

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se
inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluyveromyces marxianus*
ATCC 16045 E NRRL Y-7571**

PARECER

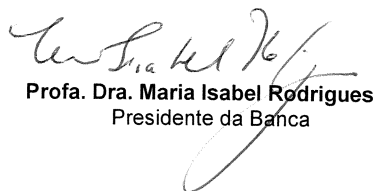
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Fernanda Vaz Alves Risso**, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de novembro de 2004.

Campinas, 30 de novembro de 2004.

Fernanda Vaz Alves Risso

Engenheira de Alimentos

Orientadora: **Prof^a. Dra. Maria Isabel Rodrigues**


Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Presidente da Banca

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

Campinas

2004

INIDADE	SP
1ª CHAMADA	Unicamp
	R497s
EX	
OMBO BC/	61545
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	04-2-05
CPD	

ibid: 339021

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

R497s Risso, Fernanda Vaz Alves
 Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 E NRRL Y-7571 / Fernanda Vaz Alves Risso. –Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Frutooligossacarídeos. 2.Planejamento experimental. 3.Meio orgânico. 4.Síntese. I.Rodrigues, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

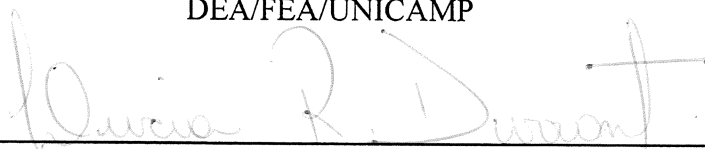
CARS-FEA

Banca Examinadora



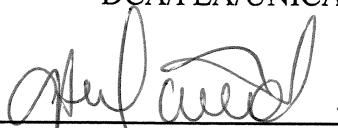
Prof^ª. Dra. Maria Isabel Rodrigues (orientadora)

DEA/FEA/UNICAMP



Prof^ª. Dra. Lúcia Durrant (membro titular)

DCA/FEA/UNICAMP



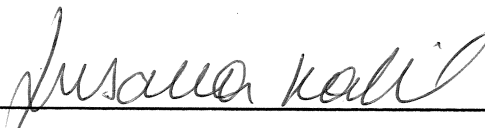
Prof^ª. Dra. Gabriela Alves Macedo (membro titular)

DCA/FEA/UNICAMP



Prof^ª. Dra. Eliana Setsuko Kamimura (membro titular)

ZEA/FZEA/USP



Prof^ª. Dra. Susana Juliano Kalil (membro titular)

DQM/FURG

Prof. Dr. Antonio Francisco Iemma (membro suplente)

ESALQ/USP

Prof. Dr. Francisco Maugeri (membro suplente)

DEA/FEA/UNICAMP

Dedicatória

Dedico ao meu esposo Valmir, grande amor da minha vida, pelo apoio, incentivo e compreensão. Aos meus pais Gleide e Fernando, à minha avó Neuza e aos meus irmãos Gleifer e Fernando (in memoriam), pelo amor e por tudo que fizeram para que eu completasse mais esta etapa da minha vida, esta conquista também é de vocês. Aos meus sogros Victorino, Ivanilda (in memoriam) e Maria Eli e cunhados Vilson, Enore, Roseni, Marilene, Evelange e Adimir, pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Agradecimentos

A Deus, pela vida que me foi dada e por me possibilitar chegar até aqui.

À Professora Dra. Maria Isabel Rodrigues, que muito contribuiu para a minha formação acadêmica através de seu incentivo, respeito, confiança, orientação e amizade. Obrigada por possibilitar tudo isso e também o ingresso no Doutorado Direto.

Ao Professor Dr. Francisco Maugeri Filho por todas as sugestões ao longo deste trabalho, que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora pela leitura atenta e cuidadosa e pela disponibilidade com que conduziram a conclusão deste trabalho.

À UNICAMP e ao DEA-Departamento de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem a complementação da minha formação.

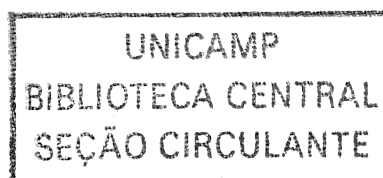
À FAPESP e à CAPES, órgãos financiadores deste trabalho.

Ao meu esposo Valmir pelo incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos. Sem você eu nada seria.

Aos meus pais Gleide e Fernando por todo o incentivo e apoio durante toda a minha vida e pelo exemplo que são, o meu muito obrigada.

Ao meu irmão Gleifer e minha avó Neuza por toda a torcida e incentivo, mesmo que de longe.

Aos colegas e amigos do laboratório de Engenharia de Bioprocessos: Saartje, Yemiko, Helen, Márcio, Keli, Fifa, Olga, Daniel, Eduardo, Fábio, Luciano, Guilherme, Abraão, Raquel, Eliane, Tihany, Lia, Bernardo, Miriam, Clarissa, Carlos, Janaina, André e Bernardo. Obrigada pela amizade e auxílio ao longo do desenvolvimento de meus trabalhos no laboratório.



ÍNDICE

RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Enzimas.....	5
2.2. Enzimas Imobilizadas.....	5
2.3. Purificação da Enzima	7
2.3.1. Produção de Inulinase.....	8
2.4. Oligossacarídeos.....	9
2.4.1. Produção de Oligossacarídeos em Meio Aquoso	9
2.4.2. Produção de Oligossacarídeos em Meio Orgânico	10
2.4.3. Frutooligossacarídeos	11
2.5. Bifidobactérias	12
2.6. Catálise Enzimática em Fase Orgânica	13
2.6.1. Escolha do Solvente e Princípios Físico-Químicos dos Sistemas Biocatalíticos em Solventes Orgânicos	13
2.6.2. Regras para a Otimização da Biocatálise em Solventes Orgânicos.....	15
2.6.3. Estabilizantes da Atividade Enzimática.....	16
2.7. Métodos Cromatográficos.....	16
2.8. Avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e temperatura na reação e estabilidade enzimática	17

3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Produção da Enzima Inulinase.....	22
3.2. Recuperação da enzima.....	22
3.3. Imobilização da enzima inulinase.....	23
3.4. Síntese dos Oligossacarídeos.....	23
3.4.1. Seleção dos Solventes para ambas as cepas em função da máxima conversão de frutooligossacarídeos	23
3.4.2. Otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos para a cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> ATCC 16045.....	24
3.4.2.1. Síntese em meio orgânico para a enzima livre	24
3.4.2.2. Síntese em meio aquoso para a enzima livre	27
3.4.2.3. Síntese em meio orgânico para a enzima imobilizada.....	27
3.4.2.4. Síntese em meio aquoso para a enzima imobilizada.....	29
3.4.3. Otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos para a cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	29
3.4.3.1. Síntese em meio orgânico para a enzima livre	29
3.4.3.2. Síntese em meio aquoso para a enzima livre	31
3.4.3.3. Síntese em meio orgânico para a enzima imobilizada.....	32
3.4.3.4. Síntese em meio aquoso para a enzima imobilizada.....	33
3.5. Análise Cromatográfica	34
3.5.1. Identificação e Quantificação das Amostras.....	34
3.6. Caracterização da Inulinase Livre e Imobilizada.....	34
3.6.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	35
3.6.2. Estabilidade térmica.....	35
3.6.3. Efeito do pH na atividade enzimática.....	36
3.6.4. Estabilidade com o pH.....	36
3.6.5. Determinação de K_m e V_{max}	36
3.7. Métodos Analíticos.....	37
3.7.1. Determinação de atividade enzimática para enzima livre	37
3.7.2. Determinação de atividade enzimática para enzima imobilizada.....	37
3.7.3. Açúcares Redutores Totais	37
4. RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA CONVERSÃO DA SACAROSE EM FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS	39
4.1. Seleção dos solventes.....	39
4.2. Otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos	40

4.2.1.	Cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> ATCC 16045.....	40
4.2.1.1.	Sistema Orgânico com Enzima Livre	40
4.2.1.2.	Sistema Aquoso com Enzima Livre	51
4.2.1.3.	Sistema Orgânico com Enzima Imobilizada	56
4.2.1.4.	Sistema Aquoso com Enzima Imobilizada	63
4.2.2.	Cepa <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	69
4.2.2.1.	Sistema Orgânico com Enzima Livre	69
4.2.2.2.	Sistema Aquoso com Enzima Livre da Cepa 7571	78
4.2.2.3.	Sistema Orgânico com Enzima Imobilizada	81
4.2.3.	Sistema Aquoso com Enzima Imobilizada da Cepa 7571	89
5.	RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LIVRE PARA AS CEPAS <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> ATCC 16045 E NRRL Y-7571	97
5.1.	Influência da temperatura na atividade enzimática.....	97
5.1.1.	Determinação da Energia de Ativação.....	98
5.2.	Estabilidade Térmica para enzima livre.....	101
5.2.1.	Determinação da Energia de Ativação para a reação de desnaturação (Ed)...	109
5.2.2.	Determinação do pH ótimo da enzima livre	114
5.2.3.	Estabilidade com o pH.....	117
5.2.4.	Determinação de K_m e V_{max}	120
5.3.	Caracterização da enzima imobilizada para as cepas <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045 e NRRL Y-7571.....	123
5.3.1.	Influência da temperatura na atividade enzimática.....	123
5.3.1.1.	Determinação da Energia de Ativação	124
5.3.2.	Estabilidade térmica para enzima imobilizada	127
5.3.2.1.	Determinação da Energia de Ativação para a reação de desnaturação (Ed) ..	133
5.3.3.	Influência do pH na atividade enzimática – Determinação do pH ótimo	138
5.3.4.	Estabilidade com o pH.....	140
5.3.5.	Determinação de K_m e V_{max}	142
6.	CONCLUSÕES.....	147
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	151
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 3.1: Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.</i>	21
<i>Figura 4.1: Conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) em meio orgânico utilizando ciclohexano, acetato de etila, acetato de butila, n-heptano e etanol (Sistema Orgânico com Enzima Livre - Cepa 16045).</i>	39
<i>Figura 4.2: Conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs em meio orgânico utilizando ciclohexano, acetato de etila, acetato de butila e n-heptano (Sistema Orgânico com Enzima Livre - Cepa 7571).</i>	40
<i>Figura 4.3: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 11 (a) e os ensaios de 12 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).</i>	42
<i>Figura 4.4: Acompanhamento da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do segundo planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).</i>	44
<i>Figura 4.5: Acompanhamento da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 10 horas de síntese para os 11 ensaios do terceiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).</i>	46
<i>Figura 4.6: Acompanhamento da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento completo (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).</i>	48
<i>Figura 4.7: Concentrações de glicose, frutose e sacarose (g/L) correspondentes a síntese de 12 horas do ensaio 11 do quarto planejamento fatorial completo (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).</i>	49
<i>Figura 4.8: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos em função do pH e da porcentagem de sacarose em relação à fase aquosa (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).</i>	50
<i>Figura 4.9: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).</i>	52
<i>Figura 4.10: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função do pH e da sacarose (%) (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).</i>	54
<i>Figura 4.11: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função do pH e da sacarose (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).</i>	54

<i>Figura 4.12: Valores médios de YFOSs (%) e produtividade (g/(L.h)) em função do pH utilizando tampão fosfato de sódio (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).</i>	55
<i>Figura 4.13: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 10 (a) e os ensaios de 11 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	58
<i>Figura 4.14: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do terceiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	60
<i>Figura 4.15: Valores médios de solvente (%) versus YFOSs (%) e produtividade (g/(L.h)), (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	62
<i>Figura 4.16: Acompanhamento de YFOSs (%) ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios 1 ao 8 (a) e do ensaio 9 ao 17 (b) dos ensaios do planejamento fatorial completo, (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045)</i>	64
<i>Figura 4.17: Superfícies de resposta e curvas de contorno para YFOSs(%) em função do pH e da sacarose (%) (a) e (b), do pH e da enzima (c) e (d) e em função da sacarose e da enzima (e) e (f), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	66
<i>Figura 4.18: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a produtividade em função da sacarose e do pH (a) e (b), em função da enzima e do pH (c) e (d) e enzima e da sacarose (e) e (f), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	67
<i>Figura 4.19: Acompanhamento de YFOSs (%) ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 10 (a) e os ensaios de 11 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	70
<i>Figura 4.20: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	72
<i>Figura 4.21: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	75
<i>Figura 4.22: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função do pH e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	76
<i>Figura 4.23: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função do pH e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	77
<i>Figura 4.24: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).</i>	79
<i>Figura 4.25: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função do pH e da sacarose (%), (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).</i>	80
<i>Figura 4.26: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 10 (a) e os ensaios de 11 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	83
<i>Figura 4.27: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	86

Figura 4.28: Superfícies de resposta para a YFOSs (%) (a) e curvas de contorno para a YFOS(%) em função da enzima (U/mL) e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).	88
Figura 4.29: Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função da enzima (U/mL) e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).	88
Figura 4.30: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).	90
Figura 4.31: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função da enzima e da sacarose(%), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).	92
Figura 4.32: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função da enzima e da sacarose(%), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).	92
Figura 5.1: Efeito da temperatura na atividade da inulinase livre na presença de acetato de butila (a) Cepa ATCC 16045 e (b) Cepa NRRL Y-7571.	99
Figura 5.2: Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase livre na presença de solvente (25; 50 e 70%), para o cálculo da energia de ativação para a cepa (a) ATCC 16045 e (b)NRRL Y-7571.	100
Figura 5.3: Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius para a Cepa (a) ATCC 16045 e (b) NRRL Y-7571.	112
Figura 5.4: Gráfico do Kd teórico e experimental versus temperatura para as porcentagens de solvente para a cepa ATCC 16045 (a) 25, (b) 50 e (c) 70%; para a cepa NRRL Y-7571 (d)25, (e) 50 e (f) 70%.	114
Figura 5.5: Atividade enzimática da inulinase livre em função do pH, para a cepa ATCC 16045 em (a) tampão acetato de sódio 0,1M e (b) em fosfato de sódio 0,05M; e para a cepa NRRL Y-7571 em (c) tampão acetato de sódio 0,1M e (d) em fosfato de sódio 0,05M.	116
Figura 5.6: Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase livre para a cepa ATCC 16045 na presença de (a)25%, (b)50% e (c)70% e para a NRRL Y-7571 (d) 25, (e)50 e (f) 70% de solvente.	119
Figura 5.7: Atividade enzimática da inulinase livre a $T = 50^{\circ}\text{C}$, na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de substrato (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571.	121
Figura 5.8: Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{\text{máx}}$ para 25, 50 e 70% de solvente (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571.	121
Figura 5.9: Efeito da temperatura na atividade da inulinase imobilizada na presença de acetato de butila (a) Cepa ATCC 16045 e (b) Cepa NRRL Y-7571.	125
Figura 5.10: Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase imobilizada na presença de solvente (25; 50 e 70%), para o cálculo da energia de ativação para a Cepa (a) ATCC 16045 e (b)NRRL Y-7571.	126
Figura 5.11: Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius para a Cepa (a) ATCC 16045 e (b) NRRL Y-7571.	134

<i>Figura 5.12: Gráfico do K_d teórico e experimental versus temperatura para as porcentagens de solvente para a cepa ATCC 16045 (a) 25, (b) 50 e (c) 70%; para a cepa NRRL Y-7571 (d) 25, (e) 50 e (f) 70%.</i>	138
<i>Figura 5.13: Atividade enzimática da inulinase imobilizada em função do pH, para a cepa ATCC 16045 em (a) tampão acetato de sódio 0,1M e (b) em fosfato de sódio 0,05M; e para a cepa NRRL Y-7571 em (c) tampão acetato de sódio 0,1M e (d) em fosfato de sódio 0,05M.</i>	140
<i>Figura 5.14: Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase imobilizada para a cepa ATCC 16045 na presença de (a) 25%, (b) 50% e (c) 70% e para a NRRL Y-7571 (d) 25, (e) 50 e (f) 70% de solvente.</i>	142
<i>Figura 5.15: Atividade enzimática da inulinase imobilizada a $T = 50^\circ\text{C}$, na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de substrato (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571.</i>	143
<i>Figura 5.16: Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para 25, 50 e 70% de solvente (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571, para enzima imobilizada.</i>	144

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 3.1: Valores utilizados no 1º planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} em sistema orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)</i>	25
<i>Tabela 3.2: Valores utilizados no 2º planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} em meio orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)</i>	26
<i>Tabela 3.3: Valores utilizados no 3º planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} em meio orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)</i>	26
<i>Tabela 3.4: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)</i>	27
<i>Tabela 3.5: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio aquoso e enzima livre (Cepa ATCC 16045)</i>	27
<i>Tabela 3.6: Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} em meio orgânico e enzima imobilizada (Cepa ATCC 16045)</i>	28
<i>Tabela 3.7: Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} em meio orgânico e enzima imobilizada (Cepa ATCC 16045)</i>	28
<i>Tabela 3.8: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio aquoso e enzima imobilizada (Cepa ATCC 16045)</i>	29
<i>Tabela 3.9: Valores utilizados no 1º planejamento fatorial fracionado para o estudo da síntese em meio orgânico e enzima livre (NRRL Y-7571)</i>	30
<i>Tabela 3.10: Valores utilizados no 2º planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) em meio orgânico e enzima livre (NRRL Y-7571)</i>	30
<i>Tabela 3.11: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio orgânico e enzima livre (NRRL Y-7571)</i>	31
<i>Tabela 3.12: Valores utilizados no planejamento fatorial completo para a enzima livre em sistema aquoso (NRRL Y-7571)</i>	31
<i>Tabela 3.13: Valores utilizados no 1º planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} em meio orgânico para a enzima imobilizada (NRRL Y-7571)</i>	32
<i>Tabela 3.14: Valores utilizados no planejamento fatorial completo para a enzima imobilizada em meio orgânico (NRRL Y-7571)</i>	33
<i>Tabela 3.15: Valores utilizados no planejamento fatorial completo para a enzima em sistema aquoso e imobilizada (NRRL Y-7571)</i>	33
<i>Tabela 4.1: Matriz do planejamento experimental 2^{6-2} e a resposta YFOSs (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)</i>	41

<i>Tabela 4.2: Estimativa dos efeitos para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (Sistema orgânico com enzima livre - Cepa 16045)</i>	43
<i>Tabela 4.3: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)</i>	44
<i>Tabela 4.4: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)</i>	45
<i>Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs e para a produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)</i>	47
<i>Tabela 4.6: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da sacarose (%) na resposta YFOSs (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)</i>	48
<i>Tabela 4.7: Análise de variância para a conversão em frutooligossacarídeos (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)</i>	50
<i>Tabela 4.8: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da sacarose nas respostas YFOSs e produtividade (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).</i>	51
<i>Tabela 4.9: Análise de variância para YFOSs e produtividade (Sistema aquoso com enzima livre – Cepa 16045)</i>	53
<i>Tabela 4.10: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).</i>	55
<i>Tabela 4.11: Matriz do planejamento e as respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	57
<i>Tabela 4.12: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045)</i>	59
<i>Tabela 4.13: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	60
<i>Tabela 4.14: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045)</i>	61
<i>Tabela 4.15: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	62
<i>Tabela 4.16: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH, da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas YFOSs e produtividade, (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	63
<i>Tabela 4.17: Análise de variância para YFOSs(%) e produtividade (g/(L.h)) (Sistema aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045)</i>	65
<i>Tabela 4.18: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes aos ensaios realizados (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).</i>	68
<i>Tabela 4.19: Matriz do planejamento e as respostas YFOSs (%) e produtividade (g/(L.h)) (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	69
<i>Tabela 4.20: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema orgânico com enzima livre – Cepa 7571)</i>	71
<i>Tabela 4.21: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	72
<i>Tabela 4.22: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema orgânico com enzima livre – Cepa 7571)</i>	73

<i>Tabela 4.23: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da porcentagem de sacarose nas respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	74
<i>Tabela 4.24: Análise de variância para YFOSs e produtividade (g/(L.h)) (Sistema orgânico com enzima livre – Cepa 7571)</i>	76
<i>Tabela 4.25: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).</i>	77
<i>Tabela 4.26: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da porcentagem de sacarose nas respostas YFOSs (%) e produtividade (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).</i>	78
<i>Tabela 4.27: Análise de variância para YFOSs para sistema aquoso com enzima livre – Cepa 7571</i>	80
<i>Tabela 4.28: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).</i>	81
<i>Tabela 4.29: Matriz do planejamento e as respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	82
<i>Tabela 4.30: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade para sistema orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571</i>	84
<i>Tabela 4.31: Resultados do planejamento fatorial no estudo da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	85
<i>Tabela 4.32: Análise de variância para YFOSs e para a produtividade para sistema orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571</i>	87
<i>Tabela 4.33: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	89
<i>Tabela 4.34: Resultados do planejamento fatorial no estudo da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas YFOSs e produtividade, (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	90
<i>Tabela 4.35: Análise de variância para YFOSs e produtividade para sistema aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571</i>	91
<i>Tabela 4.36: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	93
<i>Tabela 4.37: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).</i>	94
<i>Tabela 5.1: Valores obtidos de temperatura ótima por outros autores para enzimas de diferentes cepas</i>	98
<i>Tabela 5.2: Atividade enzimática em função da temperatura, para a inulinase livre, das duas cepas, na presença de 25, 50 e 70% de acetato de butila</i>	99
<i>Tabela 5.3: Atividade enzimática da inulinase livre, das duas cepas, na presença de 25; 50 e 70% de solvente, em função da temperatura</i>	100
<i>Tabela 5.4: Valores de energia de ativação na presença de 25, 50 e 70% de solvente para as duas cepas</i>	101
<i>Tabela 5.5: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%.</i>	102

