F_{0,90, 1, 7}=3,59$
 Coeficiente de correlação: 0,81

A tabela 15 apresenta a análise de variância do modelo linear ajustado aos dados de produção de biomassa no segundo planejamento. Os níveis de atividade neste planejamento foram semelhantes àqueles obtidos no primeiro, como confere a semelhança das medias em ambos modelos ajustados. No caso da biomassa, a media do segundo planejamento foi maior o que indica que a produção de biomassa foi maior quando os níveis de aeração e agitação são maiores.

Assim como no primeiro planejamento, a biomassa e a atividade sacarolítica tiveram um coeficiente de correlação de 0,57, também no segundo planejamento, mas que não foi significativo ao 95% de confiança.

Pode-se observar que ao ser mudadas as faixas de estudo de agitação e aeração mudou-se principalmente os fatores de variação significativos sobre a atividade e não o máximo da atividade produzida, enquanto que no caso da biomassa mudaram ambos.

4.2.3. Efeito da agitação na produção de inulinase

Para continuar o processo de otimização e seguindo a sugestão dos resultados do segundo planejamento foi realizado um estudo da influência da agitação sobre a produção de inulinase mantendo a aeração no nível mínimo (1,0 vvm) e incrementando a agitação.

Em vista disso foram realizadas três fermentações a 350, 450 e 550 rpm, mantendo a aeração em 1,0 vvm. Os dados obtidos foram relacionados com os resultados nas condições de 150 e 250 rpm a 1,0vvm, do segundo planejamento, visando uma maior cobertura do estudo. A figura 11 apresenta os resultados obtidos.

Na figura 11 observa-se que a atividade aumentou com o aumento da agitação desde 150 rpm até 450 rpm, variando desde 80,8 UI/mL até 121 UI/mL respectivamente. Durante os dois planejamentos estudados a viabilidade no final das fermentações foi sempre maior de 90%. Na mesma figura podemos verificar a redução da viabilidade com o aumento da agitação sendo que a 450 rpm chega a 60,37%. A 550 rpm a atividade sacarolítica diminui para 110 UI/mL e a viabilidade diminui drasticamente a 6,25%. A análise da correlação entre a viabilidade e a agitação fornece um coeficiente de $-0,891$, significativo a 95% de confiança.

Apesar do decréscimo da viabilidade nas fermentações com 450 e 550 rpm, a biomassa aumentou quando comparada com a fermentação a 350 rpm. Este fato leva-nos a crer em uma cinética de crescimento e morte, que permite o aumento das leituras de biomassa pela reprodução das células vivas paralelamente a um incremento da contagem de células inviáveis devido a diminuição da viabilidade. Algum tipo de estresse associado com o aumento da agitação deve ser o motivo da interrupção do incremento da biomassa e da atividade a 550 rpm.

A biomassa e a atividade sacarolítica tiveram nesta faixa de estudo um coeficiente de correlação de 0,998 o que foi significativo a 99% de confiança. Isto contrasta com a correlação destas respostas no primeiro e segundo planejamento, o que confirma a importância da agitação na relação entre as mesmas.

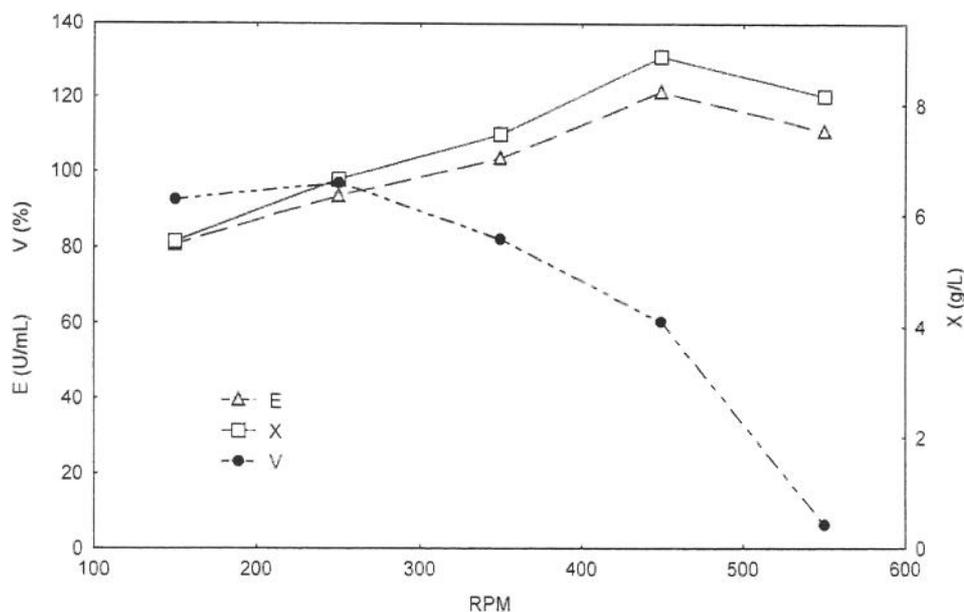


Figura 11. Variação da atividade enzimática (E), biomassa (X) e viabilidade (V) em função da velocidade de agitação a 1,0 vvm.

Pode-se ver que nos planejamentos tanto a biomassa como a atividade enzimática foi afetada significativamente pela agitação, mas não existe boa correlação entre elas porque o efeito da aeração aumentou os desvios desta correlação. Logo, com o incremento da agitação, mantendo constante a aeração, estabeleceu-se uma correlação importante entre a biomassa e a atividade sacarolítica.

A otimização dos parâmetros de agitação e aeração na produção de atividade sacarolítica e de biomassa foi atingida trabalhando a 450 rpm e 1,0 vvm, usando como agitador duas turbinas de Rushton, com uma produção de 121,5 UI/mL após 72 horas de fermentação.

4.2.4. Influência do tipo de agitador na produção de inulinase

Visando definir alguma influência do tipo de agitador na produção de inulinase foram realizadas duas fermentações a 450 rpm e 1,0 vvm variando o tipo de agitador. Os estudos anteriores foram desenvolvidos usando duas turbinas de Rushton. Os tipos adicionais de agitador usados foram: duas hélices navais e um agitador tipo "pitched blade up".

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 16. Observa-se que o melhor desempenho foi atingido usando um agitador tipo "pitched blade up", produzindo uma atividade de 176,2 (UI/mL), quase 50% a mais do produzido com as duas turbinas de Rushton. No entanto, a produção de biomassa foi quase a mesma da obtida com duas turbinas de Rushton.

Tabela 16. Influência do tipo de agitador na produção de atividade enzimática e biomassa a 450 rpm e 1,0 vvm.

Tipo de agitador	Atividade	Biomassa
	Sacarolítica (UI/mL)	(g/L)
Duas turbinas de Rushton	121,5	8,90
Duas hélices navais	126,1	6,54
Um pitched blade up	176,2	8,63

O desempenho das hélices navais (HN) na produção de atividade enzimática foi similar ao desempenho das turbinas de Rushton (Tabela 16), embora a biomassa tenha sido relativamente mais baixa. Também, verificou-se que não existe correlação entre a atividade e biomassa.

Pode-se, no entanto, afirmar que este conjunto de observações, em diferentes faixas de estudo, permitiu estabelecer que as relações entre biomassa e atividade estão fortemente influenciadas pelas condições da aeração, agitação e do tipo de agitador utilizado durante a fermentação.

A figura 12 mostra a influência do tipo de agitador na cinética de morte durante a fermentação. Observou-se que com a turbina de Rushton usando 450 rpm a viabilidade chegou até a 60,37% no final da fermentação, entretanto a 550 rpm, a viabilidade celular diminuiu rapidamente nas primeiras vinte horas de fermentação, chegando ao final da mesma com 6,25% de viabilidade. Isto contrasta com o desempenho das duas hélices navais e do “pitched blade up” (PTB), principalmente o primeiro que consegue manter a viabilidade constante durante toda a fermentação, da mesma forma que as turbinas de Rushton em baixas velocidades de agitação. Já o “pitched blade up” permite chegar ao final da fermentação com 69% de viabilidade, mas a atividade obtida alcançou níveis superiores.

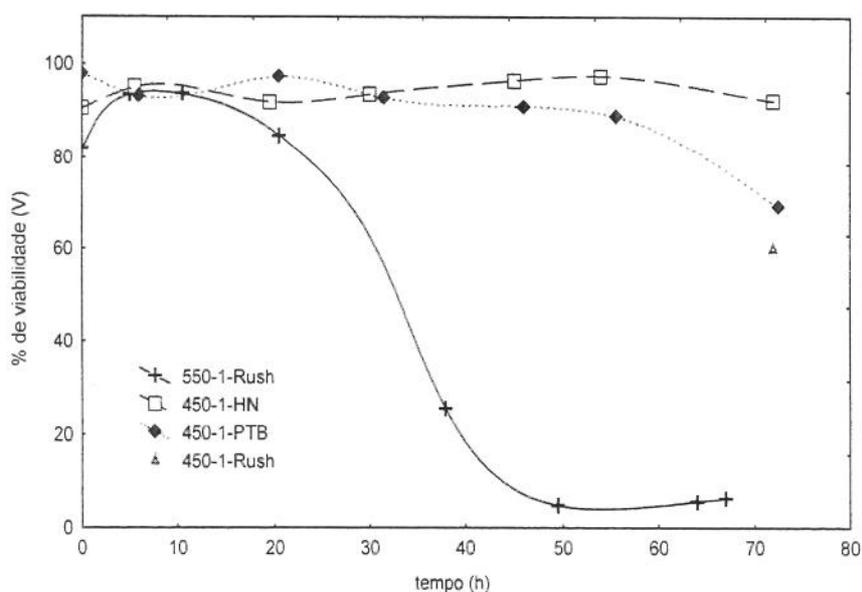


Figura 12. Influência do tipo de agitador no desempenho da viabilidade durante a fermentação.

4.3. Estudo cinético da produção de Inulinase

Durante o processo de fermentação foram estudadas algumas relações e tendências entre as variáveis medidas, tais como pH, velocidades específicas e concentrações. Neste item se faz referência as figuras apresentadas no apêndice I e as explicações são ilustradas com casos representativos(figura 13 a 25).

4.3.1. pH

Observou-se que o pH diminuiu ligeiramente desde o valor inicial (3.5-3.6) até um mínimo (3.38-3.45), o que aconteceu entre as cinco e seis horas de fermentação. Logo o pH aumenta, mas a tendência do aumento foi variável segundo a combinação de agitação e aeração, podendo atingir valores desde 3,6 até 6,6.

Para tratamentos que combinam agitação e aeração, no primeiro e segundo planejamento, para a maior agitação e maior aeração, a tendência do incremento do pH foi mais rápida, sendo que o nível mais alto pode ser atingido já nas 35 h da fermentação conduzida a 250 rpm e 2,0 vvm como mostrada na figura 13. Entretanto para baixas agitações e baixas aerações o incremento foi mais lento, chegando a níveis baixos como no final da fermentação conduzida a 50 rpm e 0,5 vvm mostrada na figura 14. A figura 15 apresenta o desempenho do pH para uma fermentação conduzida a níveis médios de agitação e aeração.

O uso de agitação maior como no caso das fermentações conduzidas a 1,0 vvm, o rápido incremento do pH se reverte a um incremento lento com agitações maiores que 350 rpm. Relações importantes entre o desempenho do pH e o k_La serão explicitas no estudo do k_La (item 4.4).

4.3.2. Oxigênio dissolvido (OD)

A partir da inoculação pode-se observar que o OD cai bruscamente desde o nível de saturação até níveis baixos durante as duas primeiras horas de fermentação. Os níveis baixos de OD se mantiveram durante um certo período da fermentação que variou segundo o tratamento. Após este período um incremento igualmente brusco até atingir leituras de OD consideravelmente maiores. É importante destacar que este incremento coincide com o momento em que o pH atinge o valor máximo (figuras 13 e 15).

O tempo, no qual a leitura de OD permanece baixa, esta relacionado com tipo de tratamento aplicado, como pode-se observar nas figuras 13, 14 e 15. Nestas também, pode-se observar a relação estreita entre o pH e OD refletindo de certa forma o tipo de metabolismo seguido. No item 4.4 serão esclarecidas algumas relações entre o k_{La} e OD.

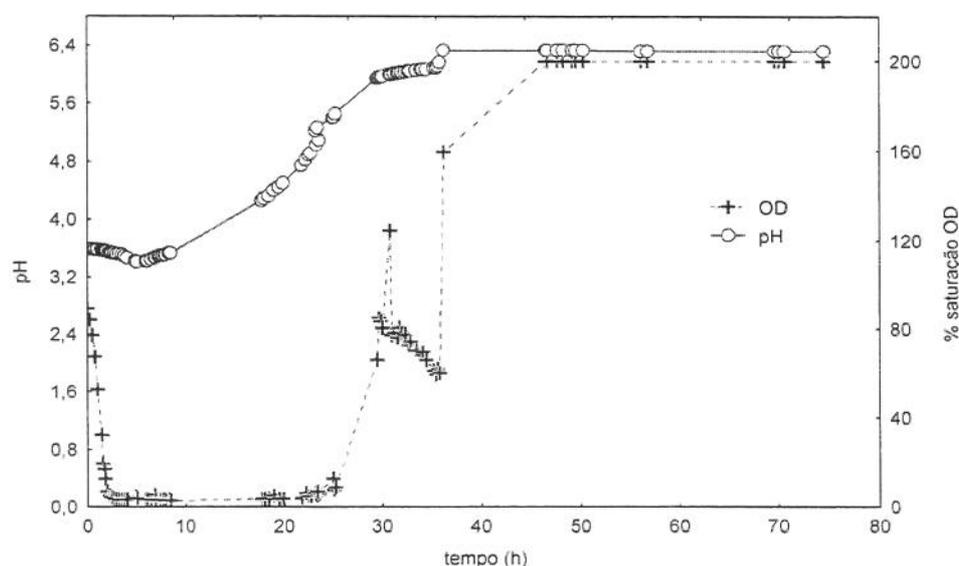


Figura 13. Relação entre o pH e OD durante a fermentação conduzida a 250 rpm e 2,0 vvm

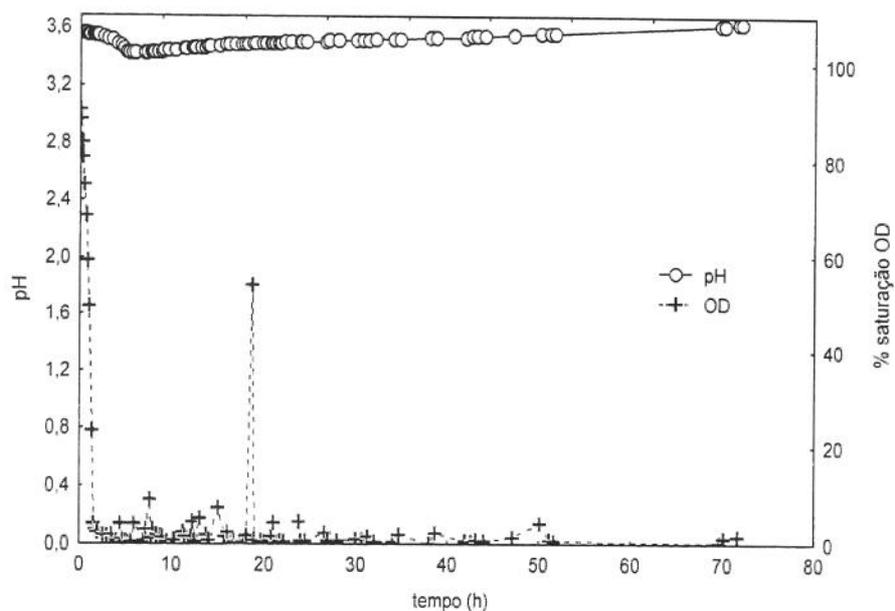


Figura 14. Relação entre o pH e OD durante a fermentação conduzida a 50 rpm e 0,5 vvm

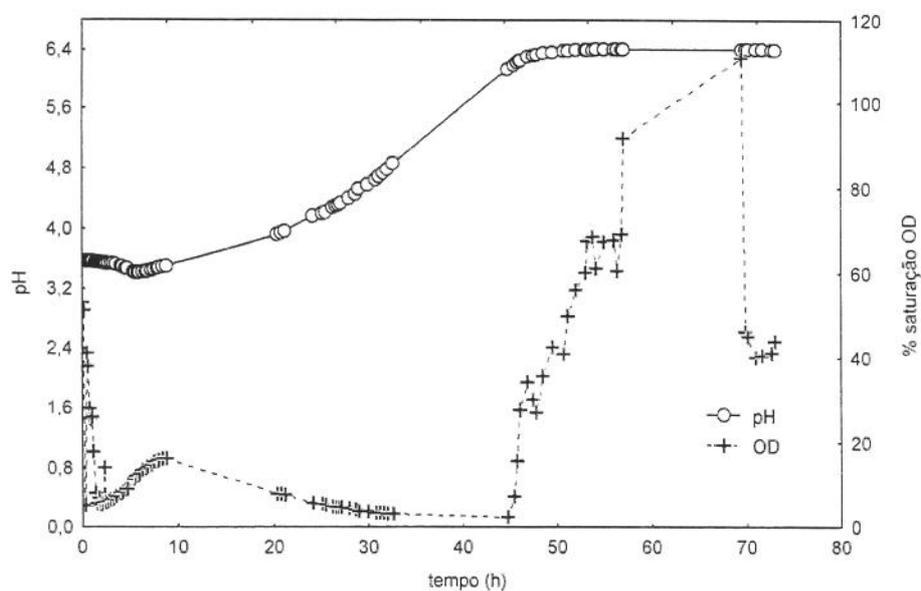


Figura 15. Relação entre o pH e OD durante a fermentação conduzida a 200 rpm e 1,5 vvm

4.3.3. Substrato

Em relação à concentração do substrato, determinada a partir das análises de açúcares redutores totais, verificou-se decréscimo dos 14 g/L até um valor mínimo de 0,5 g/L aproximadamente durante as primeiras seis horas de fermentação. Esta tendência foi claramente independente do tratamento. A figura 16 mostra a cinética de consumo de substrato da fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm, usando um agitador tipo "pitched blade up".