<i>Tabela 5.6: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	103
<i>Tabela 5.7: Estabilidade a temperatura de 52,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	103
<i>Tabela 5.8: Estabilidade a temperatura de 52,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	104
<i>Tabela 5.9: Estabilidade a temperatura de 55°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	104
<i>Tabela 5.10: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	105
<i>Tabela 5.11: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	105
<i>Tabela 5.12: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	106
<i>Tabela 5.13: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	106
<i>Tabela 5.14: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	107
<i>Tabela 5.15: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	107
<i>Tabela 5.16: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	108
<i>Tabela 5.17: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%</i>	108
<i>Tabela 5.18: Valores de Kd em função da temperatura para 25, 50 e 70% de acetato de butila</i>	111
<i>Tabela 5.19: Valores de Ed em função da porcentagem de solvente estudada</i>	111
<i>Tabela 5.20: Valores de Kd e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima livre na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa ATCC 16045</i>	112
<i>Tabela 5.21: Valores de Kd e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima livre na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa NRRL Y-7571</i>	113
<i>Tabela 5.22: Atividade enzimática da inulinase recuperada, das duas cepas, em função do pH, para enzima livre em tampão acetato de sódio 0,1M e fosfato de sódio 0,05M na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila)</i>	115
<i>Tabela 5.23: Valores de pH ótimo obtidos por outros autores para diferentes microrganismos</i>	116
<i>Tabela 5.24: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) utilizando enzima livre - Cepa ATCC 16045</i>	118
<i>Tabela 5.25: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) utilizando enzima livre - Cepa NRRL Y-7571</i>	118

<i>Tabela 5.26: Atividades enzimáticas (U/mL), na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de sacarose [S]</i>	120
<i>Tabela 5.27: Parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para as três porcentagens de solvente estudadas</i>	122
<i>Tabela 5.28: Valores obtidos de K_m e V_{max} por outros autores em meio aquoso</i>	122
<i>Tabela 5.29: Valores obtidos de temperatura ótima para inulinase de vários microrganismos por outros autores</i>	123
<i>Tabela 5.30: Atividade enzimática em função da temperatura, para a inulinase imobilizada na presença de 25, 50 e 70% de acetato de butila</i>	124
<i>Tabela 5.31: Atividade enzimática da inulinase imobilizada na presença de 25; 50 e 70% de solvente (acetato de butila), em função da temperatura</i>	125
<i>Tabela 5.32: Valores de energia de ativação na presença de 25, 50 e 70% de solvente para as duas cepas</i>	127
<i>Tabela 5.33: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente</i>	127
<i>Tabela 5.34: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente</i>	128
<i>Tabela 5.35: Estabilidade a temperatura de 52,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente</i>	128
<i>Tabela 5.36: Estabilidade a temperatura de 55°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente</i>	129
<i>Tabela 5.37: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente</i>	129
<i>Tabela 5.38: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente</i>	130
<i>Tabela 5.39: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente</i>	130
<i>Tabela 5.40: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente</i>	131
<i>Tabela 5.41: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente</i>	131
<i>Tabela 5.42: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente</i>	132
<i>Tabela 5.43: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente</i>	132
<i>Tabela 5.44: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente</i>	133
<i>Tabela 5.45: Valores de K_d em função da temperatura para 25, 50 e 70% de acetato de butila</i>	135
<i>Tabela 5.46: Valores de E_d em função da porcentagem de solvente estudada</i>	135
<i>Tabela 5.47: Valores de K_d e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima imobilizada na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa ATCC 16045</i>	136

<i>Tabela 5.48: Valores de Kd e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima imobilizada na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa NRRL Y-7571</i>	137
<i>Tabela 5.49: Atividade enzimática da inulinase recuperada em função do pH, para enzima imobilizada em tampão acetato de sódio 0,1M e fosfato de sódio 0,05M na presença de 25, 50 e 70% de solvente</i>	139
<i>Tabela 5.50: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente utilizando enzima imobilizada - Cepa ATCC 16045</i>	141
<i>Tabela 5.51: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente utilizando enzima imobilizada - Cepa NRRL Y-7571</i>	141
<i>Tabela 5.52: Atividades enzimáticas (U/mL), na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de sacarose [S] para enzima imobilizada</i>	143
<i>Tabela 5.53: Parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para as três porcentagens de solvente estudadas, enzima imobilizada</i>	145
<i>Tabela 6.1: Caracterização da Cepa Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus ATCC 16045.</i>	147
<i>Tabela 6.2: Caracterização da Cepa Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571.</i>	148
<i>Tabela 6.3: Condições Otimizadas para YFOSs a partir da Cepa ATCC 16045.</i>	150
<i>Tabela 6.4: Condições Otimizadas para YFOSs a partir da Cepa NRRL Y-7571.</i>	150

RESUMO

Atualmente cresce a procura por alimentos que tragam benefícios à saúde humana. Assim, os oligossacarídeos vêm sendo incluídos na dieta acarretando vários benefícios. A contribuição mais importante desses açúcares está associada à melhoria na composição da flora intestinal e conseqüentemente ao aumento do número de bifidobactérias.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização da inulinase, de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571, e a otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos em meio orgânico e aquoso, utilizando a enzima nas formas livre e imobilizada. A síntese dos frutooligossacarídeos foi realizada em reatores encamisados. A identificação e a quantificação dos mesmos foram feitos através da cromatografia de íons.

A enzima inulinase da linhagem ATCC 16045 apresentou como temperatura ótima de reação 55°C para a enzima livre e imobilizada, independentemente da porcentagem de solvente utilizada. A temperatura de maior estabilidade foi de 50°C, tanto para enzima livre quanto para a imobilizada, sendo a meia vida em torno de 12 horas para a livre e 38 horas para a imobilizada a 50°C.

Determinou-se o pH 4,8 e 4,4 como sendo os ótimos de reação para a enzima na forma livre e imobilizada, respectivamente, independentemente da porcentagem de solvente utilizada. Quanto ao pH de estabilidade, obteve-se para enzima livre 4,4, 4,8 e 4,4 em 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente. Enquanto que para a imobilizada o pH de maior estabilidade foi 4,8 independentemente da porcentagem de solvente.

No estudo cinético os valores para as constantes cinéticas foram K_m 0,016, 0,17 e 0,13 M, e V_{max} 10,6, 34,7 e 23,7 mol/(min.L), para 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente, para a enzima livre. Enquanto que para a enzima imobilizada os valores de K_m foram 0,0035, 0,006 e 0,025 M e V_{max} 39, 60 e 86 mol/(min.L), para 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente.

A enzima inulinase da linhagem NRRL Y-7571 apresentou como temperatura ótima de reação 50°C para a enzima livre independentemente da porcentagem de solvente utilizada. Enquanto que para a imobilizada o ótimo foi de 55, 60 e 55°C, para 25; 50 e 70% de solvente, respectivamente. A temperatura de maior estabilidade foi de 50°C, tanto para

enzima livre quanto para a imobilizada, sendo o tempo de meia vida em torno de 15 horas para a livre e em torno de 19 horas para a imobilizada a 50°C.

Determinou-se o pH 4,8 como sendo o ótimo de reação para a enzima tanto na forma livre como imobilizada, independentemente da porcentagem de solvente utilizada. Quanto ao pH de estabilidade, obteve-se para livre 4,4, 4,4 e 4,0 e para a imobilizada foi de 4,0, 4,0 e 4,4 em 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente. No estudo cinético os valores para as constantes cinéticas foram K_m 0,026, 0,038 e 0,08 M, e V_{max} 11,3, 21,2 e 35,2 mol/(min.L), para a livre. Enquanto que para a imobilizada os valores de K_m foram 0,006, 0,002 e 0,01 M e V_{max} 22,9, 27 e 33,2 mol/(min.L), para 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente.

Os experimentos foram conduzidos através de planejamento experimental e análise de superfícies de respostas, onde estudou-se o efeito do pH, temperatura, relação solvente/tampão, porcentagem de sacarose, PEG (polietileno-glicol) e enzima sobre a máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e a produtividade.

A partir da linhagem ATCC 16045 em meio orgânico as máximas YFOSs foram de 13,5 e 18,7%, utilizando a enzima livre e imobilizada, respectivamente. Enquanto que em meio aquoso as máximas YFOSs obtidas foram de 11,9 e 15,3%, utilizando a inulinase livre e imobilizada, respectivamente.

A partir da linhagem NRRL Y-7571 em meio orgânico as máximas YFOSs foram de 16,7 e 18,2%, utilizando a enzima livre e imobilizada, respectivamente. Enquanto que em meio aquoso as máximas YFOSs obtidas foram de 15,2 e 16,8%, utilizando a inulinase livre e imobilizada, respectivamente.

ABSTRACT

Functional foods, which are beneficial to human beings, have been attracting more and more interest in the last years. Many oligosaccharides, which are also called prebiotics, have been included in some food formulations, making them potentially more healthful. One of the most important effect is the improvement of the good intestinal flora, more significantly the number of the bifidobacteria.

The objective of this work was to study the characterization by free and immobilized inulinase; and the optimization of the conversion of sucrose into fructooligosaccharides in organic and aqueous media, from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and NRRL Y-7571 using immobilized and free enzyme. Synthesis was carried out in stirred reactors and the synthesis products were identified and measured by ions chromatography.

Optimum reaction temperature to ATCC 16045 was 55°C for free and immobilized enzyme for independent of the used percentage of solvent. Better stability temperature was 50°C for free and immobilized with a half-life of about 12 and 38 hours for free and immobilized, respectively.

Optimum pH reactions was 4.8 and 4.4 for free and immobilized enzyme, respectively, for independent of the used percentage of solvent. Better stability pH was 4.4, 4.8 and 4.4 for free enzyme with 25, 50 and 70% of solvent, respectively. To immobilized was 4.8.

Kinetic study with the following kinetic constants: K_m 0.016, 0.17 and 0.13 M and V_{max} 10.6, 34.7 and 23.7 mol/(min.L) for free enzyme with 25, 50 and 70% of solvent, respectively. And to immobilized were K_m 0.0035, 0.006 and 0.025 M and V_{max} 39, 60 and 86 mol/(min.L) with 25, 50 and 70% of solvent, respectively.

Optimum reaction temperature to NRRL Y-7571 was 50°C for free independent of the used percentage of solvent and was 55, 60 and 55°C for immobilized enzyme with 25, 50 and 70% of solvent, respectively. Better stability temperature was 50°C for free and immobilized with a half-life of about 15 and 19 hours for free and immobilized, respectively.

Optimum pH reactions was 4.8 for free and immobilized enzyme, for the independent used percentage of solvent. Better stability pH was 4.4, 4.4 and 4.0 for free and 4.0, 4.0 and 4.4 for immobilized enzyme with 25, 50 and 70% of solvent, respectively. Kinetic study with the following kinetic constants: K_m 0.026, 0.038 and 0.08 M and V_{max} 11.3, 21.2 and 35.2 mol/(min.L) for free enzyme and to immobilized K_m 0.006, 0.002 and 0.01 M and V_{max} 22.9, 27 and 33.2 mol/(min.L) with 25, 50 and 70% of solvent, respectively.

Factorial design and response surface techniques were used to optimize the synthesis of fructooligosaccharides. Six parameters were studied (pH, temperature, sucrose concentration, enzyme, organic:aqueous solvent ratio and polyethylene glycol [PEG] concentration) on the maximum conversion of sucrose into fructooligosaccharides and productivity.

To ATCC 16045 the maximum conversion obtained in organic medium was 13.5 and 18.7%, using free and immobilized enzyme, respectively. The maximum conversion obtained in aqueous medium was 11.9 and 15.3%, using free and immobilized enzyme, respectively.

To NRRL Y-7571 the maximum conversion obtained in organic medium was 16.7 and 18.2%, using free and immobilized enzyme, respectively. The maximum conversion obtained in aqueous medium was 15.2 and 16.8%, using free and immobilized enzyme, respectively.

1. Introdução

Frutooligossacarídeos têm atraído especial atenção tanto de pesquisadores e consumidores, bem como produtores comerciais, em vista do aumento da demanda no consumo de alimentos saudáveis ou ingredientes de alimentos considerados saudáveis, como são designados os frutooligossacarídeos de acordo com a legislação vigente (Chien *et al.*, 2001).

Estes podem melhorar o produto em que se encontram. São solúveis em água e levemente doces, apresentam 0,3 a 0,6 vezes a doçura da sacarose. Este baixo poder adoçante é dependente da estrutura química e massa molecular dos oligossacarídeos presentes no produto. O baixo poder adoçante é favorável na produção do alimento, quando a matriz com reduzida doçura é desejável para evidenciar outros “flavours”. O principal interesse do seu uso como ingredientes nos alimentos é devido às suas propriedades fisiológicas. Ao contrário do amido e dos monossacarídeos, os oligossacarídeos não são utilizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglucanas, conseqüentemente são usados como açúcares de baixa cariogenicidade em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas. Muitos oligossacarídeos não são digeridos por humanos, sendo então usados em alimentos dietéticos para serem consumidos por diabéticos. No caso de alimentos doces, eles também podem ser usados como matriz em conjunto com adoçantes artificiais, como aspartame e fenilalanina, mascarando o sabor indesejável produzido por alguns destes adoçantes (Crittenden & Playne, 1996).

Os frutooligossacarídeos representam uma das principais classes de oligossacarídeos bifidogênicos, em termos de produção. Normalmente são produzidos por dois processos, que não apresentam diferenças significativas no produto final. No primeiro processo a sacarose é utilizada como substrato, obtendo-se como produto frutooligossacarídeos de 2 a 4 unidades fructosil com ligações β -(2-1), com um resíduo α -D-glicosil terminal, conhecidos como Kestose, nistose e 1-frutosilnistose. O segundo processo constitui-se na hidrólise enzimática da inulina, produzindo frutooligossacarídeos de cadeia longa (Crittenden & Playne, 1996).

A habilidade destes frutooligossacarídeos de promoverem a proliferação das bifidobactérias no cólon tem sido estudada. Acredita-se que estas bactérias são importantes para a saúde e juntamente com outros microrganismos são denominadas de probióticos. Os compostos não digeríveis para o organismo humano que beneficiam seletivamente o crescimento ou a atividade de um ou um número limitado de bactérias no cólon, são considerados como prebióticos (Gennaro *et al.*, 2000).

A ingestão de frutooligossacarídeos estimula o aumento da população de bifidobactérias do cólon, que é numérica e fisiologicamente o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal, visto que atuam com conseqüente supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas existentes no intestino grosso, restringindo, portanto, a formação de toxinas e outras substâncias nocivas ao ser humano (Gibson & Wang, 1994). As bifidobactérias, microrganismos anaeróbicos não formadores de esporos e gram-positivos, ocorrem naturalmente no intestino humano, trazendo uma série de benefícios para a saúde (Modler, 1994).

As bifidobactérias são responsáveis pelos seguintes efeitos benéficos: manutenção normal da microbiota intestinal, atividade anticariogênica, estímulo ao sistema imunológico e melhora no valor nutricional dos alimentos (Marx *et al.*, 2000).

Em geral os frutooligossacarídeos são bons substratos para bactérias dos tipos *Bifidobacterium* spp. e *Bacteroides* spp., pois estas possuem as enzimas necessárias para metabolizá-los e usá-los para crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, estes não são bons substratos para *Escherichia coli* ou *Clostridium perfringens*, por não possuírem estas enzimas. A modificação da flora intestinal está associada com a diminuição do pH. A flora bifidogênica é capaz de criar um meio ácido não favorável ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos (Urgell & Orleans, 2001).

Compostos que não são metabolizados pelo hospedeiro e alcançam o intestino para serem metabolizados por bifidobactérias são considerados fatores bifidogênicos. Essencialmente, estes compostos são carboidratos que são utilizados pelas bifidobactérias como fonte de energia (Modler, 1994).

A indigestibilidade dos oligossacarídeos parece ter efeitos similares ao das fibras, prevenindo a constipação, porém o uso excessivo pode causar flatulência e diarreia, para

frutooligossacarídeos a dose mínima para causar diarreia é em torno de 40 – 50 g/diárias (Spiegel *et al.*, 1994).

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o potencial de síntese de frutooligossacarídeos por inulinase, livre e imobilizada, a partir das linhagens *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571, em meio orgânico sob diferentes condições de pH, temperatura, porcentagem de sacarose, enzima (U/mL), relação solvente/tampão e PEG (polietileno glicol). Para assim verificar se é possível a síntese em meio orgânico e, se a reação de hidrólise diminui quando comparado ao sistema aquoso.

As seqüências de planejamentos experimentais visando a otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos e da produtividade realizados durante este trabalho, para as duas cepas estudadas, estão apresentadas na tabela abaixo.

Tabela 1: Sequências de planejamentos experimentais visando a otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos e da produtividade realizados para cada tipo de sistema estudado

Sistema	1ºPlanejamento	2ºPlanejamento	3ºPlanejamento	Teste de Tukey
Cepa 16045	Orgânico Livre	(T, pH, sacarose, enzima, solvente/tampão, PEG) 2^{6-2}	(T, pH, sacarose e solvente/tampão) 2^{4-1}	(pH e sacarose) 2^2 +axiais+centrais
	Aquoso Livre	(pH e sacarose) 2^2 +axiais+centrais		Tukey variando o pH
	Orgânico Imob.*	(T, pH, sacarose, enzima, solvente/tampão, PEG) 2^{6-2}	(pH, sacarose, enzima e solvente/tampão) 2^{4-1}	Tukey variando a relação solvente/tampão
	Aquoso Imob.*	(pH, sacarose e enzima) 2^3 +axiais+centrais		Tukey variando a sacarose
Cepa 7571	Orgânico Livre	(T, pH, sacarose, enzima, solvente/tampão, PEG) 2^{6-2}	(T, pH, sacarose e enzima) 2^{4-1}	(pH e sacarose) 2^2 +axiais+centrais
	Aquoso Livre	(pH e sacarose) 2^2 +axiais+centrais		Tukey variando a sacarose
	Orgânico Imob.*	(T, pH, sacarose, enzima, solvente/tampão, PEG) 2^{6-2}	(sacarose e enzima) 2^2 +centrais+axiais	Tukey variando a sacarose
	Aquoso Imob.*	(sacarose e enzima) 2^2 +axiais+centrais		Tukey variando a sacarose e a enzima

*Imob. = Imobilizada

2. Revisão bibliográfica

2.1. Enzimas

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos, envolvendo reações com substratos. Estas são geralmente de natureza protéica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico (Best *et al.*, 1994). A aplicação tecnológica de enzimas é bastante vantajosa quando comparada aos processos químicos por não necessitar de condições de temperatura e pressão drásticas. Uma das vantagens da produção de enzimas é que utilizam substratos de baixo custo e exigem um tempo curto de produção (Medeiros *et al.*, 1999).

As inulinases podem ser obtidas de leveduras, fungos, bactérias e de plantas (Manzoni & Cavazzoni, 1992). Uma das mais estudadas, é a enzima produzida por *Kluyveromyces marxianus*, que possui boa atividade sobre os substratos sacarose e inulina (Kushi *et al.*, 1996).

2.2. Enzimas Imobilizadas

Enzimas são catalisadores que desempenham a função de induzir e controlar reações, assim como aumentar taxas de reação. Ao contrário da maioria dos catalisadores inorgânicos, enzimas são geralmente solúveis e instáveis, e, conseqüentemente só podem ser utilizadas uma vez quando em soluções livres (Messing, 1975).

A utilização de enzimas imobilizadas como catalisadores de processo vem justamente tentar eliminar ou reduzir os entraves que limitam o emprego de enzimas solúveis em aplicações industriais, tais como, os custos elevados de isolamento e purificação, a instabilidade operacional e a dificuldade técnico-econômica de recuperação para reutilização após o término do processo catalítico (Reguly, 2000).

As vantagens de enzimas imobilizadas como catalisadores de processo: a enzima pode ser reutilizada; desenvolvimento de processos contínuos; facilidade de controle e automatização; efluentes livres de catalisadores e menor custo de mão-de-obra. Como desvantagens podemos citar: custo adicional de suportes e reagentes de imobilização; custo

adicional da operação de imobilização; perdas da atividade durante a imobilização; restrições difusionais e maiores riscos de contaminação na operação contínua de reatores (Cabral,1989). O desenvolvimento industrial de reatores enzimáticos requer o uso de enzimas imobilizadas nos casos em que o custo do catalisador é alto (Blandino *et al.*, 2000).