Pelo esgotamento rápido da sacarose como substrato, pensou-se que a proteína e aminoácidos contidos no meio poderiam estar sendo usados como fonte de carbono para o crescimento subsequente do microrganismo, mas a figura 17 apresenta o desempenho característico de todas as fermentações, no qual não se percebe alteração significativa na concentração de proteína e aminoácidos no meio.

4.3.4. Biomassa

O incremento da biomassa também foi característico de todas as fermentações. No início da fermentação há uma fase de adaptação que dura até as duas primeiras horas de fermentação, tempo que coincide com o decréscimo do OD até atingir seu valor mínimo. Logo após tem-se um incremento rápido da biomassa cuja duração é função do tratamento. Posteriormente o incremento da biomassa tem um ritmo muito mais lento inclusive até as 72 h de fermentação (figura 16). Existem, portanto dois mecanismos biossintéticos distintos no microrganismo: um de crescimento rápido, tendo-se sacarose como fonte de carbono, e outro lento tendo outros compostos como fonte de energia, talvez alguma própria reserva interna na forma de polímeros.

4.3.5. Atividade sacarolítica

A produção de atividade sacarolítica teve também um comportamento uniforme. Começou a ser produzida logo após o esgotamento do substrato carbonado, isto aproximadamente após as seis primeiras horas de fermentação. Isto denota uma inibição da produção da enzima em presença de açúcar fato este bem estudado por Contiero (1992). Este autor verificou através de estudos em fermentação continua que após perturbações provocadas por pulsos efetuados com sacarose, glicose e frutose, ocorria uma repressão da síntese da enzima a qual era aliviada com o esgotamento do açúcar. O incremento posterior da atividade foi também característico, sendo que na maioria das fermentações o formato da curva foi semelhante à apresentada na figura 16, variando segundo o tratamento a atividade atingida no final da fermentação.

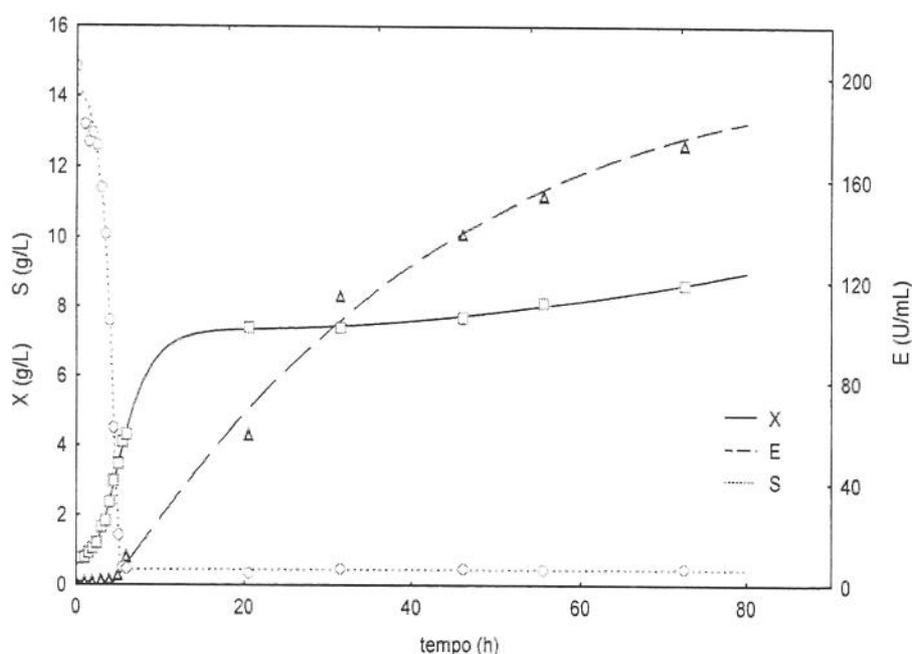


Figura 16. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) durante a fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo "pitched blade up".

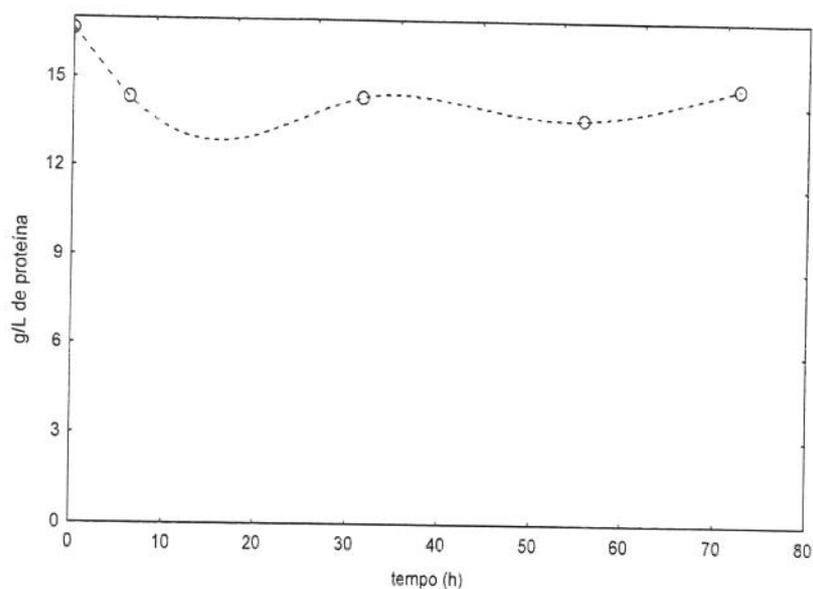


Figura 17. Desempenho da concentração de proteína durante a fermentação a 450 rpm e 1,0 vvm usando o agitador “pitched balde up”.

Na curva de operação (figura 18) pode-se observar duas etapas distintas nas quais a biomassa aumenta usando substratos diferentes. O primeiro substrato foi usado até produzir 7,2 g/L de biomassa, enquanto o segundo substrato foi usado para o crescimento até as 72 horas. Observou-se que o primeiro substrato é intensamente usado na produção de biomassa, permitindo o ciclo completo da velocidade de crescimento, enquanto que o segundo substrato foi usado a partir das 8 horas de fermentação até as 72 horas permitindo um incremento da biomassa de só 1,3 g/L.

Foram feitas também as análises de atividade sobre inulina e determinou-se a relação S/I durante a fermentação, a qual foi aproximadamente 20 como apresenta a figura 19.

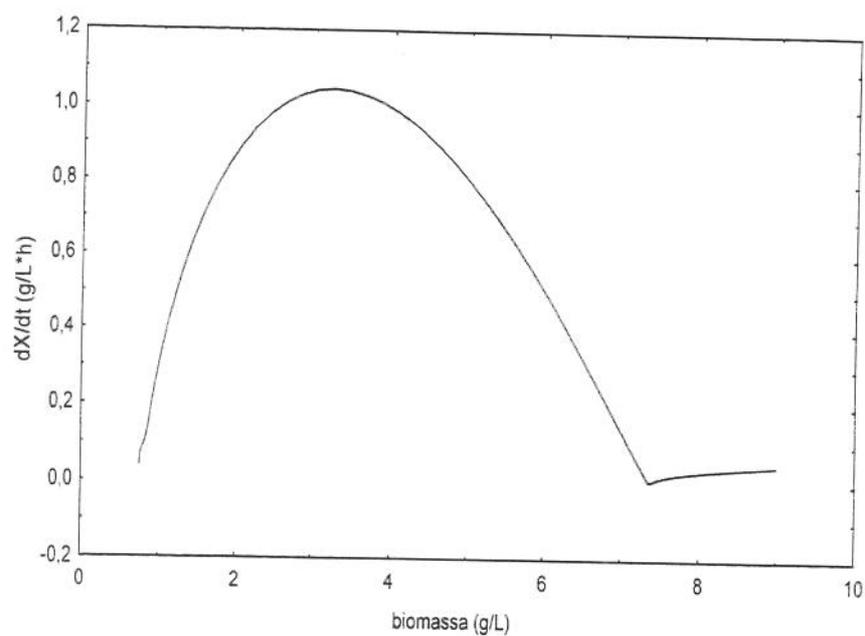


Figura 18. Curva de operação durante a fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador do tipo "pitched blade up".

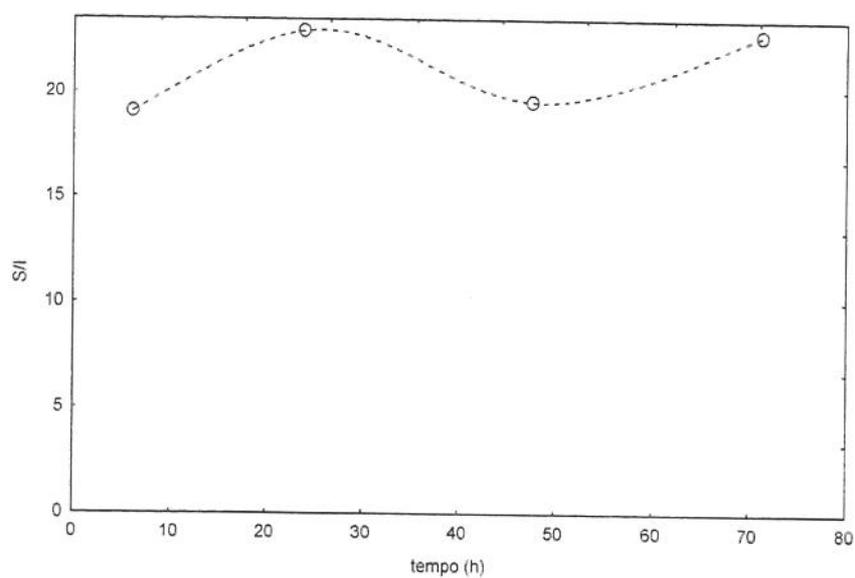


Figura 19. Relação S/l durante a fermentação a 150 rpm e 1,0 vvm usando turbinas de Rushton.

4.3.6. Velocidades específicas

Na figura 20 apresenta-se a velocidade específica de crescimento, consumo de substrato e produção de enzima inulinase durante a fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo “pitched blade up”. Para todos os tratamentos as velocidades específicas também tiveram um comportamento padrão como representado na figura 20, variando o máximo atingido e o tempo no qual é atingido, segundo o tratamento. A tabela 17 apresenta as velocidades máximas e o tempo no qual foram atingidos para todas as fermentações.

Na figura 21, pode-se ver que o crescimento está parcialmente associado a produção da enzima, segundo a classificação de Gaden (1959). Nesta figura percebe-se que a velocidade específica de produção μ_P começa a aumentar rapidamente após o pico de $\mu_{X_{max}}$, ou seja, na fase decrescente de crescimento.

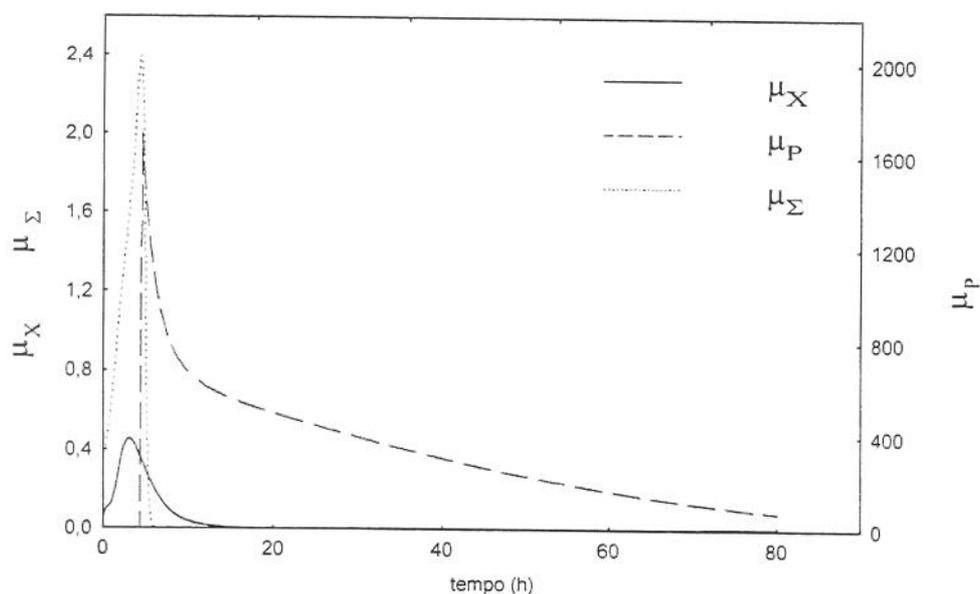


Figura 20. Velocidades específicas durante a fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo “pitched blade up”.

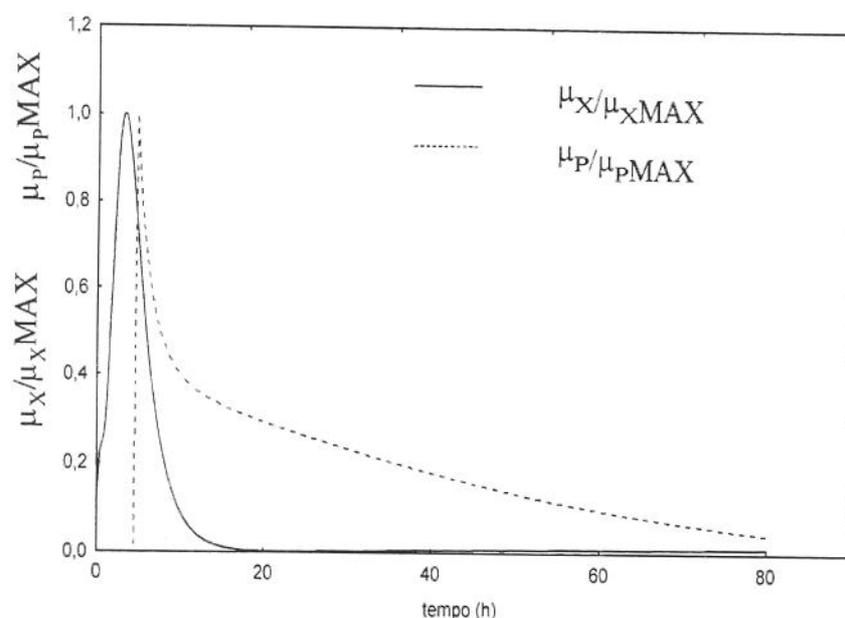


Figura 21. Relação entre o crescimento e a produção de atividade sacarolítica durante a fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo “pitched blade up”.