O uso da enzima na forma livre ou imobilizada obedecerá a uma avaliação econômica das alternativas de processo, onde vantagens e desvantagens serão contrastadas de forma quantitativa, necessitando de dados sobre a cinética e estabilidade das enzimas imobilizadas e da enzima livre, além de informações sobre custos, propriedades físico-químicas, eficiência de imobilização e capacidade de carga do suporte. Os processos de imobilização devem fazer uso de métodos brandos e bem controlados, respeitando a estrutura nativa da proteína, as ligações criadas entre suporte e enzima. Para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário selecionar o procedimento mais simples e de menor custo, resultando num biocatalisador com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (Cabral,1989).

Durante o processo de imobilização da enzima é observada uma perda da atividade catalítica, onde esta perda pode ocorrer devido a três principais fatores: desativação térmica da enzima (desnaturação da proteína); dessorção da enzima do suporte e limitação do acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima por barreiras físicas presentes (Reguly, 2000).

O método a ser usado depende fundamentalmente do objetivo, ou seja, do processo catalítico no qual a enzima vai ser usada; porque fatores como natureza dos reagentes, solubilidade, concentração iônica, compatibilidade com o suporte, matriz ou cápsula além do custo, ditam a aplicabilidade deste ou daquele método (Bailey & Ollis, 1986).

Qualquer uma das técnicas deve levar em conta a natureza das enzimas, sua estrutura nativa, sua capacidade de ligação com o suporte, não devendo participar de ligações os radicais ou grupos ativos, responsáveis pela ação catalítica (Reguly, 2000).

Segundo Keyes citado por (Reguly, 2000) geralmente, as enzimas imobilizadas são mais estáveis a mudanças de pH e temperatura do que as enzimas sob forma livre. Mesmo quando suspensas em água, estas enzimas insolubilizadas por imobilização, permanecem

estáveis e ativas por meses, por isso a possibilidade de seu reuso. A separação dos produtos e reagentes também é mais fácil, pois basta lavagem do catalisador.

A imobilização causa mudanças nas medidas dos parâmetros, como por exemplo a velocidade máxima de reação, a constante de Michaelis-Menten, a temperatura ótima e o pH ótimo (Maugeri, 2002). São observadas mudanças nas propriedades físicas e químicas após o processo de imobilização, tais como: mudanças na atividade enzimática, estabilidade e cinética (Santos, 2002).

A estrutura determina a integridade do sítio catalítico dentro da enzima, o qual é facilmente rompida por trocas de energia ao redor da enzima, como exemplo pode-se citar a temperatura. Este fenômeno é chamado desnaturação e pode ser irreversível ou reversível dependendo do grau de deformação na estrutura (Whitehurst & Law, 2002).

Imobilização tem sido definido como um processo onde o movimento das enzimas é completamente ou parcialmente restrito, usualmente resultando em uma forma de enzima insolúvel na água. Na indústria as enzimas são freqüentemente utilizadas na forma imobilizada, pois podem ser reutilizadas. As restrições difusionais ocorrem porque antes do início da reação enzimática o substrato deve se difundir para a enzima imobilizada. Ocorrem simultaneamente a difusão e a reação enzimática (Wiseman, 1987).

2.3. Purificação da Enzima

Recuperar, isolar e purificar enzimas do meio em que foram geradas visa à obtenção de um produto mais estável, mais ativo e de pureza satisfatória. As técnicas usadas para a separação de enzimas de concentrados líquidos são: a separação das enzimas por precipitação; por extração líquido-líquido sendo o solvente aquoso ou não aquoso; ou, ainda, uma mistura de solvente polar-apolar; por adsorção e desorção (Reguly, 2000).

A adição de solventes orgânicos às dispersões aquosas de proteínas-enzimas diminui a constante dielétrica do meio, reduzindo a solubilidade da proteína. Quantidades crescentes de solvente fazem as moléculas de proteína interagir umas com as outras mais do que com a água, pelo que elas precipitam. Vários são os solventes que podem ser usados, o etanol é um dos mais usados (Reguly, 2000).

2.3.1. Produção de Inulinase

Santos (1998) obteve inulinase a partir da fermentação com *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 com temperatura de 30°C, aeração 0,2 – 0,3 vvm, agitação moderada e tempo de fermentação de 18 horas com atividade de 7,18 U/mL.

Kalil (2000) utilizou a técnica de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta para otimizar o meio de cultura para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. A atividade enzimática foi de 127 U/mL, o que representa uma atividade 17 vezes maior do que nas condições anteriormente estudadas por Santos (1998).

Treichel (2001), substituindo o meio sintético por meio industrial usando o mesmo microrganismo, obteve atividade enzimática de 138U/mL em frascos agitados.

Kabke (2002) otimizou a produção de inulinase em meio industrial para quatro linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, em frascos agitados. Os experimentos foram conduzidos através de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, através dos quais obteve-se atividades enzimáticas máximas de 91; 84,9; 1500 e 2660 U/mL para as linhagens NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NCYC 587 e NRRL 7571, respectivamente.

Silva-Santisteban (2001) otimizou a produção da inulinase nas seguintes condições: 450rpm e 1,0 vvm usando um agitador tipo “pitched blade up”, pH inicial de 3,5 e 30°C de temperatura. Este autor, estudando diferentes tipos de agitadores, verificou que estes possuem influência significativa na fisiologia do microrganismo e na produção da enzima.

Outras 10 linhagens de *Kluyveromyces* foram estudadas por Makino (2004) para a otimização da inulinase em meio de cultivo industrial em frascos agitados. A espécie *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi selecionada como melhor produtora de inulinase atingindo 800U/mL. Este microorganismo foi utilizado para o estudo em reator de bancada para avaliação das variáveis água de maceração de milho, melaço, Prodexlac, aeração e agitação, sendo que a água de maceração de milho e o melaço sofreram um pré-tratamento para clarificação, viabilizando a etapa de recuperação e purificação da enzima. As condições otimizadas após dois planejamentos fatoriais por Treichel (2004) foram:

extrato de levedura 6g/L, agitação 300rpm, aeração 1,5vvm, melaço 250g/L e água de maceração de milho 80g/L atingindo-se 1380U/mL de atividade enzimática.

2.4. Oligossacarídeos

Oligossacarídeos são carboidratos formados de três a dez unidades de monômeros de hexoses. Podem ser produzidos pelo uso das enzimas. A fonte da enzima e as condições de operação regulam o tipo e a quantidade de oligossacarídeos que serão produzidos. Uma das maiores classes de oligossacarídeos bifidogênicos são os frutooligossacarídeos (Crittenden & Playne, 1996).

2.4.1. Produção de Oligossacarídeos em Meio Aquoso

Santos (1998) estudou a produção de oligossacarídeos em meio aquoso e verificou a formação de frutooligossacarídeos. Na condição de pH 6,0 e temperatura de 50°C, obteve uma concentração máxima de frutooligossacarídeos (94% de kestose e 6% de nistose).

Contado (1998) estudou a produção de frutooligossacarídeos utilizando β - frutofuranosidase de *A . niger*. A maior proporção de frutooligossacarídeos (54,21%) em relação aos açúcares totais contidos na reação ocorreu no substrato sacarose 30% após 6 horas de incubação.

Na síntese de kestose a partir de β -frutofuranosidase imobilizada obtida a partir do *Aureobasidium sp* ATCC 20524, a produção máxima obtida pelos autores Hayashi *et al.*, (1991) foi de 287g de kestose a partir de 40% (p/v) de solução de sacarose num tempo de 168 horas de reação. Enquanto que a produção de frutooligossacarídeos obtida por Cruz *et al.*, (1998), a partir de micélios imobilizados de *Aspergillus japonicus*, foi de 61,28% partindo de uma solução de sacarose de 65% (p/v) por 4 horas de reação.

Chien *et al.*, (2001) obtiveram 61% de frutooligossacarídeos com 5 horas de reação, a partir de 400g/L de sacarose, utilizando a β -D-frutofuranosidase imobilizada do *Aspergillus japonicus*.

Segundo Hidaka *et al.*, (1988) durante a reação de transfrutossilação a sacarose foi rapidamente convertida em frutooligossacarídeos e o conteúdo destes chegou a 69% do

total de carboidratos dentro de 24 horas, partindo de células do *Aspergillus niger* ATCC 20611. Segundo Kim *et al.*, (1998) a partir de uma nova frutossiltransferase produzida pelo *Bacillus macerans* EG-6, catalisando a reação com 500g/L de sacarose produzindo 45,2% de GF₄ (1- fructosilnistose), sem formar os outros oligossacarídeos, a reação ocorreu com 48 horas numa temperatura de 37°C e pH 6,0.

A partir da β -frutofuranosidase obtida a partir do *Aspergillus niger* IMI 303386, Nguyen *et al.*, (1999) obtiveram uma produção de 25% (p/v) de frutooligossacarídeos a partir da sacarose 50% (p/v) num tempo de 72 horas com pH 6,5 e temperatura de 39°C.

Utilizando a enzima frutossiltransferase obtida a partir do *Aspergillus niger* L'Hocine *et al.*, (2000) obtiveram 62% de frutooligossacarídeos.

A produção de frutooligossacarídeos, obtida por Sangeetha *et al.*, (2003), foram de 54% em relação a concentração inicial de sacarose. Os frutooligossacarídeos foram obtidos a partir da frutossiltransferase do *Aspergillus oryzae* CFR 202 num tempo de reação de 12 horas na temperatura de 55°C.

Yun *et al.*, (1997), obtiveram como máxima produção de inulo-oligossacarídeos, utilizando a inulina como substrato, 72 e 83% utilizando endoinulinase livre e imobilizada, respectivamente a partir de *Pseudomonas sp.*

Hang & Woodams (1996), estudaram a otimização da produção de frutooligossacarídeos, utilizando como substrato a sacarose e a enzima comercial obtida da Novo Nordisk Biochem North América, esta converteu 450g/L de sacarose em 272g/L de frutooligossacarídeos com 14 horas de reação a 65°C e pH 5,6.

2.4.2. Produção de Oligossacarídeos em Meio Orgânico

Somiari & Bielecki (1998) estudaram a síntese de oligossacarídeos pela invertase comercial em meio orgânico. Entre os solventes utilizados o que foi melhor para a síntese foi o acetato de butila com 12,1% enquanto que em meio aquoso foi de 1,5% de frutooligossacarídeos.

Shin & Yang (1994) estudaram a produção de galactooligossacarídeos utilizando a enzima β -galactosidase em meio com uma mistura de solvente hidrofóbico e água, o máximo de galactooligossacarídeos, 45%, foi obtido em 95% de ciclohexano e 5% de água,

enquanto que em meio aquoso o máximo foi de 38%. O meio orgânico é responsável por mudar o equilíbrio da reação em direção a hidrólise reversa.

2.4.3. Frutooligossacarídeos

Alguns tipos de microrganismos, por exemplo *Aspergillus spp.*, *Aureobasidium spp.*, *Fusarium sp.*, e *Penicillium sp.*, têm enzimas que produzem frutooligossacarídeos a partir da sacarose (Hayashi *et al.*, 1989). Os frutooligossacarídeos microbianos apresentam o gosto muito similar ao da sacarose e são altamente estáveis em uma faixa de pH para alimentos (4,0 –7,0), (Yun, 1996).

As fibras contribuem para a saúde humana, através da fermentação. Contudo, até o presente, a falta de estudos detalhados sobre a fermentação das fibras torna difícil a comparação com os frutooligossacarídeos, mas ambas são substâncias indigeríveis pelo organismo humano. As vantagens dos frutooligossacarídeos sobre as fibras são: menor requerimento diário de frutooligossacarídeos (3g/dia); não causam diarreia nas doses recomendadas; são totalmente solúveis em água, são mais fáceis de serem incorporados em bebidas e alimentos processados (Tomomatsu, 1994).

Os frutooligossacarídeos são produzidos a partir da sacarose, através da transfrutossilação, catalisada pela β -frutofuranosidase ou pela β -frutotransferase de microrganismos e plantas (Santos, 1998). A β -frutofuranosidase é uma enzima que catalisa a transfrutossilação a partir da sacarose, além de possuir também uma ação hidrolítica. A especificidade do aceptor para a transfrutossilação e as estruturas dos produtos transfrutossilados variam, dependendo da fonte da enzima e das condições de reações. Os doadores e aceptores do grupo frutossila podem ser a sacarose ou outros frutooligossacarídeos, além de outros sacarídeos; sendo essencial que a glicose e a frutose estejam ligadas através de ligações glicosídicas α -1,2 (Contado, 1998).

A formação de frutooligossacarídeos ocorre quando a sacarose (GF) é utilizada como substrato, têm-se como produtos glicose (G) e kestose (GF₂). A sacarose age tanto como doador ou aceptor, assim 1 mol de glicose e 1 mol de kestose são formados simultaneamente, a partir de 2 moles de sacarose: $2GF \rightarrow GF_2 + G$. As reações similares

foram obtidas com outros substratos como: 1-kestose e nistose (GF_3) formando: $2GF_2 \rightarrow GF_3 + GF$ e $2 GF_3 \rightarrow GF_4 + GF_2$, onde GF_4 representa a 1- fructosilnistose (Contado, 1998).

Apesar da reação de transfrutosilação ocorrer em vários microrganismos, esta atividade de transferência é quantitativamente diferente entre as linhagens microbianas. Em geral, as β -frutofuranosidases possuem as atividades de transfrutosilação (U_t) e de hidrólise (U_h). A relação entre U_t / U_h indica a capacidade de transfrutosilação de cada linhagem. Para a produção eficiente de frutooligossacarídeos deve haver uma alta proporção de U_t / U_h e alta atividade enzimática (Contado, 1998).

2.5. Bifidobactérias

A ingestão de oligossacarídeos aumenta a proliferação da *Bifidobacterium bifidum* no intestino (Boon *et al.*, 2000). Bifidobactérias são conhecidas pelo efeito de inibição para muitos organismos patogênicos incluindo *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e outros (Hughes & Hoover, 1991).

Os frutooligossacarídeos, a inulina, a lactose e os galactooligossacarídeos tem mostrado efeito positivo, pois estes prebióticos reduziram a atividade das enzimas microbianas relacionadas na produção de toxinas e conseqüentemente a redução destes metabólitos nas fezes (Tuohy *et al.*, 2003).

Probióticos são definidos como microrganismos viáveis que exibem um efeito benéfico na saúde por melhorarem o balanço microbiano intestinal (Kaur *et al.*, 2002).

Vários compostos tóxicos são produtos de fermentação formados no cólon, como amônia e aminas, nitrosaminas, fenóis e cresóis; estas toxinas metabólicas são formadas por ação de enzimas bacterianas, assim a formação destas enzimas é dependente da bactéria. A ingestão de oligossacarídeos, como prebióticos promove a proliferação de bifidobactérias e redução das bactérias putrefativas, ocasionando a redução de metabólitos tóxicos (Tomomatsu, 1994).

Os frutooligossacarídeos, a inulina, a lactose e os galactooligossacarídeos são prebióticos de eficiência comprovada e são comercialmente disponíveis. Os oligossacarídeos possuem a habilidade de alterar a microflora intestinal (Kaur *et al.*,

2002) em uma composição mais benéfica com o aumento do número de bifidobactérias (Tuohy *et al.*, 2003).

2.6. Catálise Enzimática em Fase Orgânica

A catálise em fase orgânica não somente permite a funcionalidade das enzimas e exibe vantagens em relação a catálise em fase aquosa, tais como: trocas no equilíbrio da reação, redução da inibição devida aos substratos e produtos; menor risco de contaminação microbiana e variação na especificidade de algumas enzimas pelos seus substratos (Illanes & Barberis, 1994).

2.6.1. Escolha do Solvente e Princípios Físico-Químicos dos Sistemas Biocatalíticos em Solventes Orgânicos

Vários fatores devem ser levados em conta na escolha do solvente, primeiro a compatibilidade deste com a reação de interesse e além disso a compatibilidade dos produtos da reação com o solvente, um segundo fator é que o solvente selecionado deve ser inerte a reação (Dordick, 1989).

O grau de miscibilidade do solvente orgânico com a água será decisivo para o sistema de reação. Um sistema de duas fases água e solvente orgânico é geralmente mais promissor que o sistema água/solvente orgânico miscível. No sistema de duas fases a chance de inibição ou desnaturação pelo solvente é menor como resultado da baixa concentração do solvente imiscível na água na fase aquosa (Brink *et al.*, 1988).

Quando a biocatálise ocorre em sistema com pouca água, os solventes orgânicos podem influenciar na atividade e estabilidade das enzimas. A atividade catalítica para a maioria das enzimas nos solventes orgânicos aumenta com o aumento da hidratação da enzima (Mattiasson & Adlercreutz, 1991).

Illanes & Barberis, (1994), estudaram a biocatálise em solventes orgânicos e relacionaram a existência de dois tipos de sistemas de biocatálise em solventes orgânicos: homogêneos e heterogêneos, que apresentam as seguintes características:

- sistemas homogêneos são misturas de água com solventes orgânicos miscíveis.

- sistemas heterogêneos podem ser sistemas entre os quais encontram-se os sistemas de dois líquidos imiscíveis e sistemas sólido-líquido onde a enzima está imobilizada em uma matriz sólida suspensa em um solvente orgânico.
- sistemas miscíveis são formados pela enzima dissolvida na água e em um solvente orgânico miscível. Em geral, os solventes miscíveis com a água interagem com a enzima e provocam uma diminuição da atividade enzimática. As causas que explicam este fenômeno são a capacidade dos solventes hidrofóbicos de solubilizar a camada da água que envolve a enzima. Em alguns casos, foi possível obter altos rendimentos em processos catalíticos com solventes miscíveis e com a vantagem de aumentar a atividade de síntese diante da hidrólise, própria da ação enzimática na fase aquosa.
- sistema bifásico líquido-líquido consta de duas fases macroscópicas formadas pela enzima dissolvida na fase aquosa e o solvente orgânico apolar imiscível. A fase aquosa pode situar-se com uma capa separada em contato com a capa da fase orgânica, ou bem manter-se como uma emulsão dentro do solvente orgânico. Em sistemas bifásicos, a reação enzimática ocorre somente na fase aquosa (com a enzima dissolvida). O substrato encontra-se dissolvido na fase orgânica e parte para a fase aquosa para ser convertido pela enzima em produto.
- sistemas sólido-líquido-líquido são aqueles em que o biocatalisador apresenta-se na forma imobilizada. Depois da enzima ter sido imobilizada, a suspensão aquosa que a contém é colocada no solvente orgânico imiscível para obter um sistema trifásico de reação sólido-líquido-líquido. As suspensões de enzimas imobilizadas suspensas em solventes podem ser consideradas como sistemas bifásicos sólido-líquido, nos quais uma fase é formada pelo solvente orgânico e a outra por uma enzima sólida hidratada, protegida do contato com o solvente por uma capa de proteína.

As propriedades físico-químicas exibidas por uma enzima estão vinculadas a taxa de água nas interações as quais ajudam a manter a conformação da enzima cataliticamente ativa. A enzima requer uma pequena capa hidratante que atua como um tampão entre a superfície da enzima e o meio de reação. Baseado nisto, a biocatálise em fase orgânica é

possível desde que a enzima seja mantida totalmente hidratada e ativa, conservando uma pequena proporção de água no volume de reação, sempre que o meio de reação consistir de um solvente orgânico, para que assim o microambiente da enzima não seja distorcido. Este é o princípio em que se baseia a catálise enzimática em ambientes de baixo conteúdo de água (Illanes & Barberis, 1994).

A natureza do solvente orgânico afeta a catálise enzimática causando inativação da enzima, interagindo com substratos e produtos da reação ou removendo a capa de água que envolve a enzima. Existe um consenso em relação as variáveis que afetam a catálise enzimática na fase orgânica que são a temperatura, pH e a agitação. As enzimas parecem responder sempre com a máxima expressão de sua atividade enzimática quando o microambiente das mesmas é mantido no pH ótimo da catálise em fase aquosa. A velocidade de agitação é um parâmetro que afeta aos distintos sistemas biocatalíticos na fase orgânica. Quando as moléculas da enzima encontram-se solubilizadas na fase aquosa de um sistema bifásico imiscível, uma intensa agitação favorecerá seu transporte à interface onde o contato com o solvente orgânico pode provocar sua inativação. Por outro lado, necessita-se manter agitado o sistema para que se produza a transferência de substratos e produtos entre as fases segundo seus coeficientes de partição (Garibay *et al.*, 1993).