Da forma como a atividade sacarolítica e a biomassa foram analisadas de acordo com o item 4.2, revelou-se que somente μ_{xmax} (Tabela 17) foi afetado significativamente pela agitação a 90% de confiança quando trabalhou-se entre 50-200 rpm e 0,5-1,5 vvm. O modelo linear ajustado, a ANOVA e a superfície de resposta são apresentados na tabela 18 e figura 22 respectivamente. O mesmo efeito da agitação sobre o μ_{xmax} foi observado no estudo de agitação mantendo a aeração constante como se pode ver na figura 23.

Tabela 17. Velocidades específicas máximas e tempo no qual foram atingidas segundo o tratamento

Tratamento	$\mu_{X_{max}}$	Tempo $\mu_{X_{max}}$	$\mu_{P_{max}}$	Tempo $\mu_{P_{max}}$	$\mu_{S_{max}}$	Tempo $\mu_{S_{max}}$
200 1,5	0,380	2,8	1359,3	4,6	2,357	4,8
200 1,5	0,444	4,2	884,3	3,2	3,245	4,4
200 1,5	0,393	3,6	1636,6	3,6	3,036	4,2
200 0,5	0,383	1,0	608,2	12,6	2,279	3,2
150 1,0	0,449	4,0	866,3	3,4	1,800	2,0
150 1,0	0,572	0,4	787,4	8,6	1,244	4,4
150 1,0	0,423	3,4	1337,6	6,2	2,978	4,2
50 1,5	0,549	0,6	1080,1	6,4	2,412	3,6
50 0,5	0,523	1,4	1503,1	3,0	4,050	0,4
250 2,0	0,447	1,4	1242,0	4,4	2,359	4,6
250 1,0	0,414	3,6	1413,0	5,8	2,808	4,0
150 2,0	0,499	3,2	912,6	2,6	2,704	2,6
350 1,0	0,466	3,6	2614,1	5,2	2,362	4,8
450 1,0	0,485	3,4	1529,3	5,2	1,880	4,8
550 1,0	0,515	4,0	1106,5	9,2	3,034	4,8
450 1,0 HN	0,384	3,6	1786,9	4,8	2,859	4,2
4501,0 PTB	0,455	3,0	1688,9	4,6	2,394	4,4

Em todas as faixas de estudo as velocidades específicas de produção e de consumo de substrato ($\mu_{P_{max}}$ e $\mu_{S_{max}}$) não foram afetadas significativamente (tabela 17 e figura 23), não podendo-se estabelecer relações com os fatores de variação.

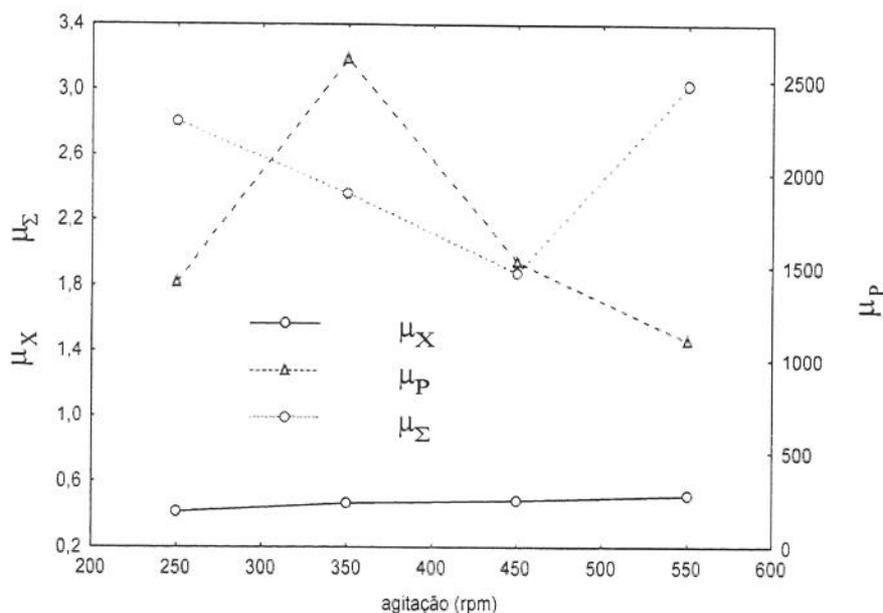


Figura 23. Velocidades específicas segundo a agitação.

4.3.7. Rendimentos globais e produtividade

Os rendimentos globais, produtividade global e produtividade máxima são apresentados na tabela 19. A análise da produtividade e rendimentos globais de produto (Y_p/s) e biomassa (Y_x/s) como função dos fatores de variação, perde relevância porque eles dependem da atividade sacarolítica e biomassa produzidas até o final da fermentação (72 h), sendo que também o consumo de substrato tem um comportamento padrão para todas as fermentações. Na figura 24 observa-se que a relação entre ambos não é constante, sendo que no início da fermentação o Y_p/x incrementou rapidamente até as 50 horas de fermentação após o que o incremento foi mais lento até quase permanecer constante no final da fermentação. Pode-se observar que as curvas do Y_x/s e Y_p/s refletem o comportamento das curvas de biomassa e atividade sacarolítica apresentadas na figura 16. Entretanto, a análise da curva de produtividade foi interessante, pois ela teve um máximo antes do final da fermentação. O tempo no qual se atinge a produtividade máxima variou segundo o tratamento desde 11,8 h até 42,8 h.

Tabela 18. Análise de variância para o ajuste da $\mu_{X_{max}}$ num modelo linear.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	0,0247	1	0,0247	6,596
Resíduos	0,0183	7	0,0026	0,698
Falta de ajuste	0,0033	3	0,0011	0,295
Erro Puro	0,015	4	0,0037	
Total	0,0429	8		

% variação explicada: 57,45

$F_{0,90,1,7} = 3,59$

Coefficiente de correlação: 0,76

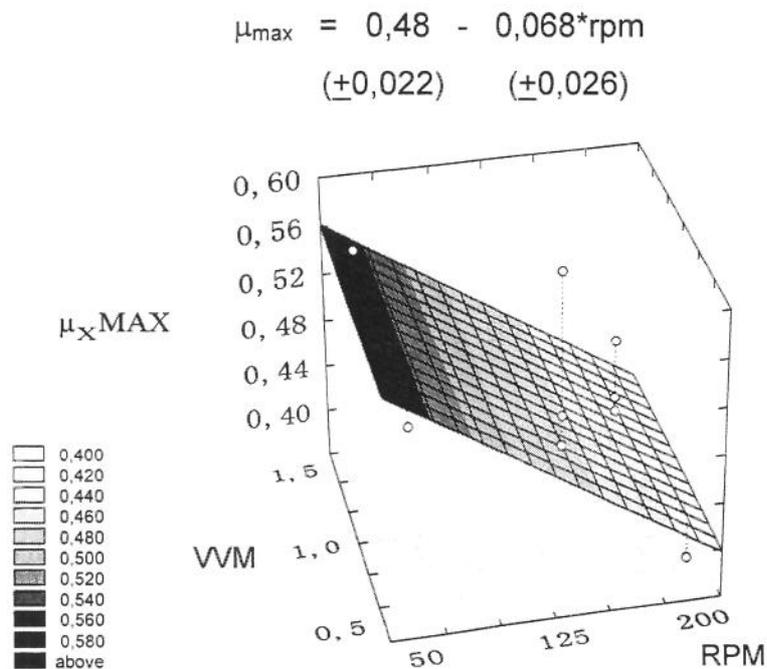


Figura 22. Superfície de resposta que representa o modelo linear ajustado a $\mu_{X_{max}}$ quando se trabalhou entre 50-200 rpm e 0,5-1,5 vvm.

A análise da produtividade máxima e do $Y_{p/x}$ segundo as condições de agitação e aeração, permitiu definir que eles podem ser afetados segundo a faixa estudada. O rendimento produto-biomassa ($Y_{p/x}$) parece obedecer a uma relação entre a produção e o crescimento. Com o primeiro planejamento verificou-se que a produtividade máxima foi uma função da aeração e da interação da agitação e aeração, entanto o $Y_{p/x}$ foi uma função só da interação. Já no segundo planejamento a produtividade máxima foi uma função da agitação e o $Y_{p/x}$ não foi afetado pela agitação nem a aeração. Quando se variou a agitação, mantendo a aeração constante, e utilizados outros tipos de agitadores também não se estabeleceu uma relação significativa.

Tabela 19. Rendimentos globais, produtividade máxima e produtividade global.

Tratamento	$Y_{p/s}$ Global (UI/g)	$Y_{x/s}$ Global (g/g)	$Y_{p/x}$ Global (UI/g)	Produtividade Global (UI/L*h)	Produtividade Máxima (UI/L*h)
200 1,5	7919,0	0,438	18076,4	1389,5	2070,3
200 1,5	7301,2	0,572	12758,7	1222,9	1665,4
200 1,5	6699,3	0,458	11723,7	1201,6	1684,4
200 0,5	6161,6	0,286	21553,9	1344,7	1576,8
150 1,0	5342,4	0,375	14597,1	1027,0	1566,4
150 1,0	7059,2	0,411	17185,5	1227,9	1751,8
150 1,0	6247,3	0,345	18112,1	1091,9	1286,1
50 1,5	8321,7	0,343	24291,0	1566,9	2130,5
50 0,5	2708,3	0,161	16811,4	529,8	973,5
250 2,0	7940,5	0,525	15123,1	1389,4	2321,1
250 1,0	7217,2	0,465	15514,7	1290,7	2196,3
150 2,0	6009,1	0,397	15141,7	1071,4	1343,0
350 1,0	8817,4	0,601	14667,8	1428,7	3224,8
450 1,0	11363,9	0,791	14363,8	1682,8	2856,3
550 1,0	8254,9	0,569	14498,6	1535,0	3684,2
450 1,0 HN	9192,6	0,429	21445,4	1740,6	2967,0
4501,0 PTB	12650,0	0,57	22189,6	2431,4	3347,7

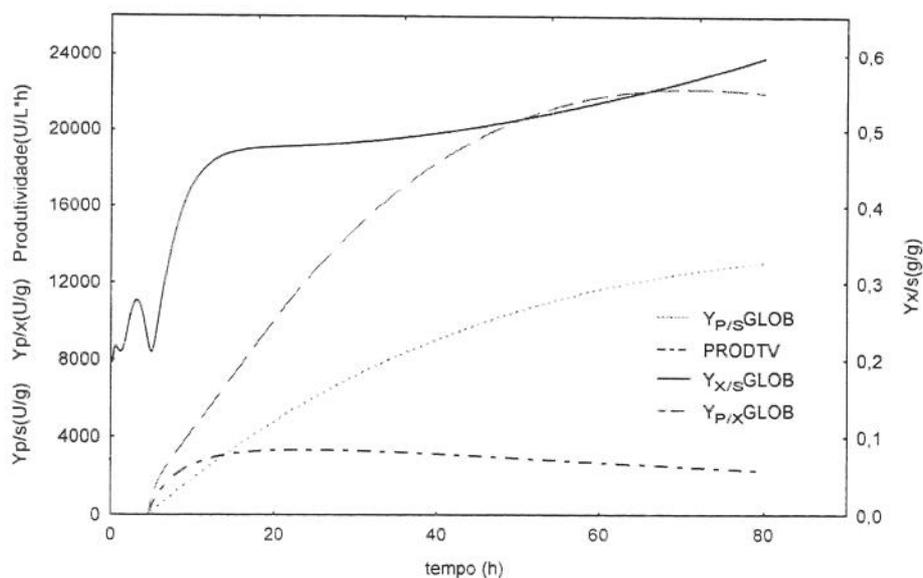


Figura 24. Rendimentos e produtividade durante a fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo “pitched blade up”.

4.3.8. Cinética de crescimento

A figura 25 representa o formato da curva μ_x vs S, verificando-se que ela difere do formato que representa a cinética de Monod. O início da fermentação foi marcado por um tipo de inibição de substrato, pois a velocidade específica de crescimento não começou a fermentação no máximo como característico da cinética de Monod, pelo contrario num mínimo, e logo após um período de adaptação curto a velocidade específica de crescimento chega ao máximo. Neste ponto não há um patamar como é característico da cinética de Monod, observando-se uma diminuição gradativa de μ_x até um ponto crítico a partir do qual a diminuição é abrupta chegando a zero.

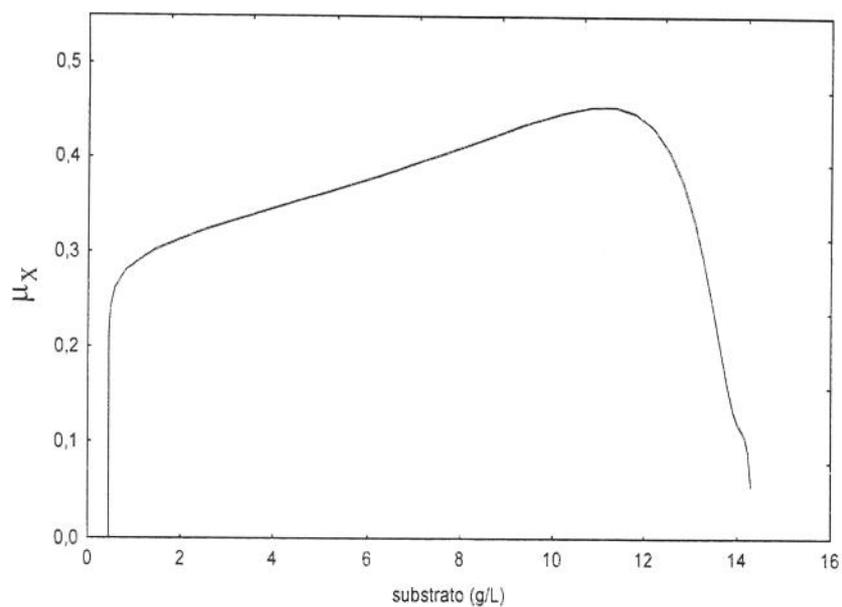


Figura 25. Curva de μ_x em função da concentração do substrato na fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador do tipo "pitched blade up".

4.4. Estudo do K_{La}

4.4.1. Efeito da agitação e aeração no K_{La}

Para quantificar o efeito da agitação e aeração no K_{La} foi realizado o planejamento apresentado na tabela 20. Este planejamento abrange a faixa completa de agitação e aeração usada nos planejamentos do item 4.2 que permitiram esclarecer a influencia da agitação e aeração na produção de atividade e biomassa.

Tabela 20. Planejamento para o estudo do K_{La} : tratamentos, coeficientes de contraste e respostas.

Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Coeficientes de contraste		K_{La} (h ⁻¹)
250	2,0	1	1	38,99
250	1,0	1	-1	23,65
150	2,0	-1	1	20,77
150	1,0	-1	-1	12,74
200	1,5	0	0	26,73
200	1,5	0	0	25,64
200	1,5	0	0	24,39
200	2,82	0	2,64	40,65
200	0,18	0	-2,64	6,03
352	1,5	3,05	0	59,90
48	1,5	-3,05	0	30,38

A tabela 21 apresenta os efeitos significativos a um 90% de confiança, se observa que os efeitos mais importantes são os termos lineares da agitação e aeração. O K_{La} se ajustou num modelo quadrático:

$$K_{La} = 23,46 + 5,27 \cdot \text{rpm} + 2,29 \cdot \text{rpm}^2 + 6,4 \cdot \text{vvm} + 1,83 \cdot \text{rpm} \cdot \text{vvm}$$

$$(\pm 0,41) (\pm 0,25) (\pm 0,1) (\pm 0,28) (\pm 0,59)$$

Pode ser visto que o único termo não significativo foi o termo quadrático da aeração.

Tabela 21. Efeitos da agitação e aeração no K_La .

Fatores	Efeito	Erro padrão
Média	23,46	0,41
Agitação	10,54	0,49
Agitação ²	4,58	0,2
Aeração	12,8	0,55
Agitação*Aeração	3,66	1,17

A tabela 22 apresenta o ANOVA que confere a não significação da falta de ajuste e a significação de dito modelo, entanto a figura 26 apresenta a superfície de resposta que representa o modelo quadrático. Pode-se ver que o incremento inicial da agitação, a baixas velocidades de aeração, diminui o K_La até uma condição em que atinge o mínimo a partir da qual o K_La aumenta bruscamente. Já a aerações maiores que 1,75 vvm o incremento da agitação sempre incrementa o K_La .

Tabela 22. Análise de variância para o ajuste do K_La a um modelo quadrático.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	2061,24	4	515,31	376,13
Resíduos	49,62	6	8,27	6,04
Falta de ajuste	46,88	4	11,72	8,55
Erro Puro	2,74	2	1,37	
Total	2110,86			

% variação explicada: 97,65

$F_{0,99, 4,6}=9,15$

Coefficiente de correlação: 0,99

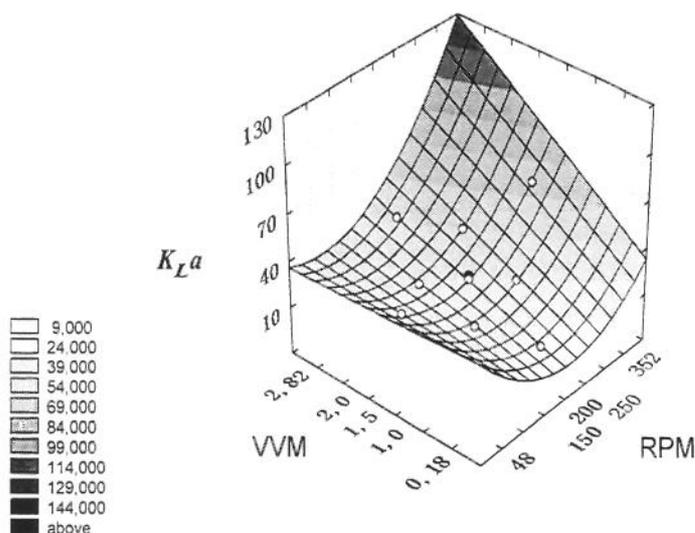


Figura 26. Superfície de resposta que representa o modelo quadrático ajustado ao $K_L a$.

O estudo do efeito da agitação mantendo constante a aeração revelou que o $K_L a$ aumenta com o incremento da agitação como mostra a figura 27. Nesta figura pode se ver a alta correlação entre a biomassa e a atividade discutida no item 4.2.3, e o efeito nulo do incremento do $K_L a$ no incremento de ambas respostas quando a agitação foi maior que 450 rpm. Isto ocorreu provavelmente pelo efeito negativo da elevada tensão de cisalhamento acima de 450 rpm, provocando uma acentuada queda da viabilidade, como será demonstrado posteriormente.

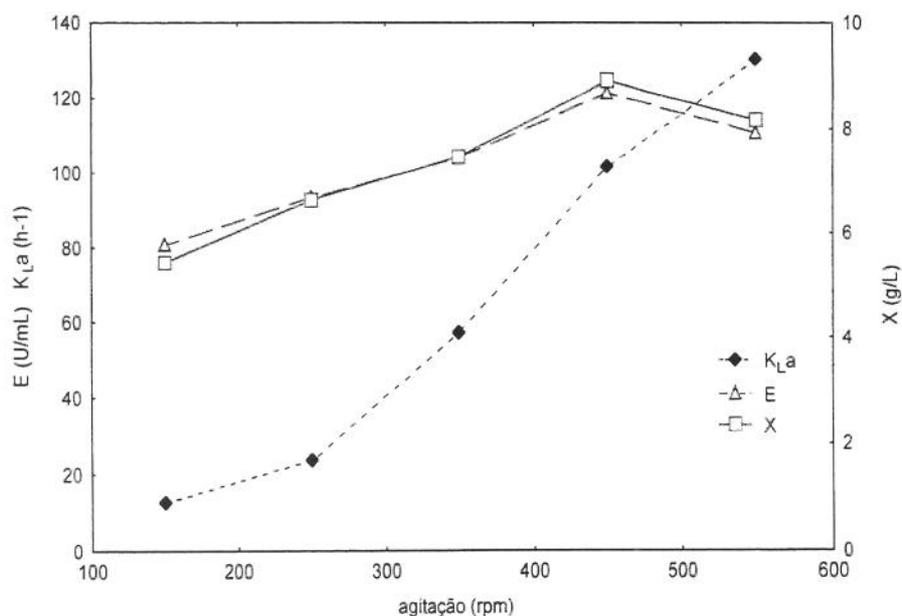


Figura 27. Efeito da agitação no K_{La} e sua relação com a atividade e biomassa.

4.4.2. Relação entre o tipo de agitador e o K_{La} : influencia sobre a atividade sacarolítica e a biomassa

A tabela 23 apresenta dados do K_{La} , biomassa e atividade sacarolítica para cada uma das fermentações realizadas. Considerando apenas as fermentações feitas com duas turbinas de Rushton e até 450 rpm de agitação, encontramos que existe uma alta correlação entre o K_{La} e a atividade enzimática ($r=0,72$, 95% de confiança) e também entre o mesmo e a biomassa ($r=0,83$, 95 % de confiança), como é mostrado na figura 28.

Pode-se ver que com um K_{La} de 6 h⁻¹ pode-se produzir 40 U/mL de enzima, já com 100 h⁻¹ atingiu-se 120 U/mL. Mas considerando o tratamento com hélice naval (16 h⁻¹, 126 U/mL) e “pitched blade up” (74 h⁻¹, 176 U/mL), a 450 rpm e 1,0 vvm, e comparando com o tratamento em que foram usadas turbinas de Rushton (100 h⁻¹, 120 U/mL) observamos que o tipo de agitador influencia não só a transferência de massa, através dos valores de K_{La} , mas também a produção da enzima. Pode-se ver que o uso de outros tipos de agitadores alterou o padrão da relação entre K_{La} , biomassa e atividade sacarolítica estabelecida para turbinas de

Rushton. Desta forma ficou evidenciada a importância do tipo de agitador nestas relações, e que estas não são função exclusiva do K_{La} , mas também de algum efeito do mecanismo de fluxo estabelecido com cada tipo de agitador. Esse efeito foi conferido também pelas diferentes respostas obtidas na viabilidade no final das fermentações discutido no item 4.2.4.

Tabela 23. K_{La} , biomassa e atividade enzimática obtidas para cada fermentação.

Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Agitador	K_{La} (h ⁻¹)	Atividade Enzimática (U/mL)	Biomassa (g/L)
50	0,5	Rushton	6,03	41,2	2,79
150	1,0	Rushton	12,47	80,8	5,43
200	0,5	Rushton	13,48	94,7	4,96
450	1,0	Helice naval	16,87	126,1	6,54
150	2,0	Rushton	20,65	77,8	5,65
250	1,0	Rushton	23,65	93,5	6,63
200	1,5	Rushton	25,59	92,1	6,61
50	1,5	Rushton	30,38	109,7	4,90
250	2,0	Rushton	38,99	100,8	7,18
350	1,0	Rushton	57,16	103,6	7,46
450	1,0	Pitched B. U.	74,53	176,2	8,63
450	1,0	Rushton	101,65	121,5	8,90
550	1,0	Rushton	130,12	110,8	8,16

4.4.3. Relação do K_{La} com o OD e o pH

O suprimento de oxigênio durante o processo de fermentação pode definir o tipo de via metabólica usada pela levedura. Algumas observações em relação a isto podem ser vistas a partir da análise da figura 29 a 35 e da tabela 23.

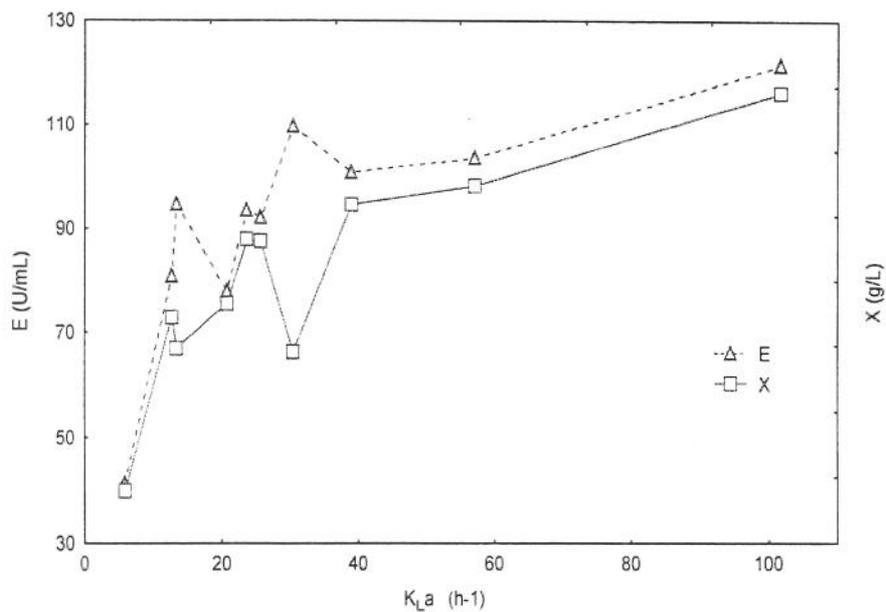


Figura 28. Atividade enzimática (E) e biomassa (X) segundo o K_{La} usando duas turbinas de Rushton.

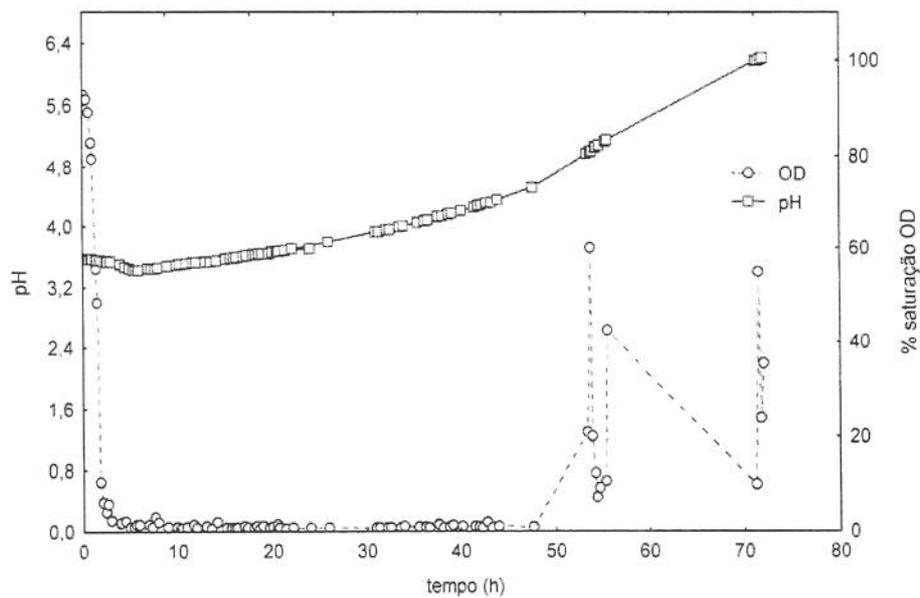


Figura 29. pH e OD da fermentação conduzida a 150 rpm e 1 vvm usando duas turbinas de Rushton, ao que correspondeu um K_{La} de 12,74.

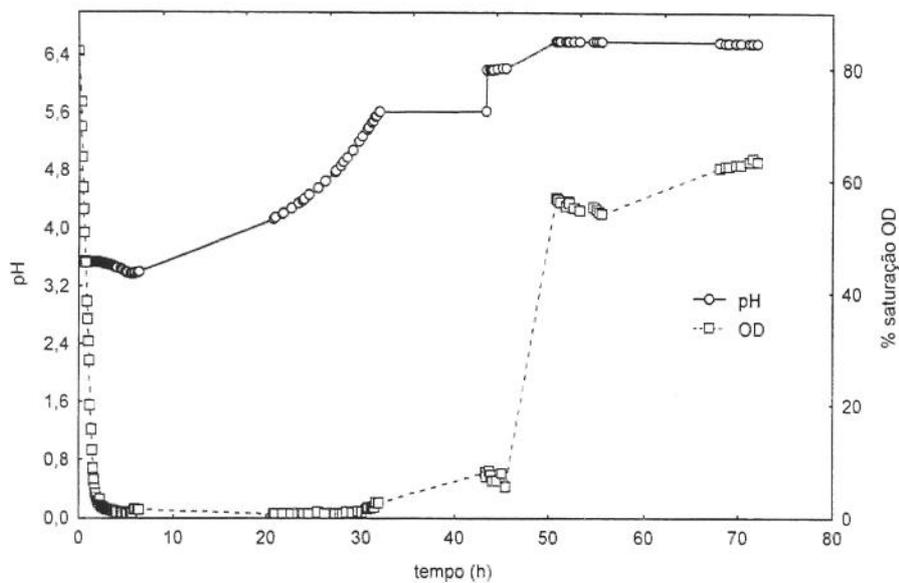


Figura 30. pH e OD da fermentação conduzida a 250 rpm e 1 vvm usando duas turbinas de Rushton, ao que correspondeu um K_{La} de 23,65.

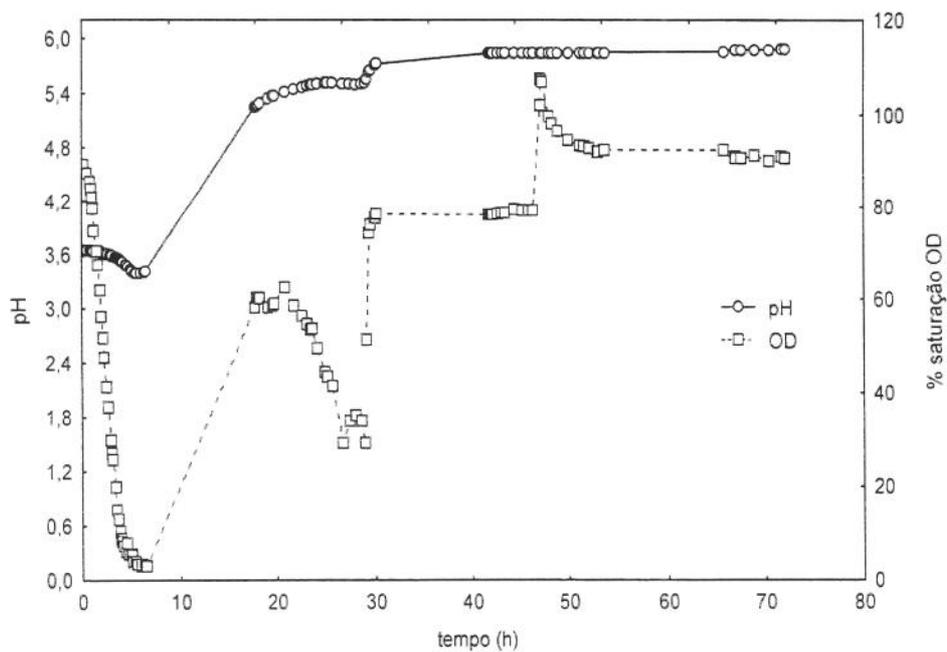


Figura 31. pH e OD da fermentação conduzida a 350 rpm e 1 vvm usando duas turbinas de Rushton, ao que correspondeu um K_{La} de 57,16.