2.6.2. Regras para a Otimização da Biocatálise em Solventes Orgânicos

Regras para a otimização de diferentes sistemas biocatalíticos contendo solventes orgânicos são derivados da combinação de dados da literatura e do logaritmo do coeficiente de partição, $\log P$, como uma medida quantitativa da polaridade do solvente. A biocatálise é baixa em solventes orgânicos com $\log P < 2$, é moderada em solventes que tenham $\log P$ entre 2 e 4, e é alta em solventes apolares que tenham um $\log P > 4$. Os valores do $\log P$ para os compostos são determinados experimentalmente usando como padrão um sistema líquido de duas fases octanol e água (Laane *et al.*, 1987).

Em geral a biocatálise em solvente orgânico baseia-se nas seguintes regras: solventes que tenham um $\log P < 2$ não são adequados aos sistemas biocatalíticos, pois em geral estes distorcem a interação água-biocatálise, desse modo inativando ou desnaturando-a. Para solventes com $\log P$ entre 2 e 4 há uma menor distorção da camada de água e afetando em

menor intensidade a atividade enzimática. Os com $\log P > 4$ não afetam a camada de água deixando a biocatálise em estado ativo (Laane *et al.*, 1987).

2.6.3. Estabilizantes da Atividade Enzimática

Estabilizantes são anti-desnaturantes que evitam a desestabilização da enzima. Estes podem ser os substratos da própria enzima a ser estabilizada. Como as enzimas são arquitetadas naturalmente, para agir sobre o substrato, o qual devem “reconhecer”, compreende-se que este deva ser compatível com a estrutura da enzima. Em concentrações abaixo de 20% os solventes orgânicos também podem estabilizar, enquanto que em concentrações elevadas, geralmente desnaturam (Reguly, 2000).

2.7. Métodos Cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (Collins *et al.*, 1995).

O estado físico da fase móvel separa a cromatografia em três áreas: cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás, cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido e cromatografia supercrítica, onde a fase móvel é um vapor pressurizado (Carvalho, 1993).

A cromatografia de íons é a técnica de separação e quantificação de cátions e ânions, empregando colunas com resinas trocadoras de íons ou seus equivalentes. A detecção é feita por condutibilidade elétrica. Esta técnica permite análise de íons em soluções aquosas, empregando como fase móvel soluções iônicas a um valor de pH especificado para cada caso, pois este é um dos fatores principais para o sucesso do método (Best *et al.*, 1994).

Compostos solúveis em água podem produzir soluções que conduzem ou não a eletricidade. Os compostos que não conduzem eletricidade em soluções diluídas ou concentradas, geralmente podem ser polares ou pouco polares. Compostos como sais,

ácidos, bases orgânicas ou inorgânicas, quando dissolvidas na água ou mesmo em solventes fortemente polares, se solvatam, formando íons que conduzem a corrente elétrica. Os detectores de condutividade elétrica baseiam-se na medida da condutância das soluções eletrolíticas efluentes das colunas analíticas ou supressoras (Ciola, 1998).

Através da amperimetria de pulso os carboidratos podem ser detectados em soluções de pH alto, ou seja pH acima de 11. São facilmente separados utilizando coluna de troca de ânions com uma alta eficiência, são ácidos fracos com constantes de dissociação em torno de 12. O hidróxido de sódio é utilizado com fase móvel com valor de pH de 11 à 14 e para ocorrer a eluição dos oligossacarídeos utiliza-se o acetato de sódio, o pH é mantido servindo como solução tamponante. O acetato de sódio é bastante utilizado pelo aumento da força iônica da fase móvel (Shiomi *et al.*, 1991).

A análise de carboidratos com cromatografia de alta eficiência de troca aniônica – HPAEC é empregada com detector amperimetria pulsada (PAD) que é uma poderosa ferramenta para análise de carboidratos. Este não requer derivatização com pré ou pós coluna e ainda oferece uma alta resolução e sensibilidade (Ciola, 1998).

As maiores vantagens da HPAEC são: a velocidade de análise, por exemplo, a análise de monossacarídeos pode ser realizada dentro de 15 minutos; com uma alta resolução. Esta é utilizada para análises de reações enzimáticas porque: as condições de eluição podem ser ajustadas assim que se tenham os resultados; os quais são obtidos rapidamente; a detecção é sensível e assim consome pequenas quantias de amostra; a condição de eluição, usualmente utilizada, é a alcalina (Lee, 1996).

2.8. Avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e temperatura na reação e estabilidade enzimática

Quando uma reação enzimática começa, nota-se um aumento na concentração do produto e uma diminuição na concentração do substrato até que a reação é completada ou o ponto de equilíbrio é atingido. A mudança inicial nas concentrações do produto ou substrato é a velocidade de reação e é usualmente expressa em Unidades Internacionais (U.I.). Sendo a enzima uma proteína ela tende a perder atividade no tempo, e mais rápida será esta perda quanto maior é a temperatura (Maugeri, 2002).

O módulo da constante cinética K é fortemente dependente da temperatura, influenciando em consequência a atividade enzimática. A constante K, pode ser correlacionada com a temperatura, através da equação de Arrhenius:

$$K(T) = K_0 \exp(-E_a/RT) \quad (2.1)$$

Onde:

K(T) = constante cinética a temperatura T

E_a = energia de ativação

R = constante dos gases ideais (R = 1,9872 cal/(mol.K))

K₀ = constante de proporcionalidade

T = Temperatura absoluta (K)

Verifica-se experimentalmente, que a atividade enzimática não cresce indefinidamente com a temperatura, como prevista pela equação de Arrhenius. A partir de uma determinada temperatura (denominada temperatura ótima), verifica-se um decréscimo na atividade com o aumento de temperatura (Cabral, 1989).

A expressão de Arrhenius se ajusta aos dados experimentais numa ampla faixa de temperatura, sendo sugerida, como uma primeira aproximação para a dependência real da temperatura (Santos, 2002).

A enzima está sujeita à desnaturação, o que implica na perda da atividade. Geralmente esta desnaturação é irreversível, significando perda definitiva do poder catalisador. Esta desnaturação pode ser mais ou menos rápida dependendo das condições do meio. Em relação a temperatura, ela é mais estável quanto mais baixa a temperatura. Por esta razão é aconselhável estocar enzimas em baixas temperaturas. Outros fatores também influem na estabilidade da enzima como pH, concentração de sais, etc. O ideal é se conhecer estas condições de ótima estabilidade não só para o armazenamento do produto, como também minimizar a perda durante um processo (Maugeri, 2002).

A estabilidade térmica é dependente das condições do meio em que se encontra a enzima, se está imobilizada e/ou complexada a outro componente e ainda pode ser influenciada pela própria concentração de substrato (Cabral, 1989).

As enzimas, como qualquer outra proteína sofrem desnaturação térmica, perdendo sua atividade parcialmente ou totalmente. Desta forma, é de grande importância o

conhecimento da estabilidade térmica no projeto de reatores catalíticos (Santos, 2002).

Como toda a reação química, as reações enzimáticas se modificam com a temperatura, ou seja com o aumento da temperatura ocorre o aumento da velocidade de reação em função da maior energia das moléculas, o resultado destas interações é um perfil com uma velocidade máxima a uma temperatura denominada de temperatura ótima e em seguida a desnaturação da enzima. Em relação ao pH, observa-se o mesmo comportamento que a temperatura; este efeito ocorre em função de 3 fenômenos independentes: desnaturação irreversível das enzimas em extremos pH, em função da perda da estrutura pela ruptura; a ionização do substrato ou o estado de ionização da enzima. O pH no qual a enzima atinge a sua máxima atividade às vezes não coincide com o pH em que se observa a sua máxima estabilidade (Munguía & Ramírez, 1987).

Devido ao fato da enzima possuir vários grupos ionizáveis, mudanças no pH afetarão o sítio catalítico e a conformação da enzima. Em geral, enzimas são ativas numa faixa limitada de pH e para cada enzima existe um ótimo ou uma faixa ótima de atuação (Maugeri, 2002).

Existe um determinado valor de pH em que a concentração da forma ativa é máxima, acarretando uma atividade máxima. Este pH de máxima atividade é denominado pH ótimo. De um modo geral, o pH ótimo da invertase de leveduras situa-se entre 4,4 a 5,5 e a temperatura ótima entre 50 e 60°C. Quanto ao pH, nota-se um deslocamento do pH ótimo para a enzima imobilizada, quando comparada a enzima livre (Cabral, 1989).

A enzima, como toda proteína, é composta de vários aminoácidos que possuem grupos laterais básicos, ácidos ou neutros, portanto a enzima pode conter grupos carregados positivamente ou negativamente, a um dado valor de pH. Tais grupos ionizáveis são freqüentemente parte do sítio ativo, já que o mecanismo catalítico ácido-base está ligado a várias enzimas (Contiero, 1992).

Quanto à estabilidade da enzima em relação ao pH, esta é uma informação de grande importância para sua caracterização. Entretanto, a estabilidade da enzima em relação ao pH depende de outros fatores tais como: temperatura, força iônica, concentração de íons metálicos, natureza química do tampão, concentração do substrato e concentração da enzima (Santos, 2002).

3. Material e Métodos

Todas as etapas desenvolvidas neste trabalho estão apresentadas na Figura 3.1.

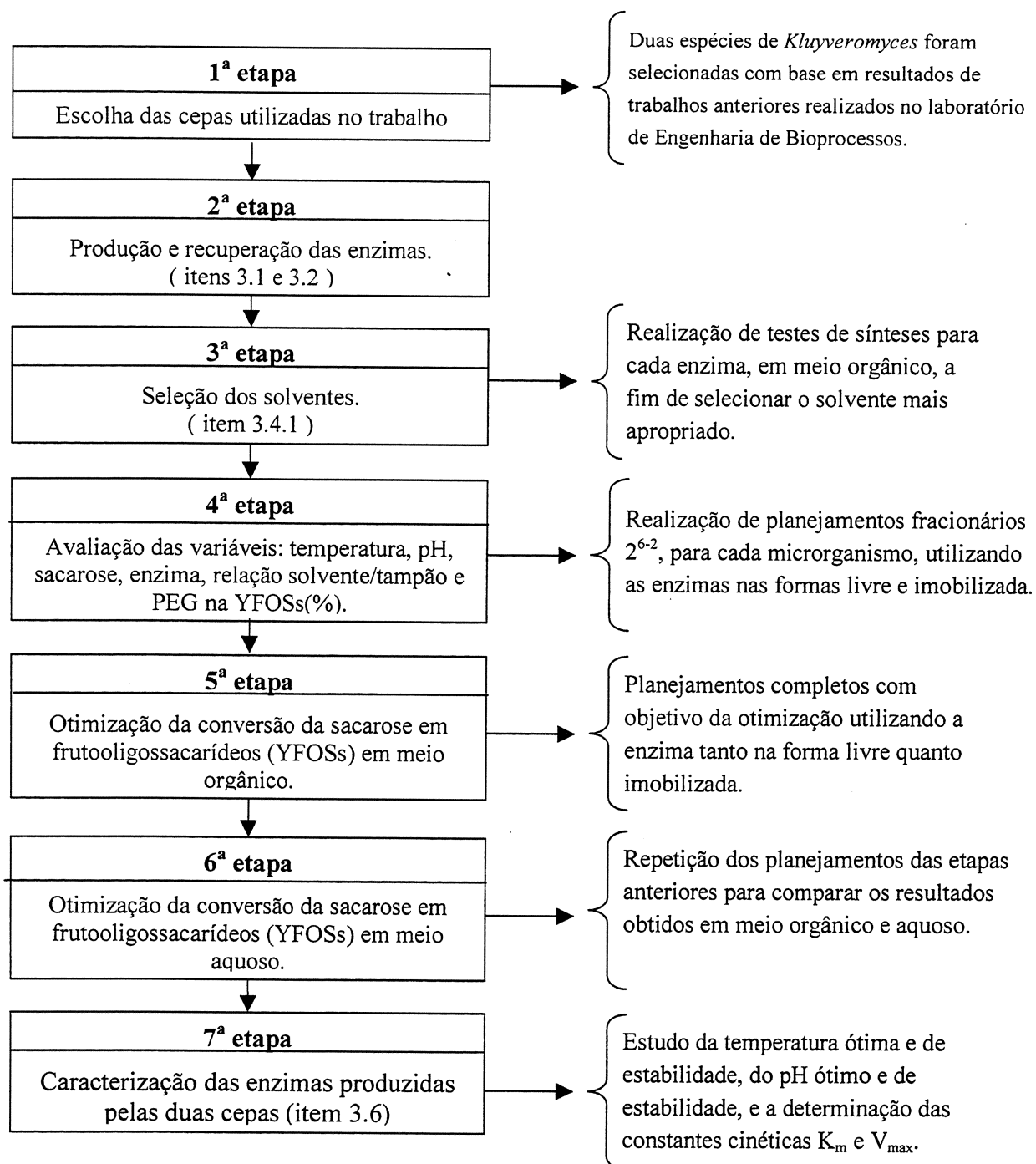


Figura 3.1: Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.

3.1. Produção da Enzima Inulinase

Para a produção da enzima foram selecionadas duas cepas: a ATCC 16045, pois já vem sendo estudada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos - LEB, e a NRRL Y-7571 também foi selecionada pois, segundo Kabke (2002), a produção de inulinase a partir desta linhagem obteve uma alta atividade enzimática de 2660 U/mL. Além disso, estes microrganismos pertencem ao grupo GRAS (Generally Recognized as Safe) e são aceitos pela FDA (Food and Drug Administration, EUA) para usos farmacêuticos e alimentícios.

Para a produção da enzima utilizou-se primeiramente o *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 em frascos agitados durante 72 horas contendo o meio de cultura com 14 g/l de sacarose, 10 g/l de extrato de levedura, 20 g/l de peptona, 1g/l de K_2HPO_4 , com o pH inicial de 3,5, a temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm conforme Kalil *et al.* (2001).

O outro microrganismo utilizado para a produção da enzima foi o *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em frascos agitados durante 72 horas contendo o meio de cultura 14g/l de sacarose, 10g/l de extrato de levedura, 20g/l de peptona e 1g/l de K_2HPO_4 , pH 3,5 e temperatura de 30°C, conforme Makino (2004).

3.2. Recuperação da enzima

Foi feita a recuperação do caldo fermentado com a finalidade de obter a enzima recuperada para utilizá-la na imobilização, no estudo da caracterização e da síntese.

Para viabilizar a separação do sobrenadante realizou-se uma centrifugação por 10 minutos na temperatura de 5°C. Após a centrifugação o precipitado foi descartado e a atividade enzimática do sobrenadante foi determinada.

Para ocorrer a precipitação da enzima adicionou-se etanol até concentração de 70% (v/v), a 4°C ao sobrenadante, mantida uma agitação branda. O etanol foi mantido sob banho de gelo e adicionado numa vazão de 0,8 mL/min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado contendo a enzima foi ressuscitado em tampão fosfato 0,05M a pH 6,0 e determinou-se a atividade enzimática.

3.3. Imobilização da enzima inulinase

Após a obtenção da enzima e sua recuperação, preparou-se uma solução de gel e a solução com a enzima. Para o preparo da solução de gel adicionou-se 16,5 g de água destilada e 0,75g de alginato de sódio, os quais foram aquecidos para a dissolução total do alginato. Em seguida, adicionou-se 12,5g de sacarose.

Depois da dissolução do alginato de sódio e do resfriamento da solução de gel, adicionou-se a solução composta por 5 mL de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75g de carvão ativado (Futagawa, 2002).

Para a formação das esferas, utilizou-se bomba peristáltica para fazer o bombeamento do gel sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 com 3,5% de glutaraldeído a 10°C, sob agitação.

As enzimas imobilizadas foram deixadas em tratamento na geladeira por 24 horas. A seguir, foram lavadas com água destilada, e a sua última lavagem foi realizada em tampão acetato. Em seguida, foram imersas em solução de cloreto de cálcio 0,05 M em tampão acetato, com o objetivo de manter a estrutura das enzimas.

3.4. Síntese dos Oligossacarídeos

Após a recuperação da enzima e imobilização realizou-se a etapa da síntese para a produção dos frutooligossacarídeos que são formados por GF₂ (kestose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1-frutossilnistose). Neste estudo foram utilizados reatores encamisados, onde foram adicionadas a enzima imobilizada ou a livre, a solução de sacarose e o solvente orgânico.

A síntese foi realizada em meio orgânico para verificar se neste meio é possível favorecer a síntese e diminuir a hidrólise.

3.4.1. Seleção dos Solventes para ambas as cepas em função da máxima conversão de frutooligossacarídeos

Os solventes utilizados foram: acetato de butila, acetato de etila, n-heptano, ciclohexano e etanol. O critério para a seleção destes solventes foi baseado primeiramente na toxicidade e em segundo no log P. Assim, segundo Laane *et al.*, (1987), com estes

solventes as três faixas de log P foram abrangidas. Os sistemas formados com os solventes: acetato de etila (log P = 0,68) , acetato de butila (log P = 1,7), ciclohexano (log P = 3,2) e n-heptano (log P = 4,0) foram sistemas bifásicos, enquanto o sistema formado com o etanol (log P = -0,24) foi monofásico.

Foram realizadas sínteses com estes solventes e a partir dos resultados foi possível selecionar o solvente mais apropriado para a produção dos frutooligossacarídeos.

3.4.2. Otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos para a cepa *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045

3.4.2.1. Síntese em meio orgânico para a enzima livre

Inicialmente foi realizado para cada uma das linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes, totalizando 19 ensaios, onde as variáveis independentes foram temperatura, pH, porcentagem de sacarose, enzima, relação solvente/tampão e PEG, e estas foram estudadas nos níveis -1, +1 e 0, obtendo-se como resposta a máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs (%) e a produtividade (g/(L.h)).

Na tabela 4.1 pode-se visualizar a matriz do planejamento fatorial 2^{6-2} com três repetições no ponto central, totalizando 19 ensaios. Os valores codificados da quinta variável (relação solvente/tampão) foram obtidos da multiplicação dos sinais de três colunas (5 = 1.2.3), e a sexta variável (PEG) é resultado da multiplicação dos sinais de outras três colunas (6 = 2.3.4) resultando em um planejamento de resolução IV. Este tipo de planejamento é excelente para uma avaliação prévia das variáveis estudadas e seus efeitos nas respostas desejadas, já que os efeitos de 1ª ordem misturam-se apenas com os de 3ª e 5ª ordem (de interesse prático irrelevante). Observa-se uma drástica redução no número de ensaios, que no caso de um esquema fatorial completo, seria igual a 64 ensaios.

Os cálculos para verificar o efeito das variáveis nas respostas YFOSs e na produtividade foram realizados com o auxílio do programa computacional Statistica versão 5.5 (Microsoft, 1995).

Em seguida com base nesses efeitos, foram realizados planejamentos fatoriais

completos em função da avaliação das variáveis estatisticamente significativas.

O solvente escolhido foi o acetato de butila o qual formou um sistema bifásico com o tampão, tanto o substrato quanto o produto se encontravam na fase aquosa do sistema. Este solvente, que foi selecionado anteriormente, foi utilizado em todas as etapas do trabalho.

Realizou-se primeiramente um planejamento fatorial fracionado envolvendo 6 variáveis, obtendo-se como resposta a máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos. Sendo que YFOSs foi definido como a máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos durante cada cinética de 12 horas que representa cada ensaio do planejamento. As variáveis independentes foram: temperatura, pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume total), enzima (U/mL) em relação ao volume total, relação solvente/tampão e o estabilizante PEG (polietileno glicol) (em porcentagem).

O PEG foi incluído no estudo a fim de verificar se este tinha alguma influência na proteção da enzima do solvente orgânico.

A Tabela 3.1 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado. As matrizes dos planejamentos experimentais e as respostas obtidas para cada ensaio estão apresentadas no capítulo de resultados.

Tabela 3.1: Valores utilizados no 1º planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} em sistema orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	30	50	40
pH (tampão fosfato)	5	7	6
Sacarose (%)	40	50	45
Enzima (U/mL)	4	8	6
Relação solvente/tampão (%)	25/75	50/50	40/60
PEG (%)	0	4	2

* Ponto Central

Após a análise dos efeitos das variáveis deste 1º planejamento fatorial fracionado foi possível selecionar 4 variáveis. Assim, foram realizados mais dois planejamentos fatoriais fracionados (2^{4-1} com 3 repetições no ponto central) com o intuito de verificar o efeito da temperatura, pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e relação

solvente/tampão na máxima YFOSs. A enzima foi fixada em 4U/mL e o PEG foi retirado da reação pois o nível -1 estudado foi de zero por cento de PEG.

A Tabela 3.2 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado para o 2º planejamento fracionado.

Tabela 3.2: Valores utilizados no 2º planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} em meio orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	40	60	50
pH (tampão acetato)	3,8	5,8	4,8
Sacarose (%)	30	50	40
Relação solvente/tampão (%)	0/100	25/75	14/86

*Ponto Central

Realizou-se um outro planejamento fatorial fracionado para continuar o estudo das quatro variáveis (temperatura, pH, sacarose e relação solvente/tampão), enquanto que a enzima e o PEG já tinham sido fixados anteriormente.

A Tabela 3.3 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado para o 3º planejamento fracionado.