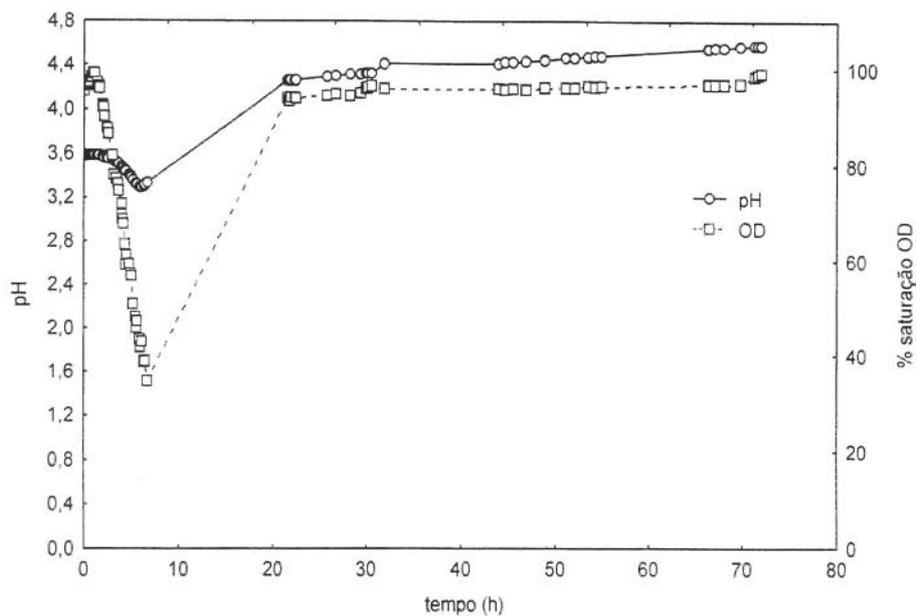


Figura 32. pH e OD da fermentação conduzida a 450 rpm e 1 vvm usando duas turbinas de Rushton, ao que correspondeu um K_La de 101,65.

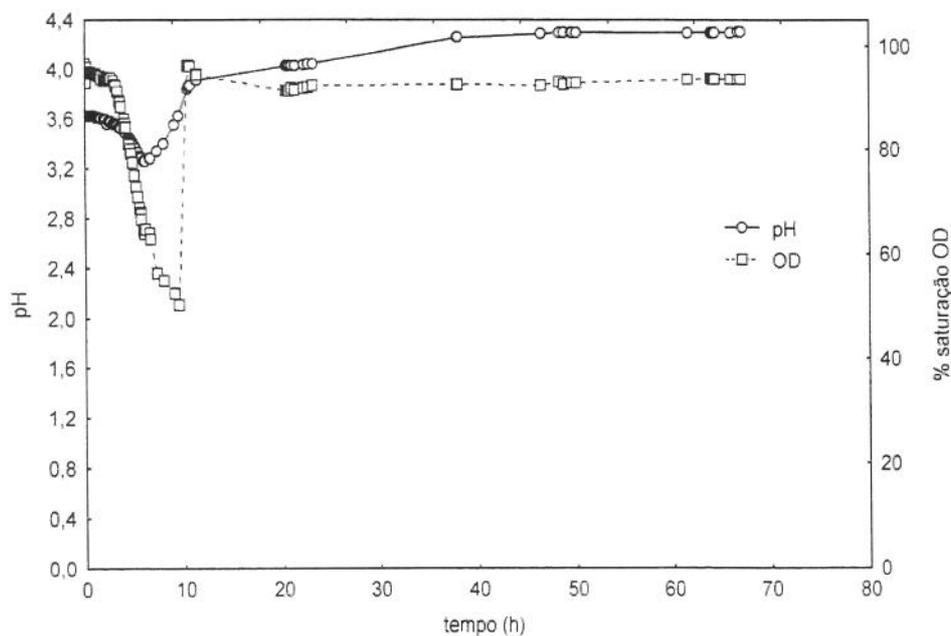


Figura 33. pH e OD da fermentação conduzida a 550 rpm e 1 vvm usando duas turbinas de Rushton, ao que correspondeu um K_La de 130,12.

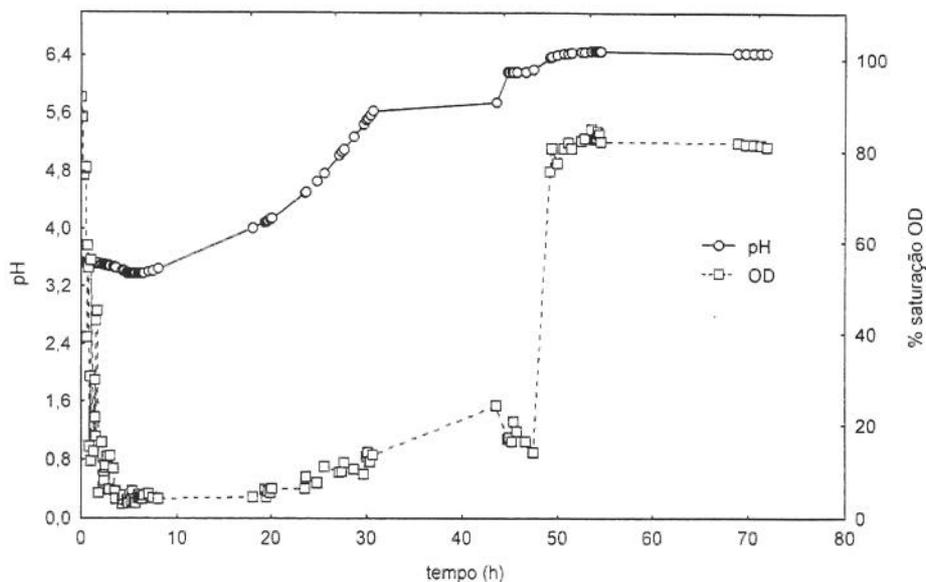


Figura 34. pH e OD da fermentação conduzida a 450 rpm e 1 vvm usando duas hélices navais, ao que correspondeu um K_La de 16,86.

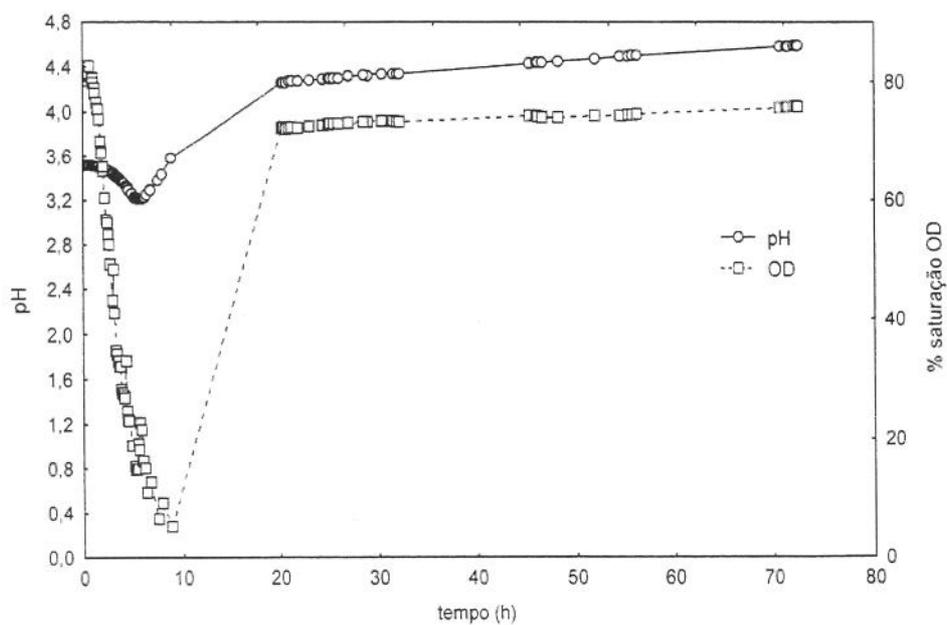


Figura 35. pH e OD da fermentação conduzida a 150 rpm e 1 vvm usando um agitador tipo "pitched blade up", ao que correspondeu um K_La de 74,53.

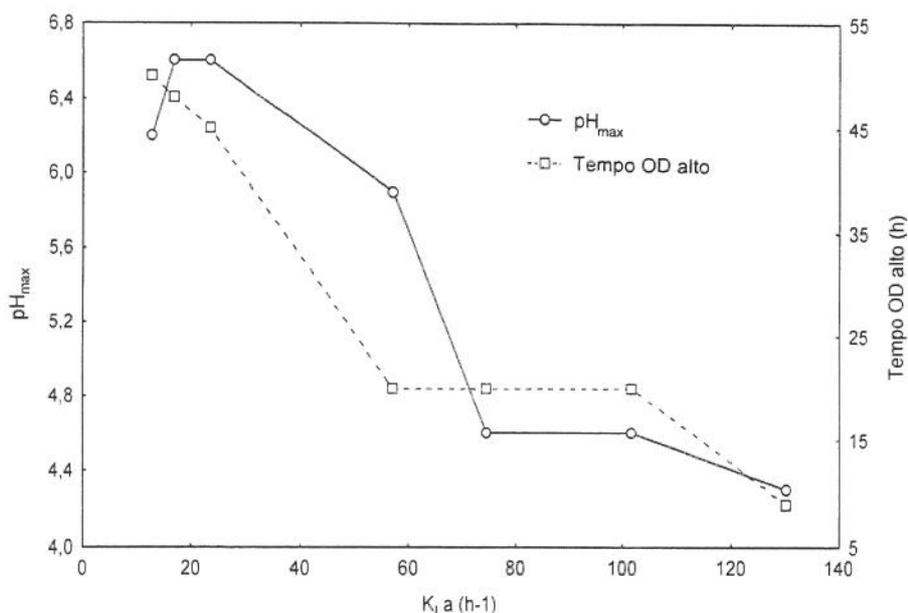


Figura 36. Relação entre o K_{La} e o pH máximo atingido e o tempo em que o OD atinge leituras altas.

Seguindo a seqüência desde a figura 29 até a figura 35 pode-se ver a evolução dos perfis de pH e OD que claramente mantêm uma relação com a evolução do K_{La} correspondente a cada tratamento.

Como já foi discutido no item 4.3.2, nesta seqüência de figuras se constata que o momento de pH máximo coincide com uma troca brusca nas leituras de OD, onde as mesmas se tornam altas comparadas com as baixas leituras predominantes após as duas primeiras horas de fermentação. Em vista disso foram tomados dados dos valores máximos de pH e do tempo no qual as leituras de OD aumentaram bruscamente. Estes valores são apresentados em função do K_{La} na figura 36.

Pode-se ver que quando o K_{La} é maior que 20, o incremento do mesmo traz como conseqüência que o pH máximo atingido seja menor, como conferido pela alta correlação entre eles ($r=-0,93$, 95% de confiança). Paralelamente o incremento do K_{La} também diminuiu o tempo no qual o OD atingiu leituras altas pois a correlação também foi significativa ($r=-0,94$, 95% de confiança). Isto leva a

considerar que o desempenho do pH e do OD foram afetados principalmente pelo K_La mais do que pela agitação, aeração e tipo de agitador. Por sua vez, isto revela a influência que tem o K_La sobre o metabolismo da levedura. Observou-se, também, a existência de uma relação entre o pH máximo atingido no final da fermentação e o tempo em que o OD atingiu leituras altas ($r=0.88$, 95% de confiança). Isto pode ser interpretado admitindo que as vias metabólicas usadas pelo microrganismo foram de dois tipos: a primeira demandou muito oxigênio permitindo a variação rápida do pH, enquanto que a segunda não demandou oxigênio e portanto não modificou significativamente o pH. Esse comportamento foi uma consequência direta da disponibilidade do oxigênio dissolvido, representada pelo K_La , permitindo o uso de determinadas vias metabólicas, porém não parece estar relacionado com o tipo de substrato disponível para crescimento, como foi analisado no item 4.3.

Podemos ver que inclusive após as 60 horas de fermentação, além da baixa atividade metabólica refletida pelo baixo consumo de oxigênio o microrganismo continua produzindo a enzima. A subida do pH e do OD coincidem provavelmente com uma mudança da maquinaria metabólica do microrganismo, mas esta mudança é promovida pelo K_La .

4.5 Morfologia

O dimorfismo é uma característica de muitos microrganismos e está presente em vários processos industriais. Neste sentido Justen et al (1998), referem o efeito do tipo de agitador e da velocidade de agitação na morfologia, crescimento e formação de vacúolos do *Penicillium chrysogenum* e na produtividade de penicilina, tendo-se que a morfologia esta relacionada a produtividade e ao crescimento. Eles observaram que maiores velocidades de agitação corresponderam a maiores velocidades específicas de produção de penicilina. Entanto que a velocidade de crescimento foi maior quando a velocidade de agitação foi também maior, e explicam que a maior fragmentação do microrganismo promoveu o incremento dos extremos para o crescimento.

Amanullah et al (1999) reportaram câmbios significativos da morfologia micelar causados pela variação das condições de agitação, mas observaram que a morfologia micelar não afetou diretamente a produção de proteína por *Aspergillus oryzae*.

Também, o soro foi um indutor efetivo da formação de micélio quando presente no meio de crescimento de *Yarrowia lipolytica*, segundo Kim et al (2000). Eles explicam que o estresse osmótico e oxidativo inibem a formação de micélio induzida pelo soro.

No presente trabalho foram observadas evidencias de dimorfismo (Figura 37 a 40). McCarthy et al (1998) estabeleceram para *Kluyveromyces marxianus* uma escala das formas na qual este microorganismo pode-se apresentar. Eles descreveram seis tipos de formas: levedura, levedura alongada, levedura dupla, filamento, duplo filamento e micelar.

Uma análise simples das figuras 37 a 40 podemos ver que segundo este autor no processo de fermentação para produção de inulinase podemos encontrar

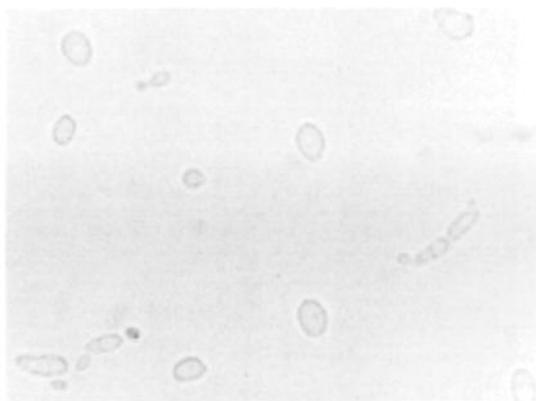


Figura 37. *Kluyveromyces marxianus*, 26h de fermentação a 450 rpm e 1,0 vvm usando hélice naval. x1300.

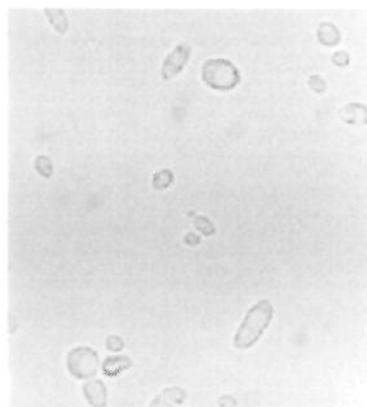


Figura 38. *Kluyveromyces marxianus*, 72 h de fermentação a 450 rpm e 1,0 vvm usando hélice naval. x1300.

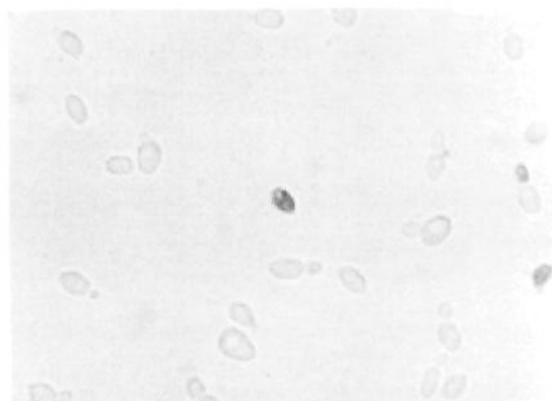


Figura 39. *Kluyveromyces marxianus*, 6h de fermentação a 450 rpm e 1,0 vvm usando "pitched blade up". x1300.

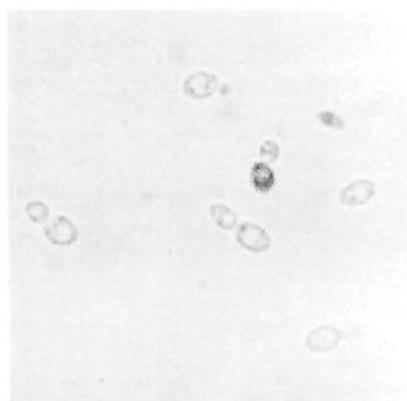


Figura 40. *Kluyveromyces marxianus*, 72 h de fermentação a 450 rpm e 1,0 vvm usando "pitched blade up". x1300.

este microrganismo como uma levedura, levedura alongada e como uma dupla levedura.

Recentemente O'Shea e Walsh (2000) estabeleceram uma nova escala na qual incorporaram a dupla levedura alongada, uma forma intermediária entre a dupla levedura e o filamento segundo a escala de McCarthy et al (1998). Esta forma está claramente presente na figura 37. O'Shea e Walsh (2000) afirmaram que a morfologia é primariamente controlada pela velocidade específica de crescimento a mesma que é controlada por câmbios no ambiente de crescimento. Os autores explicam que quando o microrganismo é cultivado em batelada com excesso de oxigênio a velocidade específica pode atingir o máximo e que a morfologia predominante é como de uma levedura verdadeira. No entanto se o microrganismo é cultivado em quimostato, no qual a velocidade específica de crescimento é controlada, a morfologia será a de forma pseudomicelar.

Aparentemente não há diferença na morfologia do microrganismo quando uso-se hélice naval e "pitched blade up" nas fermentações, como podemos observar ao comparar as figuras 37 e 38 com a 39 e 40. Mas isto deve ser conferido usando a análise de imagens descrita por O'Shea e Walsh (2000). Também parece haver uma tendência a formar vacúolos maiores quando o tempo de fermentação é maior, se comparamos as figura 37 e 39 contra a 38 e 40.

O'Shea e Walsh (2000) estabeleceram relações entre a velocidade específica de crescimento (μ) e a morfologia. Neste sentido afirmam que quando μ é ótima ($\mu = \mu_{max}$) a morfologia dominante é levedura, quando μ é subótima ($0,1 < \mu < 0,45$) a forma filamentosa e micelar é dominante. Mas se μ é muito baixa ($\mu < 0,1$) a forma dominante é levedura. Observaram também que as leveduras dominantes em condições de $\mu < 0,1$ são menores e mais esféricas que aquelas dominantes em condições ideais. No presente trabalho o tempo no qual μ foi subótima foi menor que 5 h como pode-se ver na figura 20, o resto do tempo μ foi muito baixa. Isto indicaria que a morfologia predominante foi levedura.

Nas figuras 38 e 40 podemos observar que existem células em pleno processo de brotamento, o que confirma que o crescimento continua inclusive nas 72 horas de fermentação.

5. Conclusões

Os resultados do presente trabalho permitem tirar as seguintes conclusões:

- A influencia da agitação e da aeração sobre a produção de inulinase e de biomassa depende dos níveis das mesmas. Para baixos níveis de agitação e aeração tanto a agitação como a aeração foram importantes, mas quando os níveis da agitação e aeração foram altos foi mais importante a agitação.
- Velocidades de agitação maiores que 450 rpm reduzem a produção de inulinase com a diminuição da viabilidade celular.
- A viabilidade celular depende do tipo de agitador e da velocidade de agitação, sendo que o tipo hélice naval teve melhor desempenho, e que o tipo Rushton teve o pior desempenho.
- O pH não precisa ser controlado durante a fermentação para atingir alta atividade.
- Existe uma relação muito significativa entre k_{La} , e atividade e biomassa, quando se trabalha com um tipo de agitador. Também o tipo de agitador afeta estas relações, mas este efeito não está relacionado com seu desempenho na transferência de oxigênio.
- O desempenho do pH e OD durante a fermentação, foi determinado pelo k_{La} , e foi independente do tipo de agitador.
- O consumo total do substrato é atingido nas primeiras seis horas de fermentação e é independente da agitação, da aeração e do tipo de agitador.
- A produção de inulinase começa depois do consumo total do substrato, mostrando ocorrer uma inibição pelo substrato.
- A produção de inulinase esteve parcialmente associada à produção de biomassa.
- A velocidade específica de crescimento foi influenciada positivamente pela agitação.

- A produção de inulinase foi otimizada nas seguintes condições: 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo "pitched blade up", 3,5 de pH inicial e 30°C de temperatura. Obteve-se, também, um Y_p/s de 12650 UI/g, um Y_x/s de 0,57 (g/g), um Y_p/x de 22189,6 UI/g e uma produtividade de 2431,4 UI/L*h.

6. Sugestões para trabalhos futuros

- Otimizar a temperatura da fermentação.
- Utilizar meios complexos otimizados mais baratos nas condições ótimas de produção.
- Realizar medidas das taxas de consumo de oxigênio após as leituras de OD se estabilizar em valores altos e estabelecer relações com o metabolismo.
- Fazer um estudo cinético de outras substâncias que possam agir como substrato presentes na peptona e extrato de levedura.
- Fazer um estudo da relação entre a produção da inulinase e a morfologia usando a metodologia usado por O'Shea e Walsh(2000).

7. Referencias Bibliográficas

- AMANULLAH A.; BLAIR R.; NIENOW A.W.; THOMAS C.R. Effects of agitation intensity on mycelal morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62(4), p. 434-446, 1999.
- AMANULLAH A.; TUTTIETT B.; NIENOW A.W. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57(2), p.198-210, 1998.
- ARTUR FELSE P.; PANDA T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Tichoderma harzianum* in batch mode, **Process Biochemistry**, v. 34(6-7), p. 563-566, 1999.
- AZHARI R.; SZLAK A.M.; ILAN E.; SIDEMAN S.; LOTANN. Purification and characterization of *endo*- and *exo*-Inulinase, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 11, p. 105-117, 1989.
- BAJPAI P.; MARGARITIS A. Optimization studies for production of high fructose syrup from jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*, **Process Biochemistry**, v. 21(1), p. 16-18, 1986.
- BELEM M. F.; LEE B. H. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Process Biochemistry**, v. 34(5), p.501-509, 1999.
- CHEN J.-Y.; WEN C.-M.;CHEN T.-L. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*, **Biotechnology and Bioengineering**, v.62(3), p. 311-316, 1999.

- CONTIERO J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus***, Campinas, 1992, 276 p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CONTIERO J.; MAUGERI F. Continuous production of extracellular invertase by *Kluyveromyces bulgaricus*. In: Proceeding of Euro food Chemistry, Progress in Food Fermentation, VII, 1993, Valencia, [s.n.t.].
- COSTA F.A.A. **Contribuição ao estudo da produção de invertase extracelular por leveduras**, Campinas, 1986, 106 p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CRUZ-GUERRERO A.; GARCIA-PEÑA I.; BARZANA E.; GARCIA-GARIBAY M.; GOMEZ-RUIZ L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80(2), 159-163, 1995.
- ESPINOZA P.; BÁRZANA E.; GARCÍA-GARIBAY M.; GOMEZ-RUIZ L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase, **Biotechnology Letters**, v.14(11), p. 1053-1058, 1992.
- GADEN E.L.Jr Fermentation process kinetics, **Journal Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 1(4), p. 413-429, 1959. Article reprinted in: **Biotechnology and Bioengineering**, v.67(6), p. 629-635, 2000.

- GROOTWASSINK J.W.D.; FLEMING S.E. Non-specific β -fructofuranosidase(inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties, **Enzyme Microb. Technol.**, v.2(January), 1980.
- GUIRAUD J.P.; DAURELLES J.; GALZY P. Alcohol production from jerusalem artichoke using yeast with inulinase activity, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1461-1465, 1981.
- GUPTA A.K.; SINGH D.P.; KAUR N.; SINGH R. Production, purification and immobilisation of inulina, **Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 59, p.377-385, 1994.
- HENSING M.; VROUWENVELDER H.; HELLINGA C.; BAARTMANS R.; van DIJKEN H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 42, p. 516-521, 1994.
- JONG W.Y.; YONG J.C.; CHII H.S.; SEUNG K.S. Microbial production on inulo-oligosaccharides by an endoinulinase from *Pseudomonas sp.* expressed in *Escherichia coli.*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87(3), p.291-295, 1999.
- JUSTEN P.; PAUL G.C.; NIENOW A.W.; THOMAS C.R. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59(6), p.762-775, 1998.
- KALIL S.; SUZAN R.; MAUGERI-FILHO F.; RODRIGUES M.I. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, Congresso de Processos do Mercosul, II, 1999, Florianópolis, **Volume I: trabalhos apresentados**, Florianópolis:EMPROMER, 1999, P. 352-353.

KLAUSHOFER H. On the biotechnology of plants with fructosan content, **Starch**, v. 38(3), p. 91-94, 1986.

KIM J.; CHEON S.A.; PARK S.; SONG Y.; KIM J.Y. Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 190(1), p. 9-12, 2000.

KUSHI R.T.; HOJO O.; TREVISAN H.C.; MONTI R.; CARVALHO A.; CONTIERO J. Estudo da inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Simpósio Nacional de Fermentações, XI, 1996, São Carlos, [s.n.t.].

MANZONI M.; CAVAZZONI V. Extracellular inulinase from four yeasts, **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 21, p. 271-274, 1988.

MANZONI M.; CAVAZZONI V. Hydrolysis of Topinambur(jerusalem artichoke) fructanos by extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, **J. Chem. Techn. Biotechnol.** v..54, p.311-315, 1992.

McCARTHY A.A.; O'SHEA D.G.; MURRAY N.T.; WALSH A.P.; FOLEY G. Effect of cell morphology on dead-end filtration of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* NRRLy2415, **Biotechnol. Prog.**, v. 14, p. 279-285, 1998.

MILNER J. A.; MARTIN D. J.; SMITH A. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18(7), p. 507-512, 1996.

- O'SHEA D.G.; WALSH P.K. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveormyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 316-322, 2000.
- ONGEN-BAYSAL G.; SUKAN S.S. Production of inulinase by mixed of *Asperguillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*, **Biotechnoloy Letters**, v. 18(12), p. 1431-1434, 1996.
- PAREKH S.; MARGARITIS A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 446-448, 1985.
- PARK J.P.; BAE J.T. YOU D.J.; KIM B.W.; YUN J.W. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endo inulinase from *Xanthomonas* sp., **Biotechnology Letters** v. 21(12), p. 1043-1046, 1999.
- PEJIN D.; JAKOVLJEVIC J.; RAZMOVSKI R.; BERENJI J. Some possibilities for the cultivation and processing of jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus*), **J. Ferment. Bioeng.**, v. 75(1), p. 79-81, 1993.
- PESSOA A.; VITOLO M.; HUSTEDT H. Use of K_{La} as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57(8), p. 669-709, 1996.
- PESSOA J.; VITOLO M. Influência da composição do meio de cultivo na produção de inulinase por *Candida kefyi*, [s.n.t.]
- POORNA V.; KULKARNI P.R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional desing, **Bioresource Technology**, v. 54(3), p. 315-320, 1995.

- ROUWENHORST R.J.; VISSER L.E.;VAN DER BAAN A.A.; SCHEFFERS W.A.;VAN DIJKEN J.P. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, **Applied and environmental microbiology**, v.54(5), p. 1131-1137, 1988.
- ROUWENHORST R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL J.; SCHEFFERS A. W.; VAN DIJKEN J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, **Applied and environmental microbiology**, v.56(11)m, p. 3337-3345, 1990.
- SANTOS A. **Síntese de oligosacáridos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus***, Campinas, 1998. 86p. Tese Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SELVAKUMAR P.; ASHOK PANDEY. Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture, **Bioresource Technology**, v 69(2), p. 123-127, 1999.
- SERRANO-CARREÓN L.; CORONA R. M.; SANCHEZ E GALINDO E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochemistry**, v.33(2), p. 133-146, 1998.
- SOBOTKA L.; BRATOVA M.; SLEMROVA M.; MANAK J.; VIZD'A J.; ZADAK Z. Inulin as the soluble fiber in liquid enteral nutrition, **Nutrition**, v. 13(1), p. vi, 1997.

VANDAMME E.J.; DERYCKED.G. Microbial inulinases: Fermentation proces, properties, and applications, **Advances in applied microbiology**, v. 29, p.139-176, 1983.

WANG D.I.C.; COONEY C.L.; DEMAINE A. L.; DUNNIL P.; HUMPHREY A. E. ; LILLY M.D. **Fermentation and enzyme technology**, New York. Chichester, Toronto. Brisbane: John Wiley & Sons, 1979.

WEI W.; ZHENG Z.; LIU Y.;ZHU X. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces sp.* Y-85 and scaling-up fermentation, **Journal of fermentation and bioengineering**, v.86(4), p. 395-399, 1998.

Apêndice J

Curvas da cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de atividade enzimática

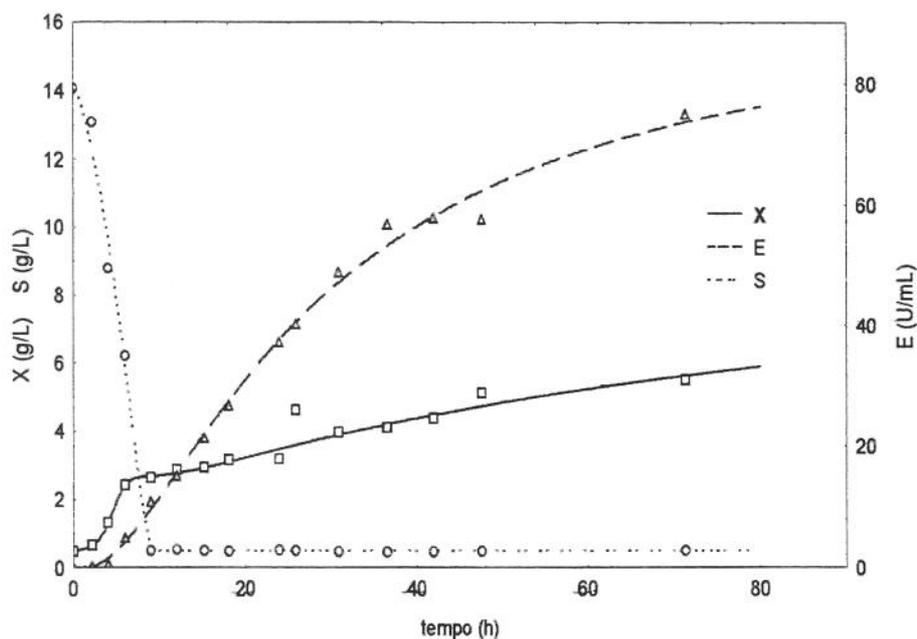


Figura I 1. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 150 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

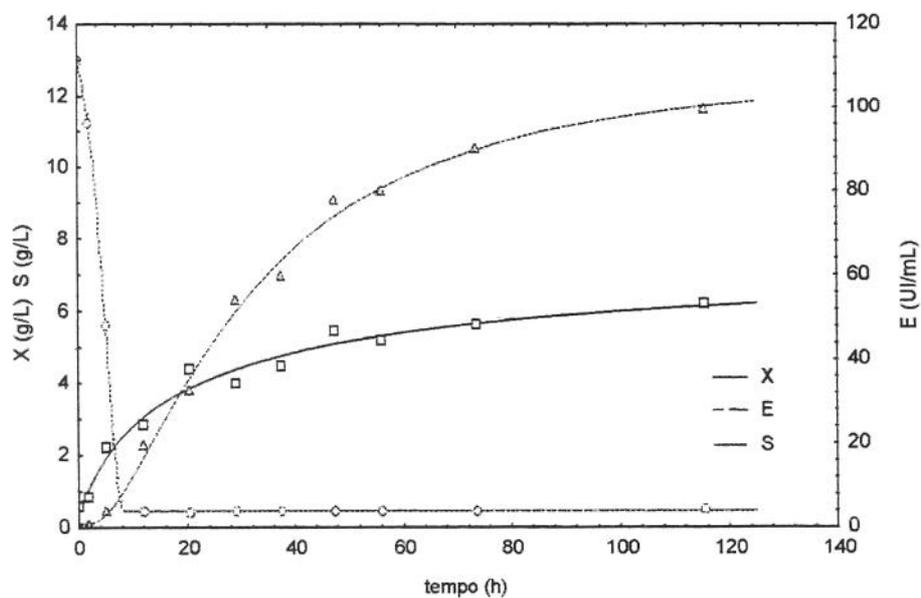


Figura I 2. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 150 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores (segunda replicata).