Tabela 3.3: Valores utilizados no 3º planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} em meio orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	40	50	45
pH (tampão fosfato)	5,0	6,5	5,7
Sacarose (%)	50	80	65
Relação solvente/tampão (%)	0/100	25/75	14/86

*Ponto Central

As variáveis pH e porcentagem de sacarose foram selecionadas para a realização de um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) visando otimizar YFOSs. Foram fixadas a temperatura em 45°C, a relação solvente/tampão em 25/75 (%) e 4,0U/mL de enzima em relação ao volume da fase aquosa.

A Tabela 3.4 apresenta os valores decodificados de cada nível utilizado.

Tabela 3.4: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio orgânico e enzima livre (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	+1	+1,41	0*
pH (tampão fosfato)	5,0	5,2	6,3	6,5	5,75
Sacarose (%)	40	44,3	65,6	70	55

*Ponto Central

3.4.2.2. Síntese em meio aquoso para a enzima livre

Visando comparar e otimizar a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos em meio orgânico e aquoso, realizou-se um planejamento completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) em meio aquoso utilizando como variáveis pH e porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa). A temperatura utilizada foi de 45°C e 4U/mL de enzima.

A Tabela 3.5 apresenta os valores reais de cada nível utilizado.

Tabela 3.5: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio aquoso e enzima livre (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes/Níveis	-1,41	-1	+1	+1,41	0*
pH	5,0	5,2	6,3	6,5	5,75
Sacarose (%)	40	44,3	65,6	70	55

*Ponto Central

Realizaram-se sínteses em triplicata fixando as condições de 45°C de temperatura, 4U/mL de enzima em relação a fase aquosa, 45% de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e variando o pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0.

3.4.2.3. Síntese em meio orgânico para a enzima imobilizada

Foi realizado primeiramente um planejamento fatorial fracionado envolvendo 6 variáveis, obtendo-se como resposta a máxima conversão de sacarose em frutooligossacarídeos e a produtividade. As variáveis independentes foram: temperatura, pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa), enzima(U/mL), a

relação solvente/tampão e o estabilizante PEG (polietileno glicol) em porcentagem.

A Tabela 3.6 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado.

Tabela 3.6: Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} em meio orgânico e enzima imobilizada (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	30	50	40
pH (tampão fosfato)	5	7	6
Sacarose (%)	50	70	60
Enzima (U/mL)	4	6	5
Relação solvente/tampão (%)	25/75	50/50	40/60
PEG (%)	0	4	2

*Ponto Central

Após a análise dos efeitos das variáveis deste primeiro planejamento fatorial fracionado foi possível selecionar 4 variáveis. Assim, realizou-se um planejamento fatorial fracionado (2^{4-1} com 3 repetições no ponto central) com o intuito de verificar o efeito do pH, da porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa), da relação solvente/tampão e da enzima na YFOSs e na produtividade. A temperatura foi fixada em 40°C e o PEG foi retirado da reação enzimática.

A Tabela 3.7 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado para o segundo planejamento.

Tabela 3.7: Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} em meio orgânico e enzima imobilizada (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
pH (tampão acetato)	4	6	5
Sacarose (%)	50	80	65
Enzima (U/mL)	4	6	5
Relação solvente/tampão (%)	25/75	75/25	62/38

*Ponto Central

Após a análise dos efeitos das variáveis na resposta YFOSs verificou-se que a única variável estatisticamente significativa foi a relação solvente/tampão. Por isso, realizaram-se sínteses em triplicata, fixando as condições 50% de sacarose (em relação ao volume da

fase aquosa), pH 4 (tampão acetato), 4 U/mL de enzima, 40°C de temperatura e variando-se a relação solvente/tampão em 60/40; 70/30; 80/20 e 90/10.

3.4.2.4. Síntese em meio aquoso para a enzima imobilizada

Visando comparar e otimizar a YFOSs em meio orgânico e aquoso, realizou-se um planejamento completo (2³ ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) em meio aquoso utilizando como variáveis pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e enzima. A temperatura utilizada foi de 40°C.

A Tabela 3.8 apresenta os valores reais de cada nível utilizado.

Tabela 3.8: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio aquoso e enzima imobilizada (Cepa ATCC 16045)

Variáveis Independentes / Níveis	-1,68	-1	+1	+1,68	0*
pH	3,3	4,0	6,0	-	5,0
Sacarose(%)	40	50	80	90	65
Enzima (U/mL)	3,3	4,0	6,0	6,7	5,0

*Ponto Central

Realizaram-se sínteses em triplicata, fixando as condições de 40°C de temperatura, pH 5,5 (tampão acetato), 3,3 U/mL de enzima e variando a concentração de sacarose 40, 65 e 90% (em relação ao volume da fase aquosa).

3.4.3. Otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos para a cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

O mesmo procedimento experimental utilizado para a cepa ATCC 16045 na etapa de seleção dos solventes foi utilizado para esta linhagem de *Kluyveromyces* visando a otimização de YFOSs nas diversas condições estudadas (livre e imobilizada em sistema orgânico e aquoso).

3.4.3.1. Síntese em meio orgânico para a enzima livre

Foi realizado primeiramente um planejamento fatorial fracionado envolvendo 6

variáveis (2^{6-2} com 3 repetições no ponto central), obtendo-se como resposta a máxima conversão de sacarose em frutooligossacarídeos e a produtividade. As variáveis independentes foram: temperatura, pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa), enzima (U/mL) em relação a fase aquosa, a relação solvente/tampão e o estabilizante PEG (polietileno glicol) em porcentagem.

A Tabela 3.9 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado.

Tabela 3.9: Valores utilizados no 1º planejamento fatorial fracionado para o estudo da síntese em meio orgânico e enzima livre (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	30	50	40
pH (tampão fosfato)	5	7	6
Sacarose (%)	50	70	60
Enzima (U/mL)	4	8	6
Relação solvente/tampão (%)	25/75	50/50	40/60
PEG (%)	0	4	2

*Ponto Central

Após a análise dos efeitos das variáveis deste primeiro planejamento fatorial fracionado foi possível selecionar 4 variáveis. Assim, realizou-se um planejamento fatorial fracionado (2^{4-1} com 3 repetições no ponto central) para as variáveis temperatura, pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e a enzima (em relação a fase aquosa) na YFOSS e na produtividade sendo que o PEG foi retirado da reação e a relação solvente/tampão foi fixada em 25/75(%).

A Tabela 3.10 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado para o segundo planejamento.

Tabela 3.10: Valores utilizados no 2º planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) em meio orgânico e enzima livre (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	30	50	40
pH (tampão acetato)	4	6	5
Sacarose (%)	40	60	50
Enzima (U/mL)	4	8	6

*Ponto Central

Após a análise dos efeitos das variáveis nas respostas YFOSs e produtividade foi possível selecionar duas variáveis. Assim, realizou-se um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes). A temperatura foi fixada em 40°C, a enzima em 4U/mL (em relação a fase aquosa) e a relação solvente/tampão em 25/75%.

A Tabela 3.11 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado para o terceiro planejamento.

Tabela 3.11: Valores utilizados no planejamento fatorial completo em meio orgânico e enzima livre (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes/Níveis	-1,41	-1	+1	+1,41	0*
pH	4,0	4,3	5,7	6,0	5,0
Sacarose(%)	40	44,3	65,6	70	55

*Ponto Central

Realizaram-se sínteses em triplicata fixando as condições de 40°C de temperatura, 4U/mL de enzima (em relação a fase aquosa), 25/75% de relação solvente/tampão, 55% de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e variando o pH 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5.

3.4.3.2. Síntese em meio aquoso para a enzima livre

Visando comparar e otimizar a YFOSs em meio orgânico e aquoso, realizou-se um planejamento completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) em meio aquoso utilizando como variáveis pH e porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa). A temperatura utilizada foi de 40°C e 4U/mL de enzima (em relação a fase aquosa).

A Tabela 3.12 apresenta os valores reais de cada nível utilizado.

Tabela 3.12: Valores utilizados no planejamento fatorial completo para a enzima livre em sistema aquoso (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	+1	+1,41	0*
pH	4,0	4,3	5,7	6,0	5,0
Sacarose (%)	40	44,3	65,6	70	55

*Ponto Central

Realizaram-se sínteses em triplicata fixando as condições de 40°C de temperatura, 4U/mL de enzima (em relação a fase aquosa), pH 5,0 e variando a concentração de sacarose de 55 e 65% (em relação ao volume da fase aquosa).

3.4.3.3. Síntese em meio orgânico para a enzima imobilizada

Foi realizado um planejamento fatorial fracionado envolvendo 6 variáveis (2^{6-2} com 3 repetições no ponto central), obtendo-se como resposta a máxima conversão de sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e a produtividade. As variáveis independentes foram: temperatura, pH, porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa), enzima (U/mL), a relação solvente/tampão e o estabilizante PEG (polietileno glicol) em porcentagem.

A Tabela 3.13 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado.

Tabela 3.13: Valores utilizados no 1º planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} em meio orgânico para a enzima imobilizada (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes / Níveis	-1	+1	0*
Temperatura (°C)	30	50	40
pH (tampão fosfato)	5	7	6
Sacarose (%)	50	70	60
Enzima (U/mL)	4	6	5
Relação solvente/tampão (%)	25/75	50/50	40/60
PEG (%)	0	4	2

*Ponto Central

Após a análise dos efeitos das variáveis deste primeiro planejamento fatorial fracionado foi possível selecionar 2 variáveis para a realização de um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) com o intuito de verificar o efeito da porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e da atividade enzimática na YFOSs e na produtividade. A temperatura 40°C, relação solvente/tampão de 25/75%, pH 5,0 e o PEG foi retirado da reação.

A Tabela 3.14 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado para o segundo planejamento.

Tabela 3.14: Valores utilizados no planejamento fatorial completo para a enzima imobilizada em meio orgânico (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	+1	+1,41	0*
Sacarose (%)	40	45,8	74,2	80	60
Enzima (U/mL)	4,0	4,4	6,5	7,0	5,5

*Ponto Central

Realizaram-se sínteses em triplicata fixando as condições de 40°C de temperatura, 5,5U/mL enzima, relação solvente/tampão de 25/75%, pH 5,0 e variando a sacarose 40, 60 e 80% (em relação ao volume da fase aquosa).

3.4.3.4. Síntese em meio aquoso para a enzima imobilizada

Visando comparar e otimizar a YFOSs em meio orgânico e aquoso, realizou-se um planejamento completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) em meio aquoso utilizando como variáveis porcentagem de sacarose (em relação ao volume da fase aquosa) e enzima. A temperatura utilizada foi de 40°C e pH 5,0.

A Tabela 3.15 apresenta os valores reais de cada nível utilizado.

Tabela 3.15: Valores utilizados no planejamento fatorial completo para a enzima em sistema aquoso e imobilizada (NRRL Y-7571)

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	+1	+1,41	0*
Sacarose (%)	40	45,8	74,2	80	60
Enzima (U/mL)	4,0	4,4	6,5	7,0	5,5

*Ponto Central

Realizaram-se sínteses em triplicata fixando as condições de 40°C de temperatura, 5,5U/mL de enzima, pH 5,0 e variando a sacarose 40; 60 e 80%. Além disso, realizaram-se outras sínteses fixando as condições de 40°C de temperatura, 60% de sacarose, pH 5,0 e variando a enzima 4,0; 5,5 e 7,0.

3.5. Análise Cromatográfica

Foi feita através de um sistema HPLC-PAD (DIONEX) com detector eletroquímico ED40, sistema de bombas GP50, detector de pulso amperométrico: eletrodo de ouro, software para aquisição e processamento de dados, pré-coluna e coluna carbopac PA100. A pré-coluna e a coluna foram conectadas em série seguindo as condições padrão de uso.

O critério para análise dos açúcares em HPLC-PAD é a solubilidade da fase móvel. A fase móvel utilizada foi NaOH 50 mM, acetato de sódio 500 mM em NaOH 50 mM. A fase móvel foi desgaseificada durante 5 minutos com nitrogênio. O fluxo do eluente 1 mL/min.

3.5.1. Identificação e Quantificação das Amostras

As amostras foram retiradas em vários intervalos de tempo, estas foram diluídas convenientemente, para ficar numa faixa de concentração de 10-100 mg/L, para assim serem identificadas e quantificadas através de um sistema de cromatografia de íons (HPLC-PAD), este é empregado com detector amperimetria pulsada (PAD).

Utilizou-se método desenvolvido por Santos (2002) para a identificação e quantificação dos frutooligossacarídeos. Foi construída a curva de calibração e para a construção desta curva foram preparadas soluções padrões de: kestose, nistose e frutossilnistose adquiridos pela companhia japonesa Wako Dako Industries, Ltd. e glicose, frutose e sacarose da Merck. Utilizando o software PEAKNET de aquisição de dados obteve-se a curva padrão para quantificação das amostras.

3.6. Caracterização da Inulinase Livre e Imobilizada

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática e na estabilidade térmica, a enzima foi mantida em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 na presença de três porcentagens de solvente acetato de butila (25, 50 e 70%). Enquanto que para o estudo de pH ótimo variou-se o tampão. Foram estudados dois tipos de tampões o acetato de sódio 0,1M e o fosfato de sódio 0,05M. Para o pH de estabilidade foi escolhido o tampão que melhores resultados apresentou no estudo do pH ótimo.

3.6.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A enzima livre e imobilizada, produzida pelas duas cepas *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 e *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, foi incubada em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 na presença de três porcentagens de solvente acetato de butila 25, 50 e 70%, a diferentes temperaturas (30 – 70°C) determinando-se a atividade enzimática.

3.6.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da inulinase livre e imobilizada foi testada incubando a enzima em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 na presença de três porcentagens de solvente acetato de butila 25, 50 e 70%, em diferentes temperaturas (50 – 65°C). As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo, para as medidas. O estudo foi interrompido quando foi verificada a perda de mais de 50% da sua atividade enzimática inicial. A partir dos valores obtidos pode-se calcular as constantes de desativação térmica, a meia-vida e a energia de desnaturação térmica para as diferentes temperaturas.

Graficando-se $\ln v/v_0$ em função do tempo determina-se o valor de K_d , para cada temperatura. Sendo K_d (constante de desativação da enzima) função da temperatura segundo a equação de Arrhenius de forma que pode-se determinar a E_d (energia de ativação para reação de desativação). Para a determinação de E_d , grafica-se $\ln K_d \times 1/T$ (K), obtendo-se uma reta correspondente à equação de Arrhenius:

$$\ln K_d = \ln K - \frac{E_d}{RT} \quad (3.1)$$

Sendo:

K_d = constante de desativação da enzima

K = constante de proporcionalidade

E_d = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (1,987cal/(mol.K))

T = temperatura absoluta (K)

Costuma-se expressar a estabilidade térmica em termos de meia vida, a qual é

definida como sendo o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja $v/v_0 = 0,5$.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pode ser relacionado a constante de desativação K_d , através da equação abaixo:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (3.2)$$

3.6.3. Efeito do pH na atividade enzimática

A enzima livre e imobilizada, produzida pelas duas cepas, foi incubada em diferentes tampões: acetato de sódio 0,1M pH (3,6 – 5,6) e fosfato de sódio 0,05M pH (5,0- 8,0), na presença de três porcentagens de solvente acetato de butila 25, 50 e 70% a 50°C. Em seguida determinou-se a atividade enzimática pelo método DNS.

3.6.4. Estabilidade com o pH

A estabilidade da inulinase livre e imobilizada foi testada incubando a enzima no tampão selecionado, a partir do estudo do efeito do pH na atividade enzimática, na presença das três porcentagens de solvente, durante um período de 24 horas a 50°C, determinando-se as atividades enzimáticas de tempos em tempos pelo método DNS, com tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 a 50°C.

3.6.5. Determinação de K_m e V_{max}

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , na presença das três porcentagens de solvente, foram realizadas medindo-se a atividade enzimática em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 em diferentes concentrações de sacarose. As concentrações (g/L) de sacarose utilizadas foram: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35.

3.7. Métodos Analíticos

3.7.1. Determinação de atividade enzimática para enzima livre

A determinação de atividade foi realizada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. O método consistiu na utilização de um mini-reator encamisado sob agitação e controle da temperatura a 50°C, utilizou-se para isso um banho termostatzado Tecnal TE-184.

Ao reator foram adicionados 9 mL de solução de sacarose 2% em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 e 1mL de solução enzimática convenientemente diluída. Foram retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos de tempo 2, 4, 6, 8 e 10 minutos e determinou-se a concentração de açúcares redutores pelo método do DNS.

3.7.2. Determinação de atividade enzimática para enzima imobilizada

Ao reator foram adicionados 9 mL de solução de sacarose 2% em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 e 1mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1mL de água). Foram retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos de tempo 5, 10, 15, 20 e 25 minutos e determinou-se a concentração de açúcares redutores pelo método do DNS.

Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima liberar 1 μ mol/mL de frutose por minuto.

3.7.3. Açúcares Redutores Totais

A análise de açúcares redutores totais foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), modificado por Costa (1986).

4. Resultados da Otimização da Conversão da Sacarose em Frutooligossacarídeos

4.1. Seleção dos solventes

As sínteses foram realizadas por 24 horas em reatores encamisados, e em cada uma foi utilizada 60% de sacarose, 5,0 U/ml de enzima, 40% de solvente orgânico e temperatura de 50°C.

Cepa Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus ATCC 16045

A partir dos resultados pode-se escolher o solvente acetato de butila ($C_6H_{12}O_2$), pois foi o que apresentou maior conversão da sacarose em frutooligossacarídeos, 3,9% na 8ª hora de síntese, enquanto que com o ciclohexano foi de 3,1% na 7ª hora, com o n-heptano foi de 2,9% na 6ª hora, com o acetato de etila foi de 2,6% na 8ª hora de síntese e com o etanol foi de 0,2% na 7ª hora, indicando a inativação da enzima conforme pode ser observado na Figura 4.1.

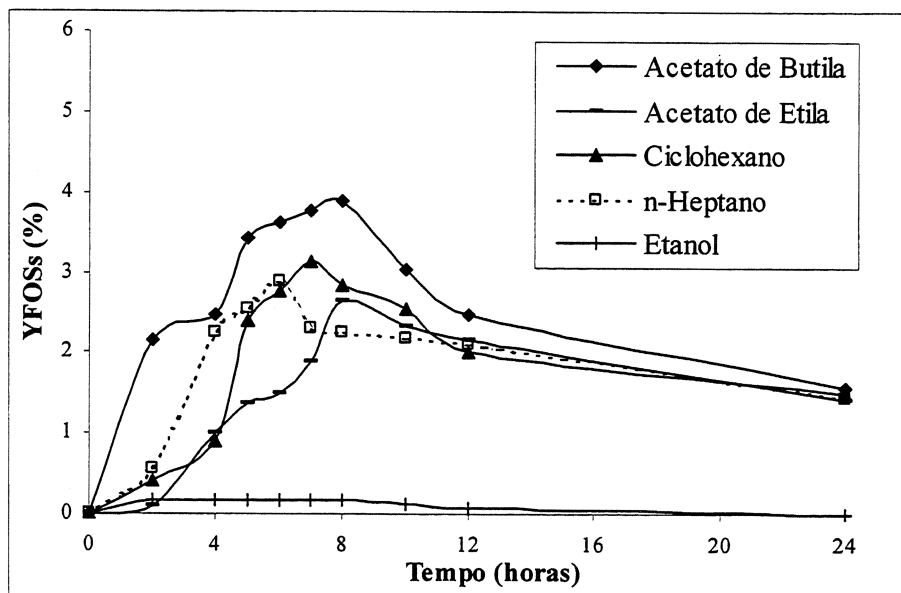


Figura 4.1: Conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) em meio orgânico utilizando ciclohexano, acetato de etila, acetato de butila, n-heptano e etanol (Sistema Orgânico com Enzima Livre - Cepa 16045).

Cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

A partir dos resultados pode-se escolher o solvente acetato de butila ($C_6H_{12}O_2$), pois foi o que apresentou maior conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) de 6,5%, enquanto que o acetato de etila foi de 5,2%, o ciclohexano foi de 4,4% e o n-heptano de 4,9% conforme na Figura 4.2 .

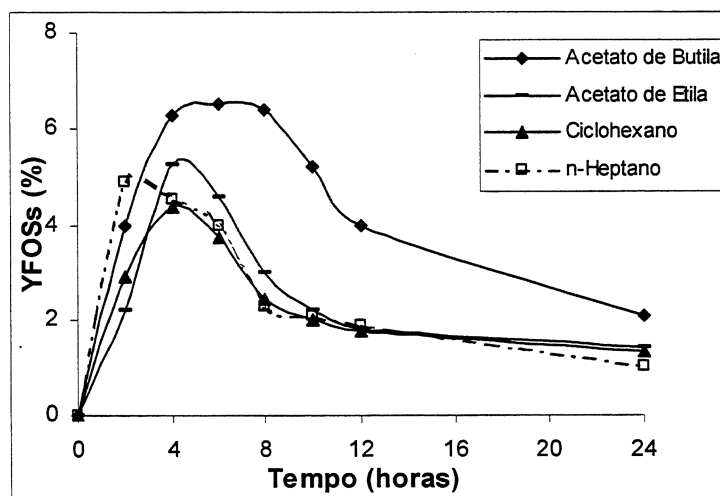


Figura 4.2: Conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs em meio orgânico utilizando ciclohexano, acetato de etila, acetato de butila e n-heptano (Sistema Orgânico com Enzima Livre - Cepa 7571).