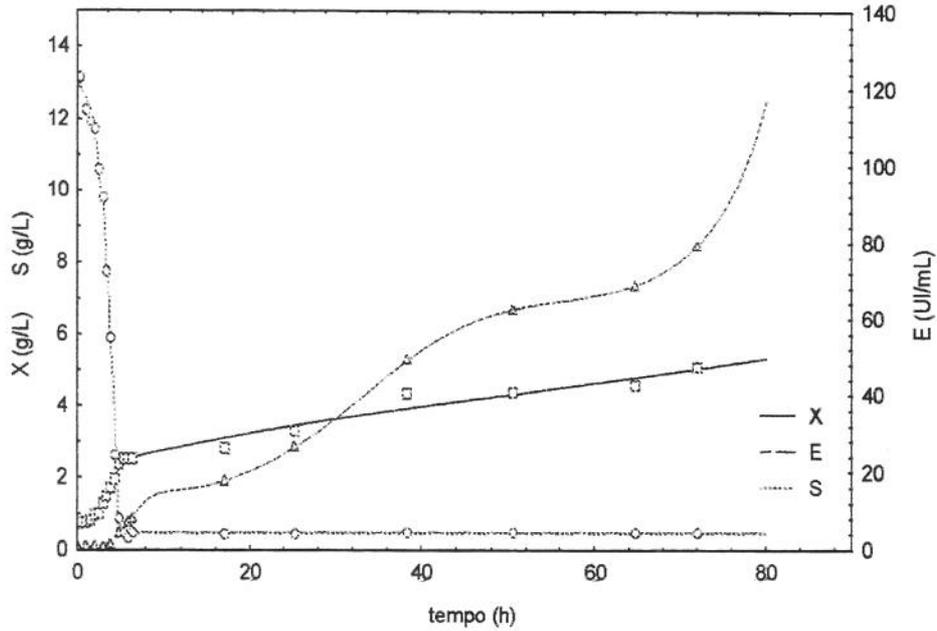


Figura 13. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 150 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores (terceira replicata).

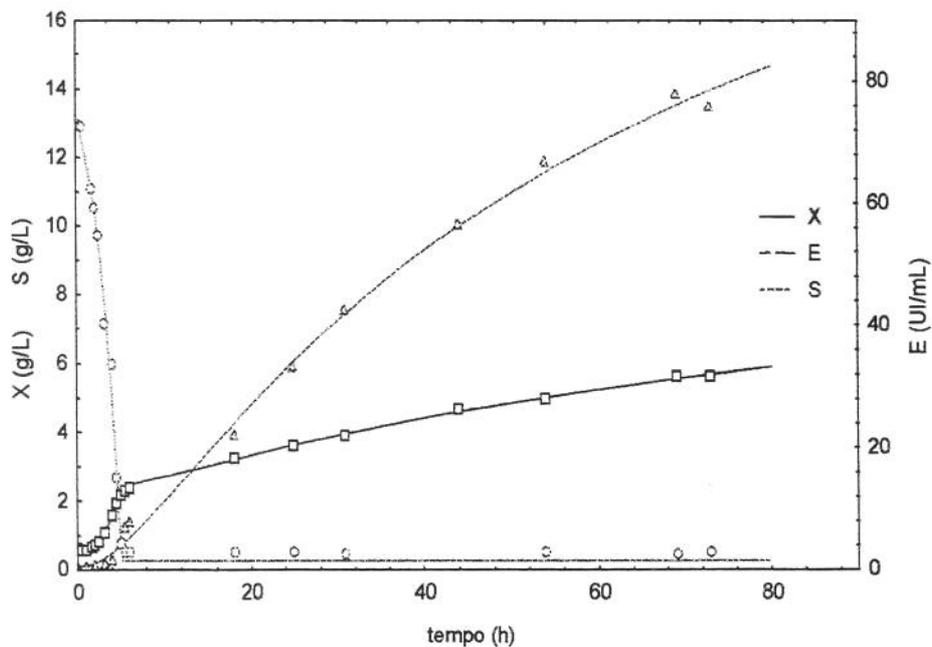


Figura 14. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 150 rpm e 2,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

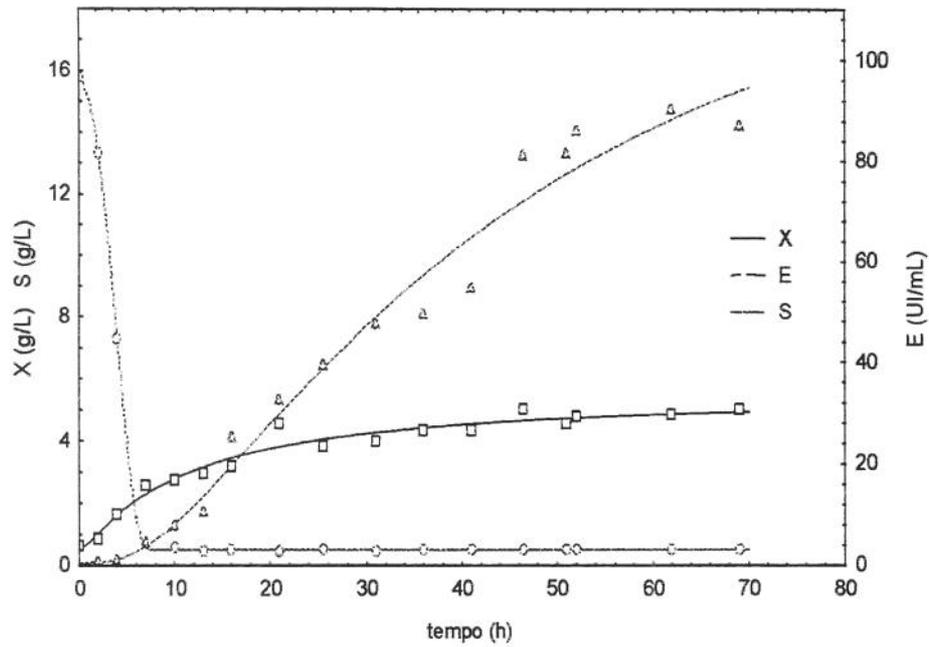


Figura 15. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 200 rpm e 0,5 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

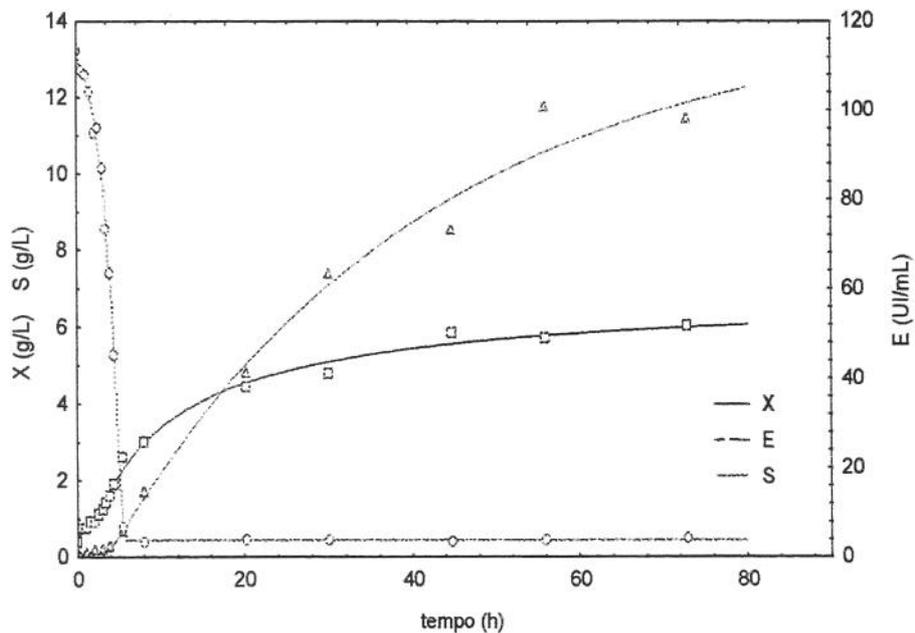


Figura 16. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 200 rpm e 1,5 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores (primeira replicata).

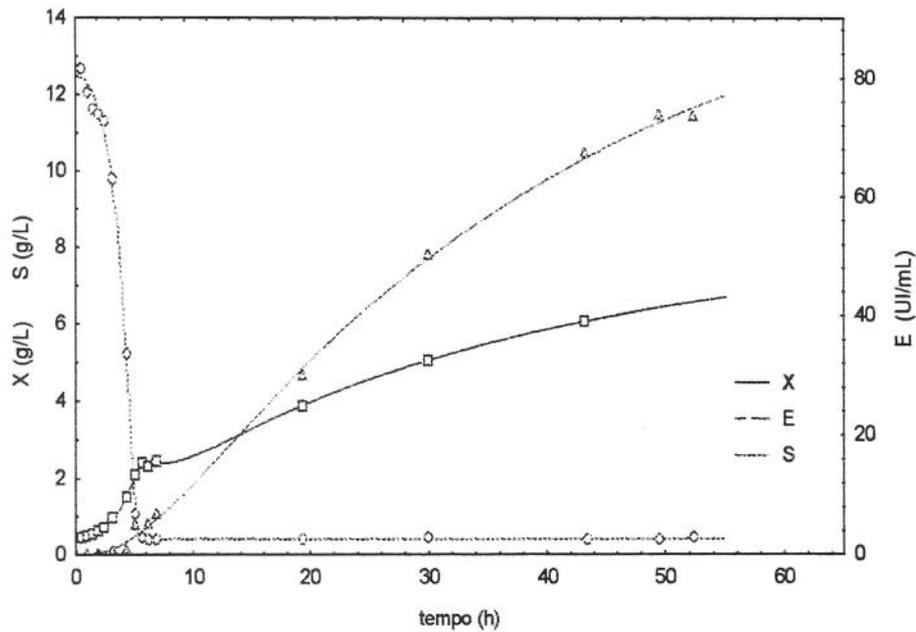


Figura I 7. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 200 rpm e 1,5 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores (segunda replicata).

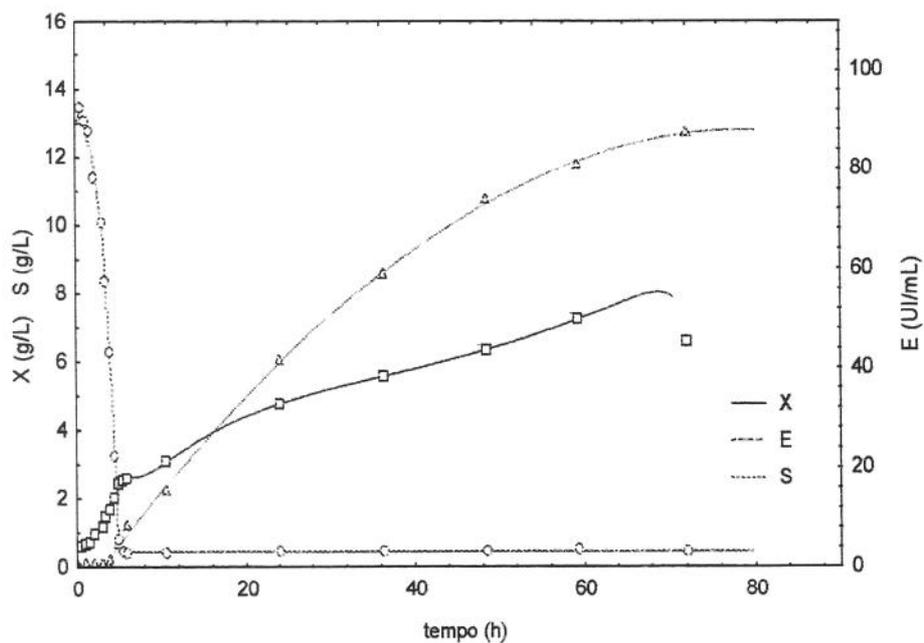


Figura I 8. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 200 rpm e 1,5 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores (terceira replicata).