4.2. Otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos

4.2.1. Cepa *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045

4.2.1.1. Sistema Orgânico com Enzima Livre

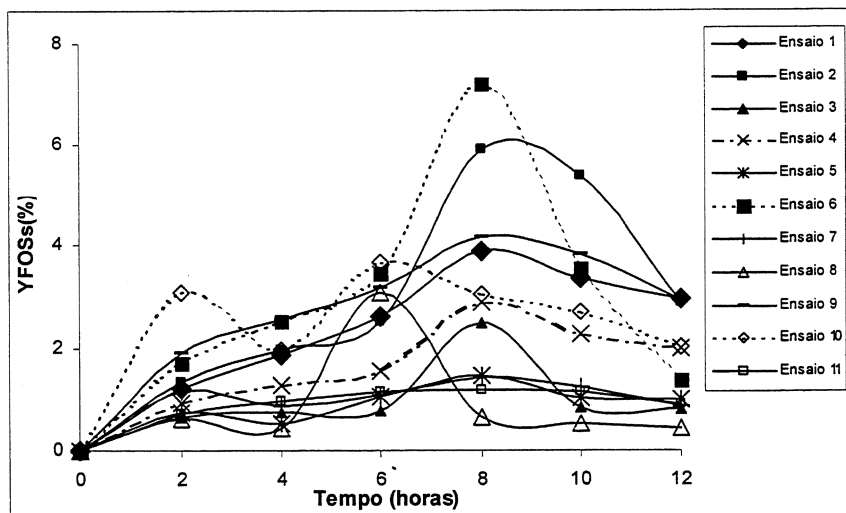
Utilizando o solvente acetato de butila, o qual foi selecionado nos testes preliminares, foi realizado o primeiro planejamento que foi um fracionário para avaliar o efeito das 6 variáveis (temperatura, pH, porcentagem de sacarose, enzima (U/mL), a relação solvente/tampão (em porcentagem) e o estabilizante PEG (polietileno glicol) em porcentagem. A resposta avaliada foi definida como a máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs (%).

Através dos 19 ensaios realizados observa-se que a conversão variou de 1,0% a 7,2% de acordo com as condições da síntese, isto mostra a importância de estabelecer condições adequadas na síntese de frutooligossacarídeos. Os melhores resultados atingidos foram nos ensaios 2 e 6, com temperatura de 50°C, pH igual a 5, enzima de 4 U/mL, porcentagem de sacarose em relação ao volume total (fase aquosa + fase orgânica) do reator no ensaio 2 foi de 40% e no 6 de 50%, relação solvente/ tampão (em porcentagem) no ensaio 2 de 50/50 e no 6 de 25/75 e porcentagem de PEG no ensaio 2 de 0% e no 6 de 4%. A Tabela 4.1 apresenta a matriz do planejamento 2^{6-2} com a resposta YFOSs.

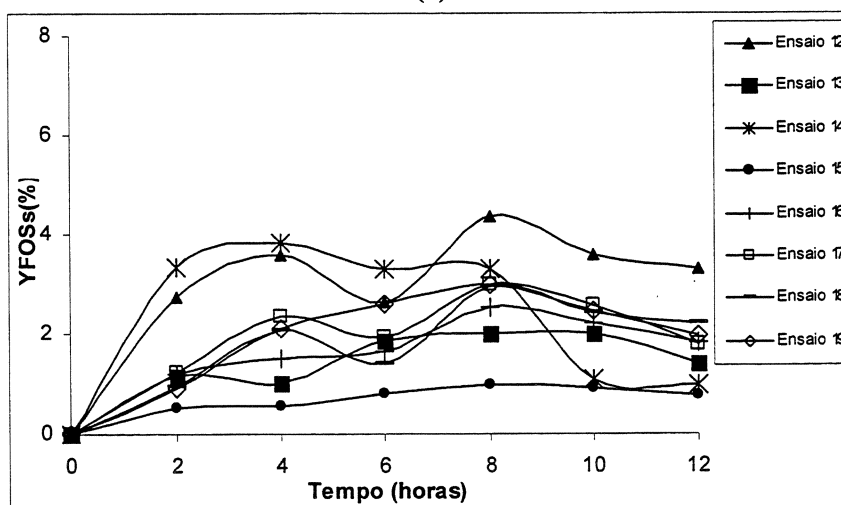
Tabela 4.1: Matriz do planejamento experimental 2^{6-2} e a resposta YFOSs (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)

Ensaio	T (°C)	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	Solvente/ Tampão	PEG (%)	YFOSs (%)
1	30 (-1)	5(-1)	40(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	3,8
2	50(+1)	5(-1)	40(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	5,8
3	30 (-1)	7(1)	40(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	2,5
4	50(+1)	7(1)	40(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	2,8
5	30(-1)	5(-1)	50(1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	1,4
6	50(+1)	5(-1)	50(1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	7,2
7	30(-1)	7(1)	50(1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	1,4
8	50(+1)	7(1)	50(1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	3,0
9	30(-1)	5(-1)	40(-1)	8 (1)	25/75(-1)	4(+1)	4,1
10	50(+1)	5(-1)	40(-1)	8 (1)	50/50(+1)	4(+1)	3,6
11	30(-1)	7(1)	40(-1)	8 (1)	50/50(+1)	0(-1)	1,1
12	50(+1)	7(1)	40(-1)	8 (1)	25/75(-1)	0(-1)	4,3
13	30(-1)	5(-1)	50(1)	8 (1)	50/50(+1)	0(-1)	2,0
14	50(+1)	5(-1)	50(1)	8 (1)	25/75(-1)	0(-1)	3,8
15	30(-1)	7(1)	50(1)	8 (1)	25/75(-1)	4(+1)	1,0
16	50(+1)	7(1)	50(1)	8 (1)	50/50(+1)	4(+1)	2,5
17	40(0)	6(0)	45(0)	6 (0)	40/60(0)	2(0)	2,97
18	40(0)	6(0)	45(0)	6 (0)	40/60(0)	2(0)	2,96
19	40(0)	6(0)	45(0)	6 (0)	40/60(0)	2(0)	2,98

A Figura 4.3 (a e b) permite uma melhor visualização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese nos 19 ensaios do planejamento fatorial.



(a)



(b)

Figura 4.3: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 11 (a) e os ensaios de 12 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).

A Tabela 4.2 apresenta os efeitos das variáveis, sendo que as 6 variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a conversão. A temperatura foi o efeito mais significativo estatisticamente e além disso foi o único efeito positivo, mostrando que um incremento na temperatura (30°C para 50°C) conduziu a uma maior conversão em frutooligossacarídeos.

As outras cinco variáveis apresentaram efeitos negativos na conversão em frutooligossacarídeos. O efeito do PEG foi muito baixo indicando que não há necessidade de ser colocado na reação enzimática já que a faixa estudada foi de zero a 4 por cento. Assim pode-se verificar que o PEG não teve nenhuma influência na proteção da enzima do solvente orgânico.

O pH, a sacarose e a relação solvente/tampão apresentaram efeitos negativos, ou seja um incremento nestas 3 variáveis levaram a um decréscimo na conversão, por isso suas faixas foram mantidas em valores menores no próximo planejamento.

A atividade enzimática mais adequada para a síntese indicou que deve ser fixada no menor valor, 4 U/mL nos ensaios posteriores. Valores superiores não mostraram incremento na conversão.

A temperatura, o pH, a porcentagem de sacarose e a relação solvente/tampão foram selecionadas e estudadas utilizando um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central.

Tabela 4.2: Estimativa dos efeitos para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (Sistema orgânico com enzima livre - Cepa 16045)

	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média	3,15	0,002	1374,43	0,000001	3,14	3,16
Temperatura (°C)*	1,96	0,005	393,50	0,000006	1,94	1,98
pH*	-1,64	0,005	-328,50	0,000009	-1,66	-1,62
Sacarose (%)*	-0,74	0,005	-148,00	0,000046	-0,76	-0,72
Enzima (U/mL)*	-0,70	0,005	-140,50	0,000051	-0,72	-0,68
Solvente/Tampão(%)*	-0,80	0,005	-161,00	0,000039	-0,82	-0,78
PEG (%)*	-0,03	0,005	-7,00	0,019804	-0,05	-0,01

*fatores estatisticamente significativos

Resultados do Segundo Planejamento Fatorial

Os resultados deste planejamento mostraram que a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos foi abaixo dos valores obtidos no primeiro planejamento. Isto por causa da mudança do tampão de fosfato para o acetato. No entanto, foi útil para melhor

definir o procedimento de síntese. A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento 2^{4-1} com a resposta YFOSs.

Tabela 4.3: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)

Ensaio	T (°C)	pH	Sacarose (%)	Solvente/Tampão (%)	YFOSs (%)
1	40(-1)	3,8(-1)	30(-1)	0/100(-1)	2,5
2	60(+1)	3,8(-1)	30(-1)	25/75(+1)	2,0
3	40(-1)	5,8(+1)	30(-1)	25/75(+1)	3,3
4	60(+1)	5,8(+1)	30(-1)	0/100(-1)	2,8
5	40(-1)	3,8(-1)	50(+1)	25/75(+1)	2,8
6	60(+1)	3,8(-1)	50(+1)	0/100(-1)	3,0
7	40(-1)	5,8(+1)	50(+1)	0/100(-1)	4,3
8	60(+1)	5,8(+1)	50(+1)	25/75(+1)	2,8
9	50(0)	4,8(0)	40(0)	14/86(0)	2,6
10	50(0)	4,8(0)	40(0)	14/86(0)	2,7
11	50(0)	4,8(0)	40(0)	14/86(0)	2,5

A Figura 4.4 permite uma melhor visualização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial.

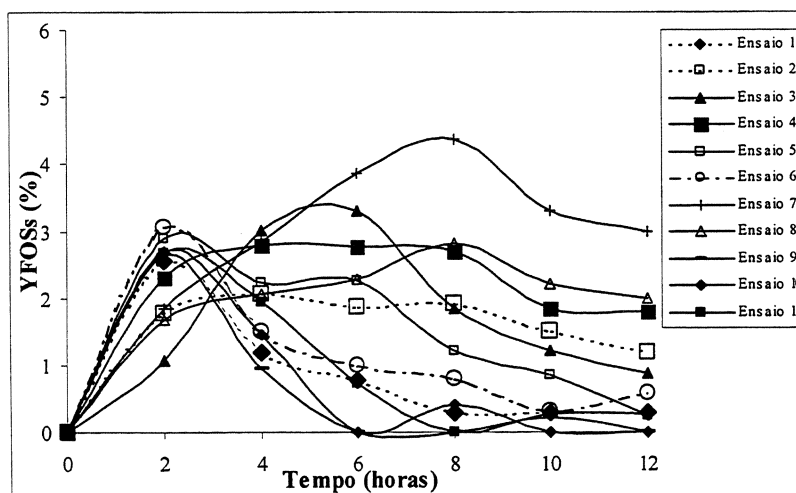


Figura 4.4: Acompanhamento da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do segundo planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).

Resultados do Terceiro Planejamento Fatorial

Os melhores resultados de YFOSs atingidos ocorreram nos ensaios 1 a 4, com temperatura de 40°C e 50°C, pH igual a 5,0 e 6,5, sacarose em 50% e a relação solvente/tampão foi de 0/100 e 25/75. A Tabela 4.4 apresenta a matriz do planejamento 2⁴⁻¹ com as respostas YFOSs e produtividade.

Tabela 4.4: Matriz do planejamento experimental 2⁴⁻¹ e resultados de YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)

Ensaio	T (°C)	pH	Sacarose (%)	Solvente/Tampão (%)	YFOSs (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	40(-1)	5,0(-1)	50(-1)	0/100(-1)	11,0	6,2
2	50(+1)	5,0(-1)	50(-1)	25/75(+1)	10,2	12,5
3	40(-1)	6,5(+1)	50(-1)	25/75(+1)	10,2	5,8
4	50(+1)	6,5(+1)	50(-1)	0/100(-1)	10,4	5,8
5	40(-1)	5,0(-1)	80(+1)	25/75(+1)	8,1	6,6
6	50(+1)	5,0(-1)	80(+1)	0/100(-1)	7,5	6,6
7	40(-1)	6,5(+1)	80(+1)	0/100(-1)	5,3	4,4
8	50(+1)	6,5(+1)	80(+1)	25/75(+1)	6,5	8,8
9	45(0)	5,7(0)	65(0)	14/86(0)	9,8	6,3
10	45(0)	5,7(0)	65(0)	14/86(0)	9,5	6,1
11	45(0)	5,7(0)	65(0)	14/86(0)	9,6	6,3

A Figura 4.5 permite uma melhor visualização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 10 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial.

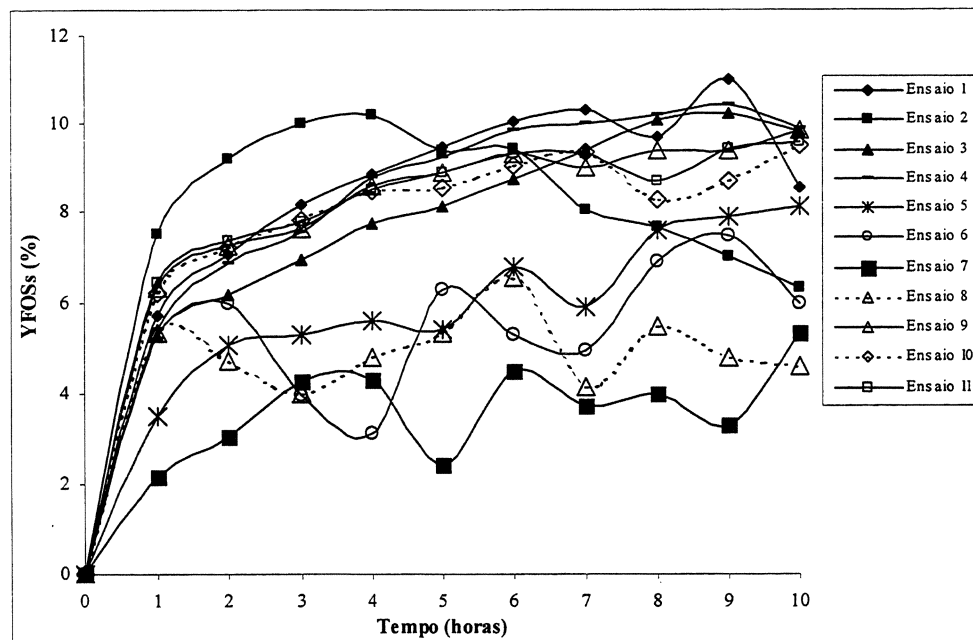


Figura 4.5: Acompanhamento da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 10 horas de síntese para os 11 ensaios do terceiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).

A Tabela 4.5 apresenta os efeitos das variáveis sobre YFOSs (%) e produtividade. Dentro das faixas estudadas apenas 2 apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos. O pH e a porcentagem de sacarose foram significativas mostrando que um incremento nos seus valores provocam a diminuição dos frutooligossacarídeos, por isso no próximo planejamento a faixa da porcentagem de sacarose foi diminuída e o valor do pH foi mantido em 5,0.

O efeito da temperatura na conversão da sacarose em frutooligossacarídeos foi baixo e não foi estatisticamente significativo, mostrando que dentro da faixa estudada (40 a 50°C) este parâmetro não afeta a conversão em frutooligossacarídeos. Este dado é muito interessante para informações da robustez do processo quando se deseja implementar um controle de temperatura numa produção industrial.

Para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos a relação solvente/tampão não apresentou efeito estatisticamente significativo. No entanto, verifica-se que o tempo que se atinge os níveis máximos de conversão variam conforme as condições dos ensaios, ou seja

afeta a produtividade do processo.

Para a produtividade verifica-se que as 4 variáveis apresentam efeitos estatisticamente significativos sobre esta resposta. O pH e a porcentagem de sacarose, mostraram também efeito negativo como na conversão da sacarose em frutooligossacarídeos, por isso no próximo planejamento a faixa da porcentagem de sacarose foi estudada em valores inferiores.

Quanto ao efeito da temperatura sobre a produtividade, o mesmo comportamento em relação a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos foi observado. Assim, a temperatura de síntese foi fixada em 45°C para os ensaios realizados no planejamento completo.

No caso da relação solvente/tampão, como descrito acima, o solvente orgânico acelerou a conversão como pode ser observado na Tabela 4.5 dos efeitos para a produtividade, por isso foi fixada a relação solvente/tampão em 25/75.

Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs e para a produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)

	YFOSs (%)				Produtividade (g/(L.h))			
	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Efeito	Desvio padrão	t(2)	Valor p
Média	8,9*	0,056	158,21	0,00004	6,88*	0,037	185,8	0,00002
Temperatura(°C)	-,0075	0,132	-0,056	0,960	2,65*	0,086	30,5	0,0010
pH	-1,05*	0,132	-7,98	0,015	-1,75*	0,086	-20,1	0,0024
Sacarose (%)	-3,59*	0,132	-27,15	0,0013	-1,00*	0,086	-11,5	0,0073
Solvente/Tampão	0,22	0,132	1,67	0,235	2,70*	0,086	31,0	0,0010

*fatores estatisticamente significativos

Resultados do Quarto Planejamento Fatorial

Assim, após os 3 planejamentos fracionários anteriores um planejamento completo foi realizado para o pH (5,0 a 6,5) e sacarose (40 a 70%) para a otimização dos YFOSs sendo que as condições de enzima foram de 4U/mL, a temperatura de 45°C, a relação solvente/tampão em 25/75%.

Na Tabela 4.6 encontram-se os resultados para a conversão que ocorreram nos ensaios 9,10 e 11, ou seja nos 3 pontos centrais com o pH em 5,7 e a sacarose em 55%.

Tabela 4.6: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da sacarose (%) na resposta YFOSs (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)

Ensaio	pH	Sacarose (%)	YFOSs (%)
1	5,2(-1)	44,3(-1)	8,4
2	6,3(+1)	44,3(-1)	9,3
3	5,2(-1)	65,6(1)	9,6
4	6,3(+1)	65,6(1)	8,3
5	5,0(-1,41)	55(0)	9,3
6	6,5(+1,41)	55(0)	11,4
7	5,7(0)	40(-1,41)	8,5
8	5,7(0)	70(+1,41)	7,2
9	5,7(0)	55(0)	13,2
10	5,7(0)	55(0)	13,5
11	5,7(0)	55(0)	13,9

A Figura 4.6 permite uma melhor visualização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do quarto planejamento fatorial completo.

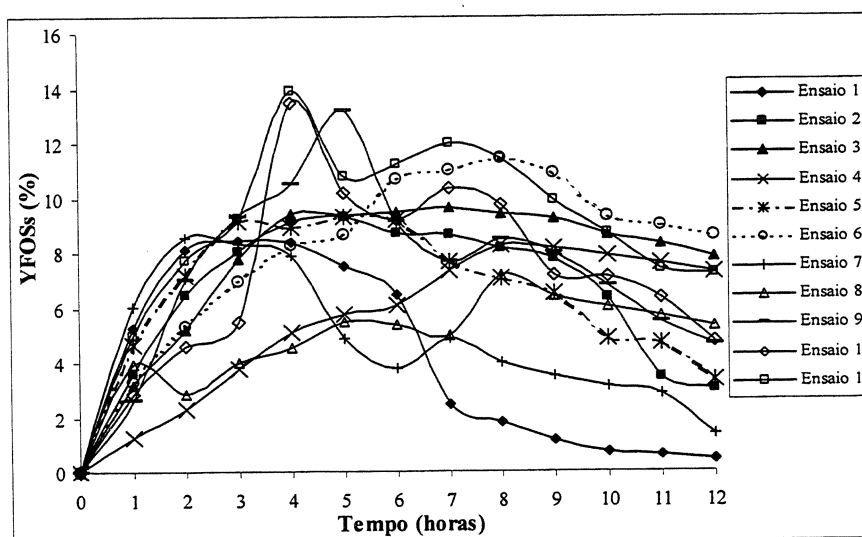


Figura 4.6: Acompanhamento da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento completo (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).

Na Figura 4.7 encontram-se os valores de conversão de sacarose e produção de glicose e frutose durante as 12 horas de síntese referentes ao décimo primeiro ensaio do planejamento completo, ou seja um dos pontos centrais o que apresentou maior conversão em frutooligossacarídeos de 14%. A concentração de glicose se manteve acima da concentração da frutose em função de que esta foi utilizada na formação dos frutooligossacarídeos, ou seja foi transferida para a sacarose produzindo assim os frutooligossacarídeos.