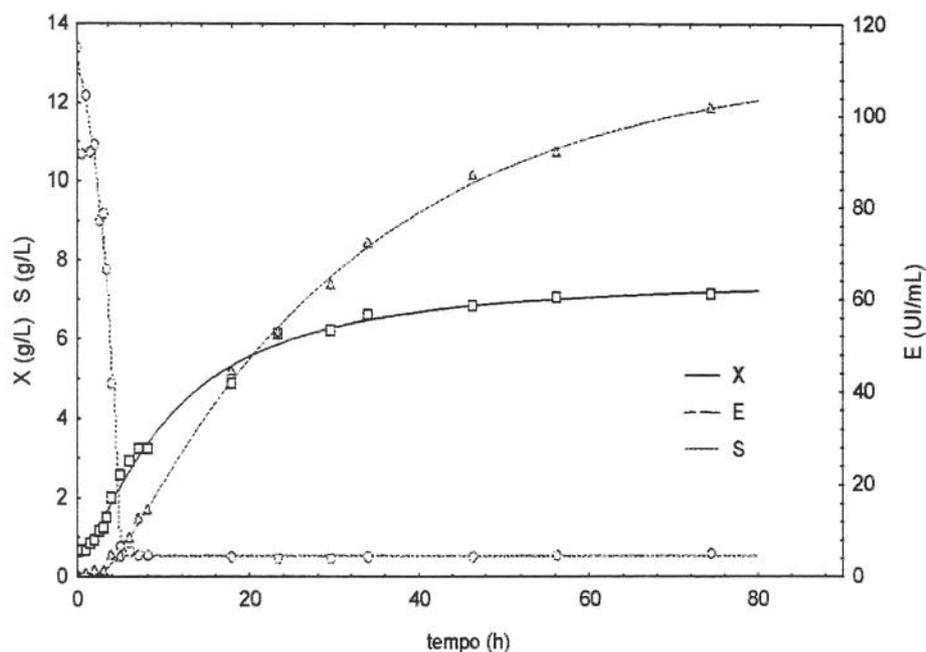


Figura I 9. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 250 rpm e 2,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

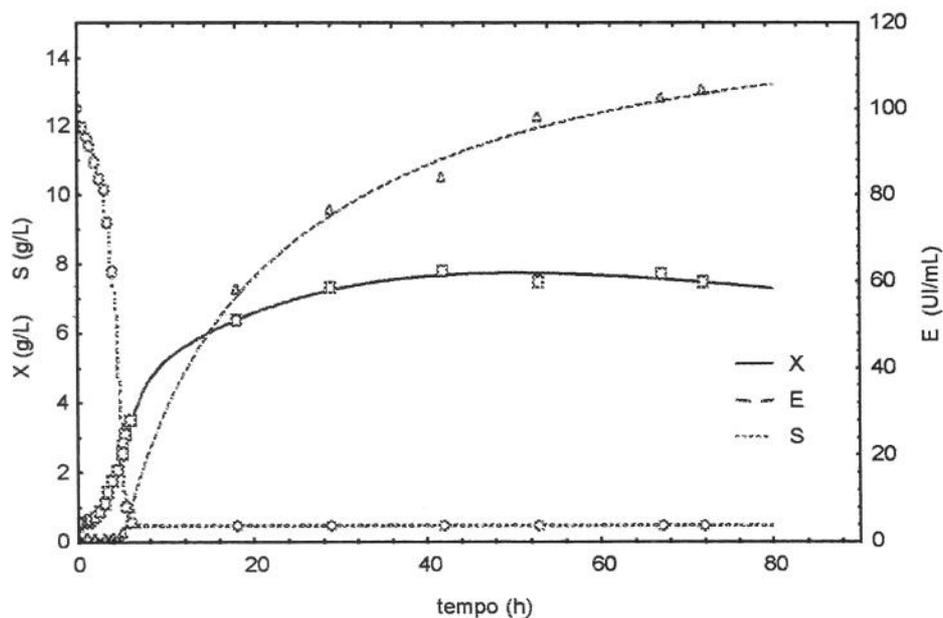


Figura I 10. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 350 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

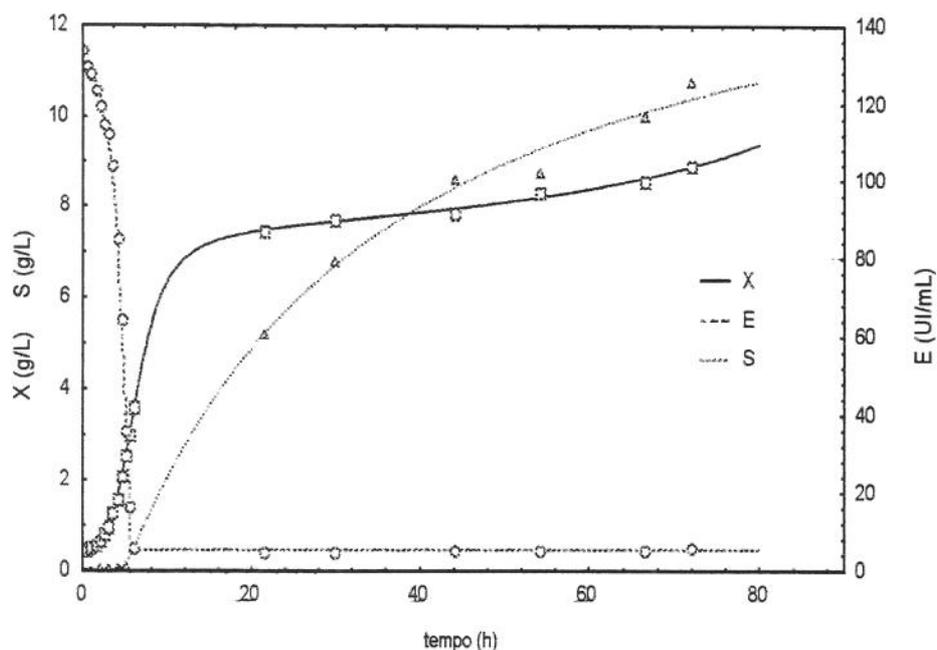


Figura I 11. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitadores.

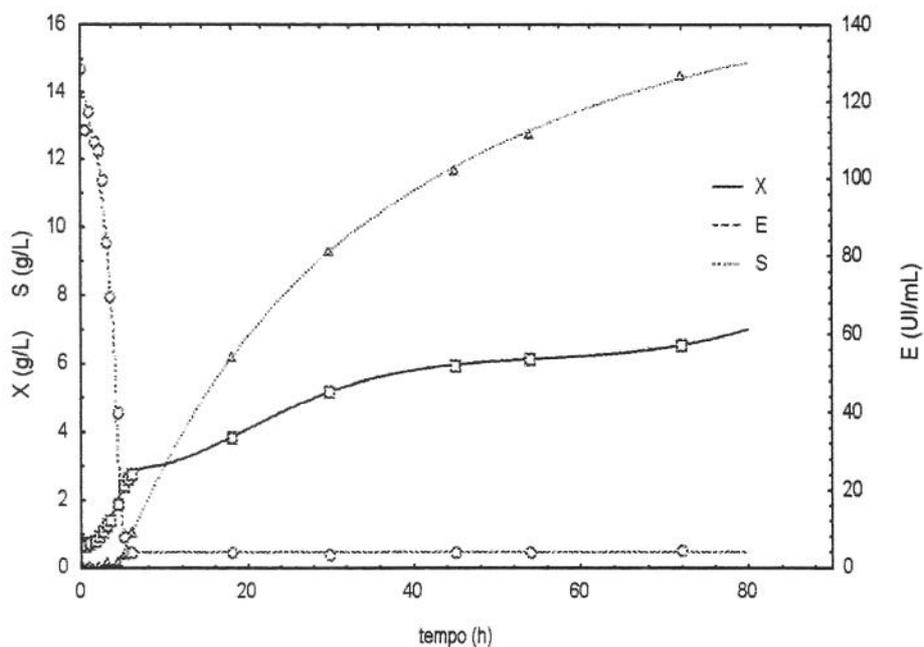


Figura I 12. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando duas hélices navais como agitadores.

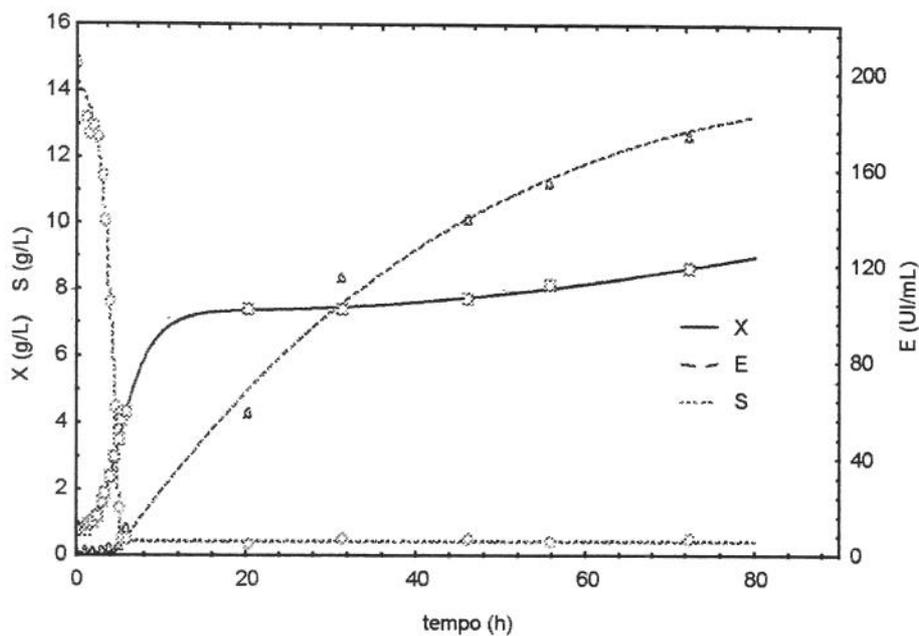


Figura I 13. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 450 rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo "pitched blade up".

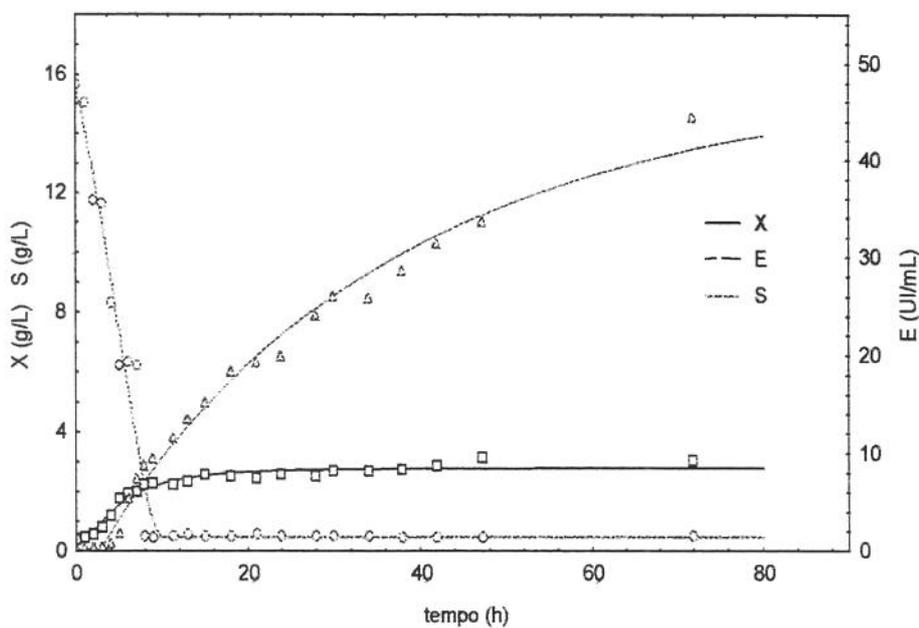


Figura I 14. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 50 rpm e 0,5 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitador.

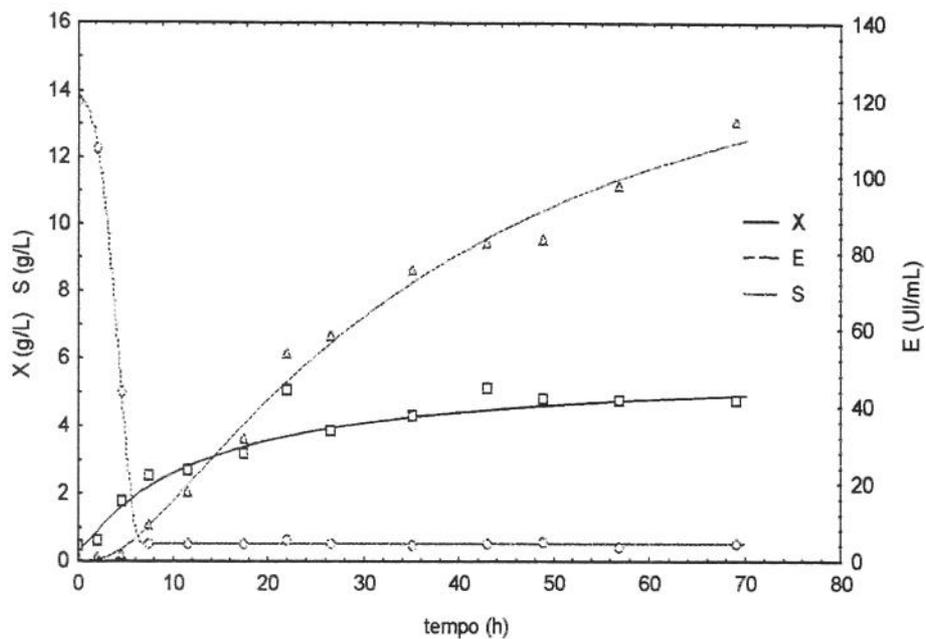


Figura I 15. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 50 rpm e 1,5 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitador.

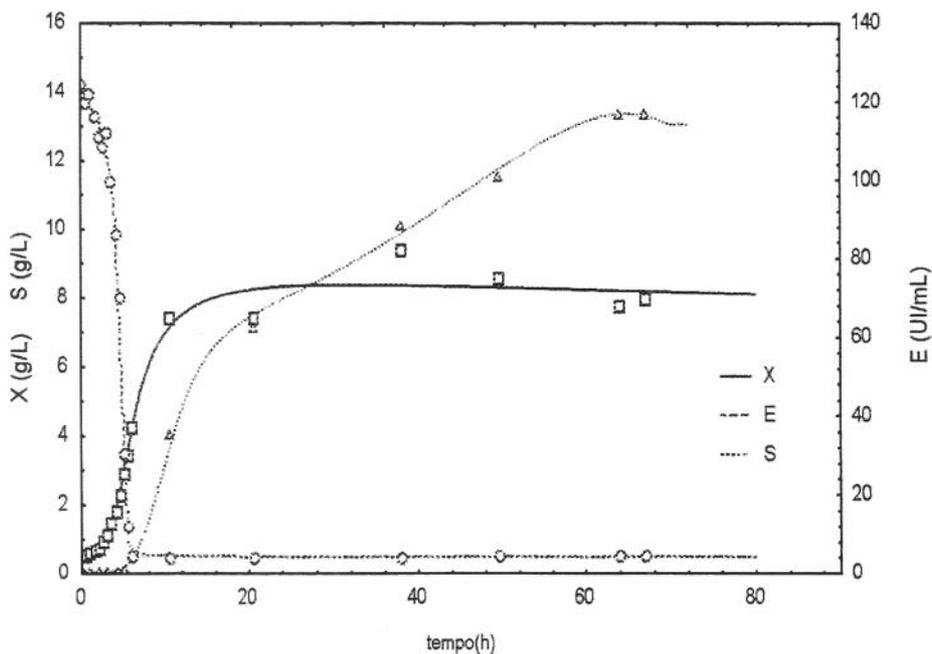


Figura I 16. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 550 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitador.

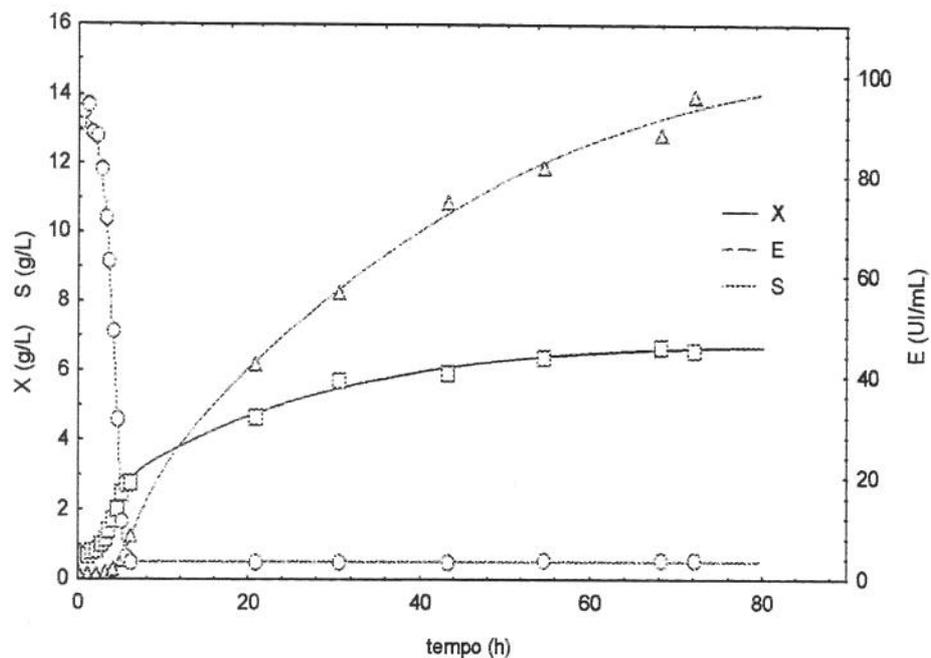


Figura 17. Cinética de crescimento (X), consumo de substrato (S) e produção de atividade sacarolítica (E) na fermentação conduzida a 250 rpm e 1,0 vvm usando duas turbinas de Rushton como agitador.