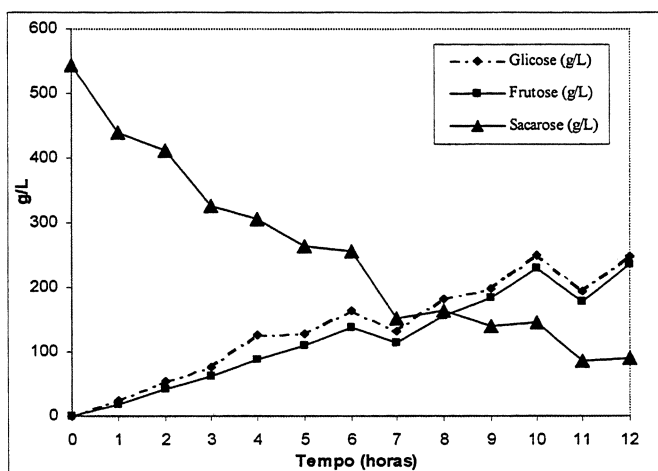


Figura 4.7: Concentrações de glicose, frutose e sacarose (g/L) correspondentes a síntese de 12 horas do ensaio 11 do quarto planejamento fatorial completo (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).

Analisando-se a Tabela 4.7 de análise de variância (ANOVA) verifica-se que o coeficiente de correlação é de 0,95, e que o F calculado é bastante superior ao F tabelado para 5% de significância. Assim foi possível obter o modelo quadrático codificado (equação 4.1) que representa o comportamento da conversão em frutooligossacarídeos em porcentagem, utilizando 4U/mL de enzima, uma relação solvente/tampão de 25/75(%) e temperatura de 45°C, dentro de uma determinada faixa estudada de pH (5,0 a 6,5) e porcentagem de sacarose (40 a 70%) em relação a fase aquosa. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. O modelo é adequado para descrever a superfície de resposta de conversão em frutooligossacarídeos (YFOSs), apresentado pela equação 4.1.

$$\text{YFOSs (\%)} = 13,53 - 1,63 \text{ pH}^2 - 2,89 (\% \text{sacarose})^2 \quad (4.1)$$

Tabela 4.7: Análise de variância para a conversão em frutooligossacarídeos (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045)

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	50,84	2	25,42	42,01
Resíduos	4,84	8	0,605	
Falta de ajuste	4,60	6		
Erro puro	0,24	2		
Total	55,68	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

$F_{0,95; 2,8} = 4,46$

Coefficiente de correlação: $R = 0,95$

Após as análises estatísticas, o modelo para a conversão em frutooligossacarídeos foi então utilizado para construir a superfície de resposta. Através da análise da Figura 4.8 (a) superfície de resposta e (b) curvas de contorno verifica-se que, a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos atingiu a produção máxima ao redor de 14% onde tanto os valores para a porcentagem de sacarose quanto para o pH encontram-se no ponto central.

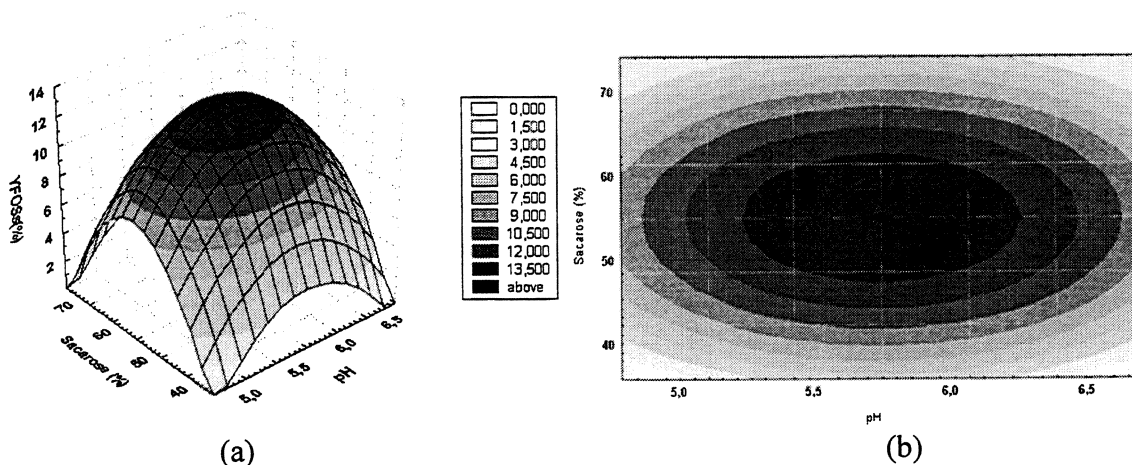


Figura 4.8: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos em função do pH e da porcentagem de sacarose em relação à fase aquosa (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 16045).

4.2.1.2. Sistema Aquoso com Enzima Livre

Objetivando a comparação da síntese em meio orgânico e aquoso e com base nos resultados anteriores, foi realizado um planejamento completo igual ao da Tabela 4.6, porém sem adição do solvente. Os resultados se encontram na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da sacarose nas respostas YFOSs e produtividade (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).

Ensaio	pH	Sacarose (%)	YFOSs (%)	YFOSs(%) predito pelo modelo	Desvio relativo do YFOSs (%)	Prod. (g/(L.h))	Prod. predita pelo modelo	Desvio relativo da Prod.(%)
1	5,2 (-1)	44,3 (-1)	9,5	9,8	-3,1	8,5	9,0	-6,7
2	6,3 (+1)	44,3 (-1)	10,7	11,0	-2,8	7,8	8,0	-3,4
3	5,2 (-1)	65,6 (+1)	8,5	8,4	0,4	6,3	6,6	-5,8
4	6,3 (+1)	65,6 (+1)	9,6	9,6	-0,6	6,3	5,6	10,0
5	5,0(-1,41)	55 (0)	9,3	9,3	-0,5	8,3	7,6	7,9
6	6,5(+1,41)	55 (0)	11,0	11,0	-0,4	6,1	6,2	-2,0
7	5,75 (0)	40(-1,41)	10,6	10,2	3,6	10,3	9,4	7,9
8	5,75 (0)	70(+1,41)	8,2	8,3	-1,4	5,8	6,0	-5,0
9	5,75 (0)	55 (0)	10,4	10,2	1,9	5,8	5,6	3,4
10	5,75 (0)	55 (0)	10,0	10,2	-2,0	5,4	5,6	-3,7
11	5,75 (0)	55 (0)	10,5	10,2	2,8	5,7	5,6	1,7

Sendo Prod. = Produtividade

A Figura 4.9 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial completo.

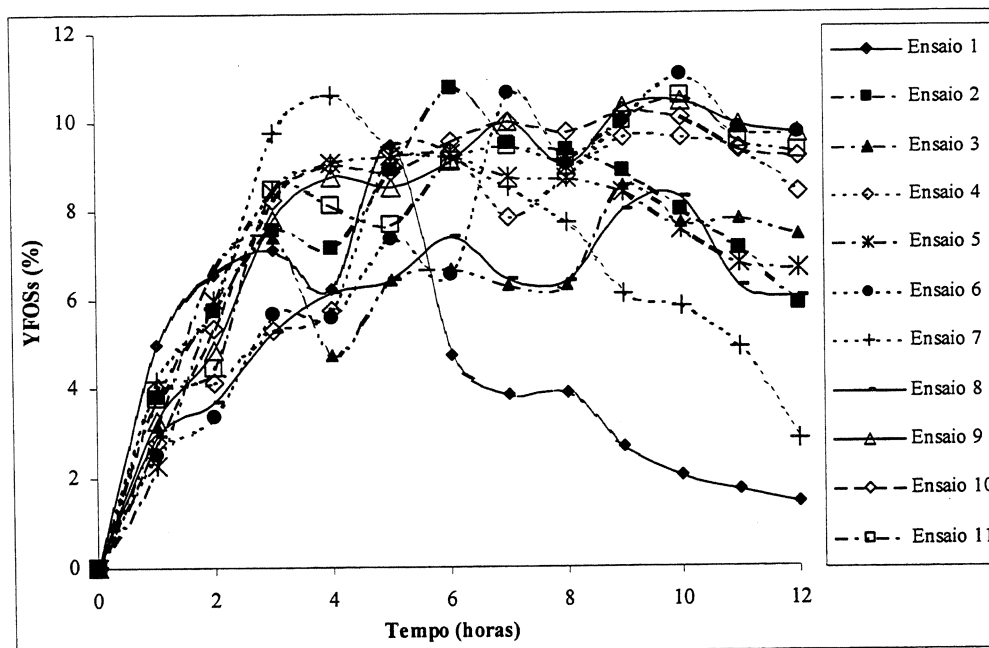


Figura 4.9: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2^a ordem e verificar a validade dos mesmos através da análise de variância (ANOVA) que está apresentada na Tabela 4.9. Verificou-se que para o modelo codificado, o coeficiente de correlação foi de 0,96 e 0,95 e que o F calculado é 8 e 3,3 vezes superior ao F tabelado para 5% de significância para as respostas YFOSs e produtividade, respectivamente. Assim foi possível obter os modelos quadráticos codificados (equações 4.2 e 4.3) que representam o comportamento de YFOSs e da produtividade em meio aquoso, utilizando 4U/mL de atividade enzimática, e 45°C de temperatura, dentro de uma determinada faixa estudada de pH e porcentagem de sacarose. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. Os modelos são adequados para descrever as superfícies de resposta de YFOSs e produtividade apresentados pelas equações 4.2 e 4.3.

Tabela 4.9: Análise de variância para YFOSs e produtividade (Sistema aquoso com enzima livre – Cepa 16045)

Fontes de variação	Somadas de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrados Médios		F calculado	
	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade
Regressão	7,8	22,2	3	4	2,6	5,5	35,0	15,0
Resíduos	0,5	2,2	7	6	0,07	0,36		
Falta de Erro	0,4	2,1	5	4				
Total	8,4	24,4	10	10				

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

YFOSs: $F_{0,95; 3,7} = 4,35$ Coeficiente de correlação: $R = 0,96$

Produtividade: $F_{0,95; 4,6} = 4,53$ Coeficiente de correlação: $R = 0,95$

$$\text{YFOSs(\%)} = 10,2 + 0,6 \text{ pH} - 0,67(\% \text{sacarose}) - 0,47 (\% \text{sacarose})^2 \quad (4.2)$$

$$\text{Produtividade(g/(L.h))} = 5,6 - 0,5 \text{pH} + 0,67(\text{pH})^2 - 1,2(\% \text{sacarose}) + 1,1 (\% \text{sacarose})^2 \quad (4.3)$$

Verificou-se que os valores preditos pelo modelo codificado foram bastante coerentes com os experimentais e os desvios individuais de cada ensaio são menores que 10%. Isto já era de se esperar pelos resultados obtidos na ANOVA.

O modelo para YFOSs e para a produtividade foram utilizados para construir as superfícies de resposta e as curvas de contorno (Figura 4.10 e Figura 4.11). Verifica-se que, os valores máximos obtidos para YFOSs correspondem a concentração de sacarose na faixa entre 40 a 50% enquanto que o aumento do pH indicou um aumento na conversão em frutooligossacarídeos. Para melhor verificar este efeito do pH, realizaram-se testes em triplicata nos valores superiores aos estudados e iguais a 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0.

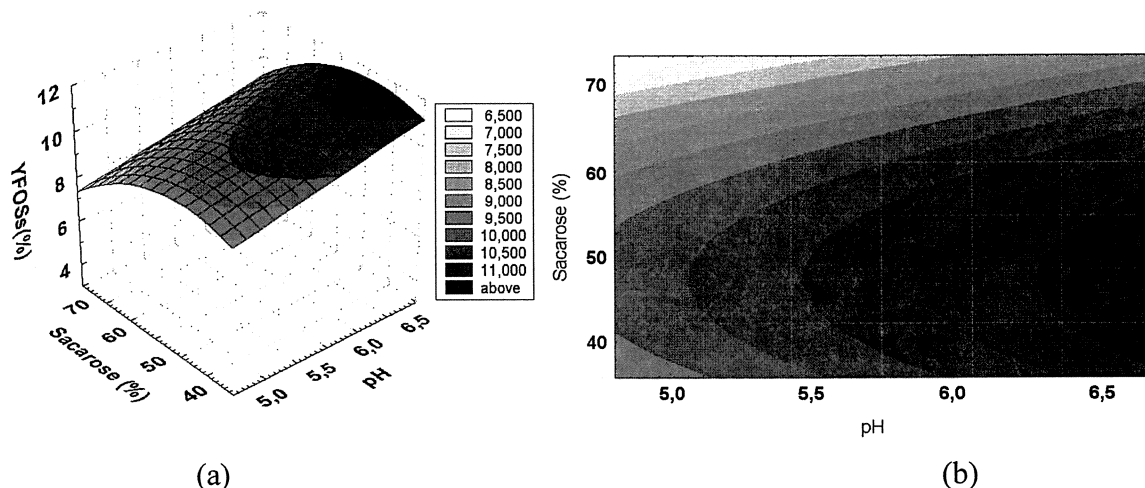


Figura 4.10: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função do pH e da sacarose (%)(Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).

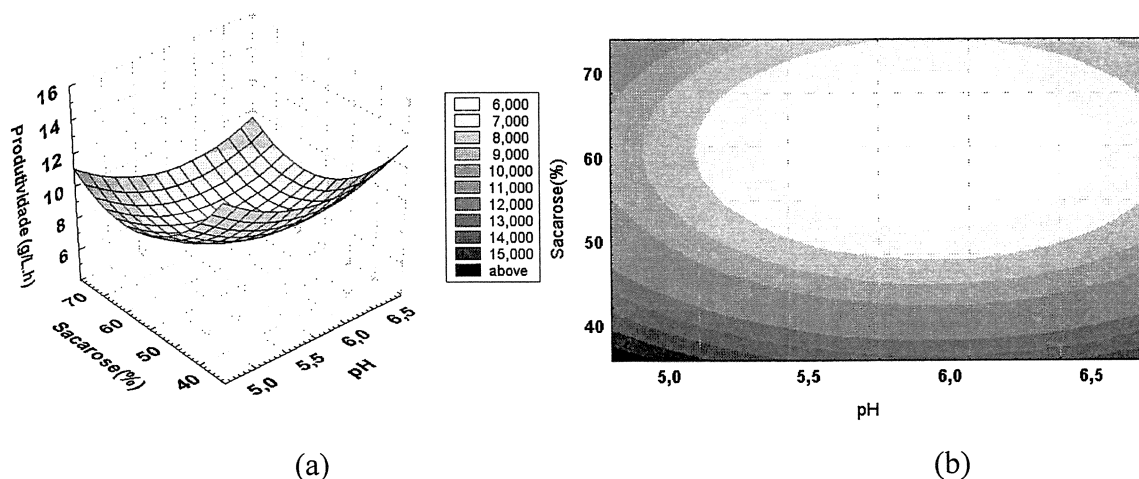


Figura 4.11: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função do pH e da sacarose (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).

Assim 4 sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes para o pH tampão fosfato 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0, foram realizadas a temperatura 45°C, 45% de sacarose, 4U/mL de enzima.

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD”, segundo O’Mahony, (1986) baseado na diferença entre as médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.10 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento e a Figura 4.12 apresenta os resultados de YFOSs e

produtividade em função do pH utilizando o tampão fosfato de sódio para uma melhor visualização.

Tabela 4.10: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).

Ensaio	YFOSs(%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (6,5)*	12,7			13,9		
1 β (6,5)*	11,6	11,9 ^a	0,7	13,1	13,4 ^d	0,4
1 χ (6,5)*	11,4			13,2		
2 α (7,0)*	4,8			5,2		
2 β (7,0)*	5,1	5,2 ^b	0,4	5,7	5,7 ^e	0,5
2 χ (7,0)*	5,7			6,3		
3 α (7,5)*	7,3			7,8		
3 β (7,5)*	8,0	7,7 ^c	0,3	9,3	8,7 ^f	0,7
3 χ (7,5)*	7,8			8,9		
4 α (8,0)*	7,0			3,7		
4 β (8,0)*	6,5	6,9 ^c	0,4	3,8	3,9 ^g	0,2
4 χ (8,0)*	7,3			4,2		

α , β , χ : São as triplicatas

* Valores de pH

** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p $\leq$ 0,05) pelo teste de Tukey.

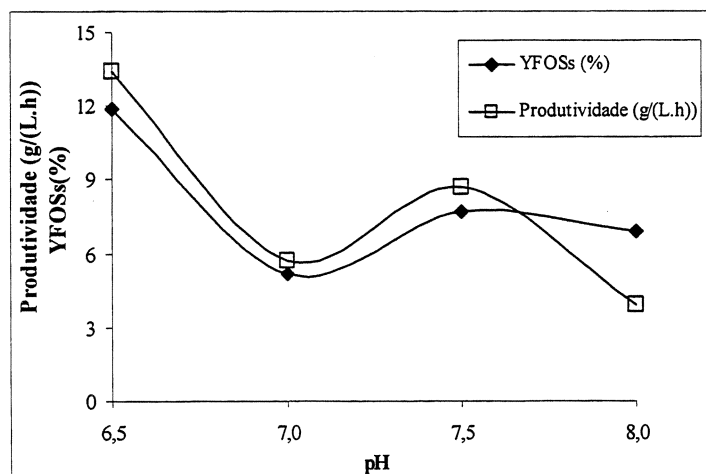


Figura 4.12: Valores médios de YFOSs (%) e produtividade (g/(L.h)) em função do pH utilizando tampão fosfato de sódio (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 16045).

Verificou-se através do teste de Tukey que existe diferença estatisticamente significativa entre os pHs versus YFOSs a não ser entre os pHs 7,5 e 8 que não verificou-se diferença significativa.

Por outro lado em relação a resposta produtividade verificou-se diferença estatisticamente significativa a 5% de significância entre todos os pHs. O pH ideal para a síntese foi 6,5, para ambas as respostas, acima deste valor ocorreu um decréscimo em ambas as respostas.

4.2.1.3. Sistema Orgânico com Enzima Imobilizada

Primeiro Planejamento Fatorial Fracionado (2^{6-2})

A mesma metodologia anterior para otimizar o processo para a enzima livre foi adotada para a enzima imobilizada em meio orgânico. Foi realizado primeiramente um planejamento fracionário para avaliar o efeito das 6 variáveis (temperatura, pH, porcentagem de sacarose, enzima (U/mL), a relação solvente/tampão (%) e o estabilizante PEG (%), nas respostas YFOSs e produtividade.

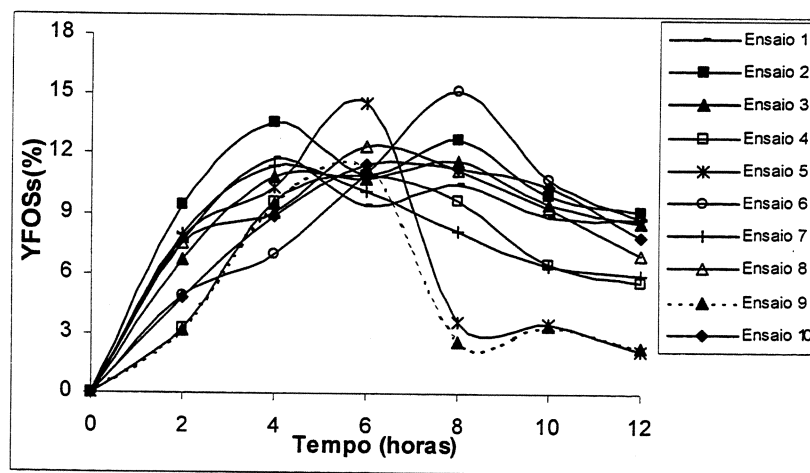
A Tabela 4.11 apresenta a matriz do planejamento 2^{6-2} com as respostas YFOSs e produtividade.

Pode-se observar que dentre os 19 ensaios realizados em condições distintas a YFOSs variou de 9,4 a 15,2% de acordo com as condições da síntese. Verificou-se que a conversão de 15,2% foi atingida no ensaio 6, com temperatura de 50°C, pH igual a 5, enzima de 4 U/mL, 70% de sacarose, relação solvente/ tampão de 25/75 e 4% de PEG.

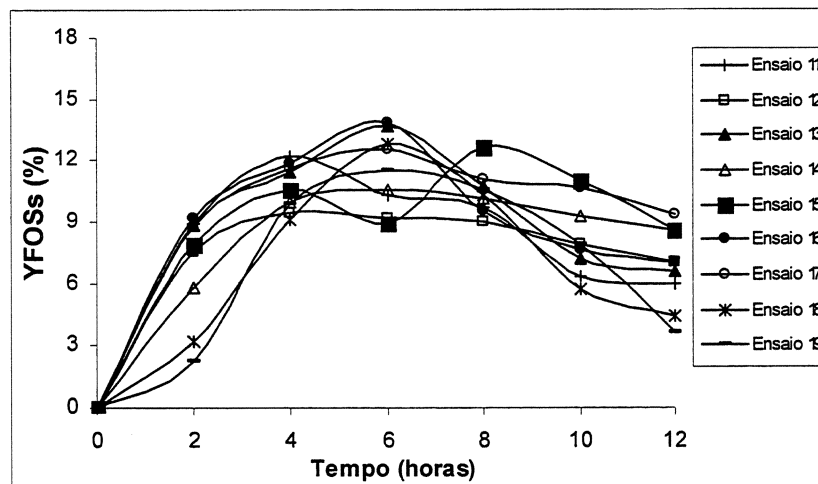
Tabela 4.11: Matriz do planejamento e as respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).

Ensaio	T (°C)	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	Solvente/tampão	PEG (%)	YFOSs (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	30 (-1)	5(-1)	50(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	11,8	15,0
2	50(+1)	5(-1)	50(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	13,5	16,5
3	30 (-1)	7(1)	50(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	11,6	7,6
4	50(+1)	7(1)	50(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	10,9	9,3
5	30(-1)	5(-1)	70(1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	14,6	17,2
6	50(+1)	5(-1)	70(1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	15,2	13,0
7	30(-1)	7(1)	70(1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	11,3	20,1
8	50(+1)	7(1)	70(1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	12,4	14,7
9	30(-1)	5(-1)	50(-1)	6 (1)	25/75(-1)	4(+1)	11,3	9,5
10	50(+1)	5(-1)	50(-1)	6 (1)	50/50(+1)	4(+1)	11,5	9,8
11	30(-1)	7(1)	50(-1)	6 (1)	50/50(+1)	0(-1)	12,2	15,7
12	50(+1)	7(1)	50(-1)	6 (1)	25/75(-1)	0(-1)	9,4	12,3
13	30(-1)	5(-1)	70(1)	6 (1)	50/50(+1)	0(-1)	13,7	16,0
14	50(+1)	5(-1)	70(1)	6 (1)	25/75(-1)	0(-1)	10,6	12,7
15	30(-1)	7(1)	70(1)	6 (1)	25/75(-1)	4(+1)	12,6	11,2
16	50(+1)	7(1)	70(1)	6 (1)	50/50(+1)	4(+1)	13,8	15,8
17	40(0)	6(0)	60(0)	5 (0)	40/60(0)	2(0)	12,5	12,8
18	40(0)	6(0)	60(0)	5 (0)	40/60(0)	2(0)	12,7	13,2
19	40(0)	6(0)	60(0)	5 (0)	40/60(0)	2(0)	11,5	11,4

A Figura 4.13 (a e b) permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 19 ensaios do planejamento fatorial.



(a)



(b)

Figura 4.13: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 10 (a) e os ensaios de 11 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).

A Tabela 4.12 apresenta os efeitos das variáveis sendo que a porcentagem de sacarose apresentou efeito estatisticamente significativo a 5% de significância e positivo, indicando que ao passar de 50 para 70% de sacarose ocorreu um aumento nas respostas YFOSs e na produtividade, por isso a faixa estudada foi deslocada para níveis superiores que foram de 50 a 80%. Enquanto que o PEG não foi estatisticamente significativo para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e teve um efeito negativo e significativo para a produtividade indicando que sua presença não favoreceu nenhuma das respostas desejadas, podendo ser eliminado da reação, já que o nível -1 estudado correspondia a zero por cento de PEG.

O efeito da temperatura não foi estatisticamente significativo, por isso foi fixada em 40°C na continuidade dos estudos. O pH foi estatisticamente significativo a 10% de significância apresentando efeito negativo indicando que ao passar de 5 para 7 ocorreu uma diminuição na conversão YFOSs, por isso os níveis de estudo foram deslocados para níveis inferiores de 4 à 6.

A faixa da sacarose foi deslocada para valores superiores, enquanto que a concentração da enzima apesar de não ter sido estatisticamente significativa, sua faixa foi

mantida a mesma pois poderia não haver enzima suficiente para atuar na sacarose. A relação solvente/tampão apresentou efeito significativo a 6% de significância e positivo, indicando que ao passar de 25/75 para 50/50 ocorreu um aumento na conversão YFOSs por isso sua faixa estudada foi deslocada para níveis superiores que foram de 25/75 a 75/25.

Tabela 4.12: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045)

	YFOSs(%)				Produtividade(g/(L.h))			
	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Efeito	Desvio padrão	t(2)	Valor p
Média	12,3	0,15	81,24	0,0001	13,3	0,21	60,94	0,0002
Temperatura (°C)	-0,2	0,32	-0,69	0,559	-1,0	0,47	-2,12	0,166
pH	-0,9**	0,32	-2,92	0,099	-0,3	0,47	-0,77	0,521
Sacarose (%)	1,5*	0,32	4,51	0,045	3,1*	0,47	6,57	0,022
Enzima (U/mL)	-0,8	0,32	-2,38	0,139	-1,3	0,47	-2,73	0,112
Solvente/Tampão	1,2**	0,32	3,82	0,062	1,2	0,47	2,66	0,116
PEG	0,8	0,32	2,52	0,127	-3,7*	0,47	-7,74	0,016

* fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$)

** fatores estatisticamente significativos ($0,05 < p \leq 0,10$)

Assim, o pH, a porcentagem de sacarose, a enzima (U/mL) e a relação solvente/tampão foram selecionadas e estudadas utilizando um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central.

Resultados do segundo planejamento fatorial fracionado (2^{4-1})

A Tabela 4.13 apresenta a matriz do planejamento 2^{4-1} com as respostas YFOSs e produtividade. Pode-se observar que os resultados atingidos foram melhores que os do planejamento 2^{6-2} .

Tabela 4.13: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).

Ensaio	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	Solvente/ Tampão (%)	YFOSs (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	4(-1)	50(-1)	4(-1)	25/75(-1)	16,9	8,5
2	6(+1)	50(-1)	4(-1)	75/25(+1)	17,5	14,9
3	4(-1)	80(+1)	4(-1)	75/25(+1)	19,5	40,2
4	6(+1)	80(+1)	4(-1)	25/75(-1)	16,9	13,3
5	4(-1)	50(-1)	6(+1)	75/25(+1)	19,2	24,7
6	6(+1)	50(-1)	6(+1)	25/75(-1)	17,5	14,4
7	4(-1)	80(+1)	6(+1)	25/75(-1)	17,6	17,7
8	6(+1)	80(+1)	6(+1)	75/25(+1)	18,8	25,4
9	5(0)	65(0)	5(0)	62/38(0)	17,6	28,1
10	5(0)	65(0)	5(0)	62/38(0)	17,2	28,3
11	5(0)	65(0)	5(0)	62/38(0)	16,7	27,6

A Figura 4.14 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial.

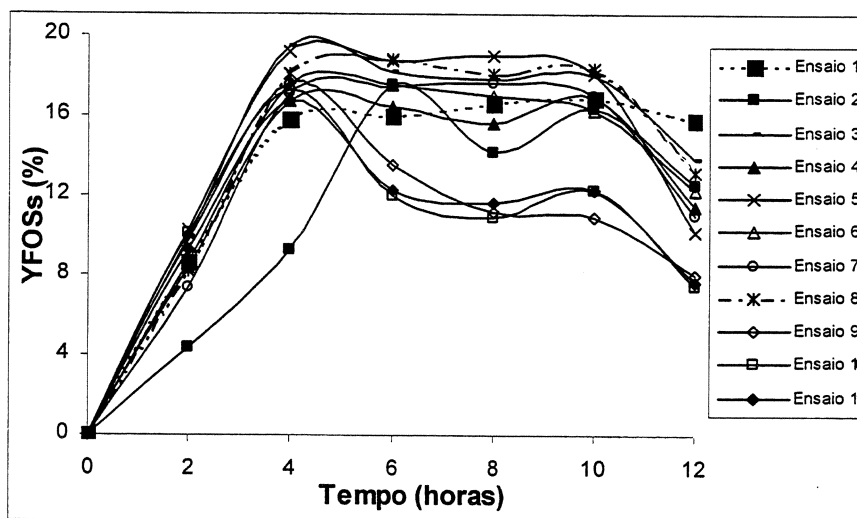


Figura 4.14: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do terceiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).

A Tabela 4.14 apresenta os efeitos das variáveis sobre a YFOSs e produtividade. Dentro das faixas estudadas apenas a relação solvente/tampão apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo na resposta YFOSs, indicando que um incremento nos seus valores provocou o aumento da conversão. Enquanto que na resposta produtividade todas as variáveis foram estatisticamente significativas.

O pH não foi estatisticamente significativo para YFOSs e teve um efeito negativo e significativo para a produtividade por isso foi fixado na condição inferior pH 4, a qual apresentou menor risco de contaminação microbiana.

A porcentagem de sacarose e a enzima (U/mL) não foram estatisticamente significativas para YFOSs e tiveram efeito positivo e significativo para a produtividade, mas foram fixadas na condição inferior de 50% de sacarose e 4 U/mL em função do menor custo.

Tabela 4.14: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045)

	YFOSs(%)				Produtividade (g/(L.h))			
	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p
Média	17,8	0,13	134,60	0,00005	22,1	0,12	180,77	0,00003
pH	-0,6	0,31	-2,00	0,182	-5,7*	0,28	-20,1	0,002
Sacarose(%)	0,4	0,31	1,28	0,328	8,5*	0,28	29,62	0,001
Enzima (U/mL)	0,6	0,31	1,89	0,198	1,3*	0,28	4,51	0,045
Solvente/Tampão(%)	1,5*	0,31	4,86	0,039	12,8*	0,28	44,71	0,0005

*fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Assim 4 sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes da relação solvente/tampão (60/40; 70/30; 80/20 e 90/10), foram realizadas a temperatura 40°C, pH 4, 50% de sacarose e 4U/mL de enzima.

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” para a diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.15 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio e a Figura 4.15 apresenta os resultados obtidos para melhor visualização. Tanto a

resposta de YFOSs como a produtividade foram favorecidas pelo aumento da relação solvente/tampão até 75/25 e sofreram uma queda após este valor.

Tabela 4.15: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).

Ensaio	YFOSs(%)	Média ^{***}	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média ^{***}	Desvio Padrão
1 α (60/40)*	11,0			7,1		
1 β (60/40)*	9,1	10,1 ^a	0,96	5,8	6,4 ^e	0,6
1 χ (60/40)*	10,3			6,5		
2 α (70/30)*	14,0			12,1		
2 β (70/30)*	12,2	12,6 ^b	1,2	9,7	10,5 ^e	1,4
2 χ (70/30)*	11,7			9,7		
(75/25)**	17,5			15,0		
(75/25)**	19,5	18,7 ^c	1,0	40,2	26,6 ^f	12,7
(75/25)**	19,2			24,7		
3 α (80/20)*	16,6			13,6		
3 β (80/20)*	17,3	16,8 ^c	0,38	14,8	14,1 ^{e,f}	0,6
3 χ (80/20)*	16,6			14,0		
4 α (90/10)*	8,0			10,4		
4 β (90/10)*	7,1	7,3 ^d	0,62	8,5	9,0 ^e	1,1
4 χ (90/10)*	6,8			8,3		

α , β , χ : São as triplicatas

* Relação solvente/tampão (%)

** Resultados dos ensaios 2, 3 e 5 do planejamento 2^{4-1} com uma relação solvente/tampão de 75/25 (%).

*** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

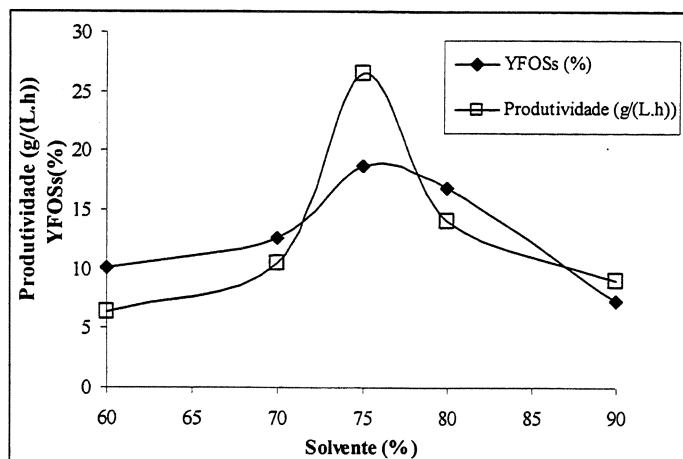


Figura 4.15: Valores médios de solvente (%) versus YFOSs (%) e produtividade (g/(L.h)), (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 16045).

Para YFOSs(%), verificou-se através do teste de Tukey que existe diferença estatisticamente significativa entre as relações solvente/tampão com exceção das relações de 75/25 e 80/20(%) em que não existiu diferença a 5% de significância. Na resposta produtividade também verificou-se que entre as relações solvente/tampão de 75/25 e 80/20 não existiu diferença estatisticamente significativa a 5% de significância. A relação solvente/tampão ideal para a síntese foi de 75/25(%), para ambas as respostas, acima ou abaixo deste valor ocorreu um decréscimo tanto na produtividade quanto em YFOSs.

4.2.1.4. Sistema Aquoso com Enzima Imobilizada

Na Tabela 4.16 encontram-se os resultados do planejamento fatorial no estudo do pH, da sacarose e da enzima nas respostas máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e na produtividade.

Tabela 4.16: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH, da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas YFOSs e produtividade, (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).

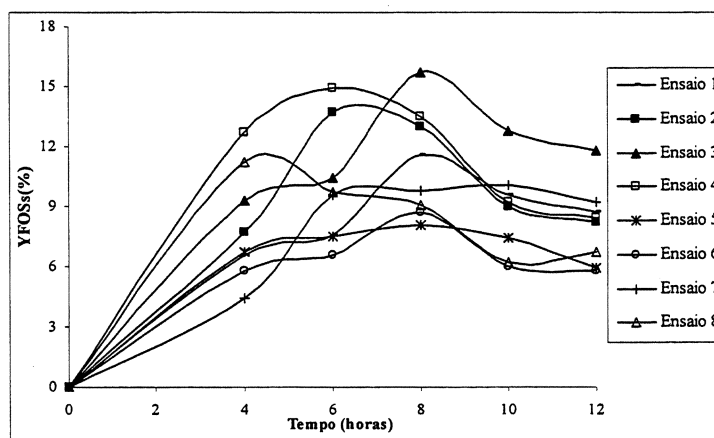
Ensaio	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	YFOSs (%)	YFOSs (%) predito pelo modelo	Desvio YFOSs (%)	Prod. (g/(L.h))	Prod. (g/(L.h)) predito pelo modelo	Desvio prod. (%)
1	4 (-1)	50 (-1)	4 (-1)	11,5	10,6	7,8	6,3	9,0	-42,9
2	6(+1)	50(-1)	4(-1)	13,7	12,0	12,4	10,8	7,8	27,8
3	4(-1)	80(+1)	4(-1)	15,7	12,6	19,7	15,3	13,4	12,4
4	6(+1)	80(+1)	4(-1)	14,9	14,0	6,0	19,8	20,6	-4,0
5	4(-1)	50(-1)	6(+1)	8,1	7,6	6,2	5,3	5,2	1,9
6	6(+1)	50(-1)	6(+1)	8,7	9,0	-3,4	5,4	8,0	-48,1
7	4(-1)	80(+1)	6(+1)	10,1	9,6	5,0	7,8	9,6	-23,1
8	6(+1)	80(+1)	6(+1)	11,2	11,0	1,8	24,9	20,8	16,5
9	3,3(-1,68)	65(0)	5(0)	2,0	4,3	-113,3	3,2	1,8	43,8
10	6(1)*	65(0)	5(0)	6,5	7,6	-16,9	5,2	8,5	-63,5
11	5(0)	40(-1,68)	5(0)	11,0	11,9	-8,6	3,8	2,4	35,7
12	5(0)	90(+1,68)	5(0)	13,9	15,3	-10,1	15,4	16,9	-9,7
13	5(0)	65(0)	3,3(-1,68)	12,4	15,3	-23,4	19,8	20,2	-2,1
14	5(0)	65(0)	6,7(+1,68)	10,7	10,3	4,1	17,6	17,2	2,3
15	5(0)	65(0)	5(0)	7,7	7,7	0,0	6,3	6,0	4,8
16	5 (0)	65(0)	5(0)	8,8	7,7	12,5	7,0	6,0	14,3
17	5 (0)	65(0)	5(0)	7,9	7,7	2,5	6,4	6,0	6,3

Sendo Prod. = Produtividade

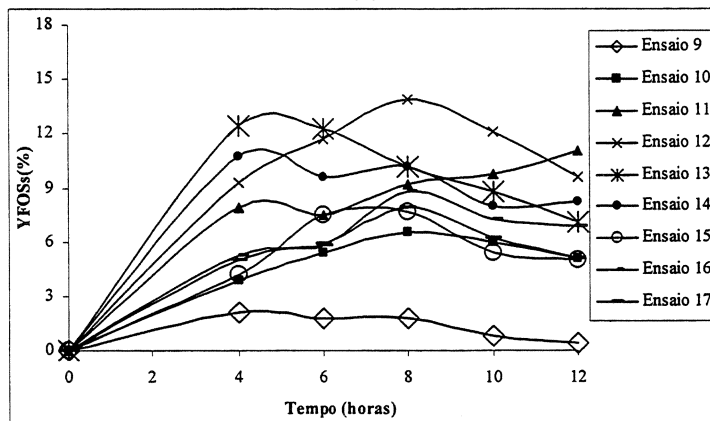
* Não foi possível utilizar o nível +1,68 para o pH utilizando o tampão fosfato, pois sua faixa não permite.

A maior conversão de sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) ocorreu no ensaio 3 com o pH (tampão acetato) em 4,0, 80% de sacarose e 4 U/mL de atividade enzimática e a maior produtividade ocorreu no ensaio 8 com o pH 6,0, 80% de sacarose e 6 U/mL de atividade enzimática conforme pode se observar na tabela acima.

A Figura 4.16 (a e b) permite uma melhor visualização de YFOSs(%) ao longo das 12 horas de síntese.



(a)



(b)

Figura 4.16: Acompanhamento de YFOSs (%) ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios 1 ao 8 (a) e do ensaio 9 ao 17 (b) dos ensaios do planejamento fatorial completo, (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045)

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem e verificar a validade dos mesmos através da análise de variância (ANOVA). Analisando-se a Tabela 4.17 (ANOVA) para as respostas YFOSs (%) e

produtividade (g/L.h) para o modelo codificado, verifica-se que o coeficiente de correlação é de 0,90 e 0,95; e que o F calculado é 2,3 e 3,9 vezes superior ao F tabelado 5% de significância, respectivamente. Assim foi possível obter os modelos quadráticos codificados (equações 4.4 e 4.5) que representam o comportamento de YFOSs e da produtividade em meio aquoso, utilizando 40°C de temperatura, dentro de uma determinada faixa estudada de pH, de porcentagem de sacarose e de enzima. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. O modelo é adequado para descrever a superfície de resposta de YFOSs e da produtividade representados pelas equações 4.4 e 4.5.

Tabela 4.17: Análise de variância para YFOSs(%) e produtividade (g/(L.h)) (Sistema aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045)

Fontes de variação	Soma de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrados Médios		F calculado	
	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade
Regressão	153,4	662,5	6	7	25,5	94,6	7,6	12,8
Resíduos	33,4	66,1	10	9	3,3	7,3		
Falta de ajuste	32,7	65,8	8	7				
Erro Puro	0,68	0,33	2	2				
Total	186,9	728,7	16	16				

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

YFOSs: $F_{0,95; 6,10} = 3,22$ Coeficiente de correlação: $R = 0,90$

Produtividade: $F_{0,95; 7,9} = 3,29$ Coeficiente de correlação: $R = 0,95$

$$\text{YFOSs(\%)} = 7,7 + 0,7 \text{ pH} - 0,8 (\text{pH})^2 + 1,0 (\% \text{sacarose}) + 2,1 (\% \text{sacarose})^2 - 1,5 (\text{enzima}) + 1,8 (\text{enzima})^2 \quad (4.4)$$

$$\text{Produtividade(g/L.h)} = 6,0 + 2,5 \text{ pH} + 4,3 (\% \text{sacarose}) + 1,3 (\% \text{sacarose})^2 - 0,9 (\text{enzima}) + 4,5 (\text{enzima})^2 + 2,1 * \text{pH} * (\% \text{sacarose}) + 1,0 * \text{pH} * \text{enzima} \quad (4.5)$$

Obteve-se as superfícies de resposta para YFOSs (%) e para a produtividade (Figura 4.17 e Figura 4.18) já que as equações foram validadas através da Anova. Analisando-se as superfícies verifica-se que as condições de 3,3 U/mL de enzima e pH igual a 5,5 foram as mais adequadas para os valores ótimos das duas respostas. No entanto para a variável sacarose (%) os valores máximos obtidos para a resposta YFOSs(%), estão tanto nas concentrações mínimas quanto máximas estudadas e os valores mínimos para as

concentrações entre 60 e 70%.

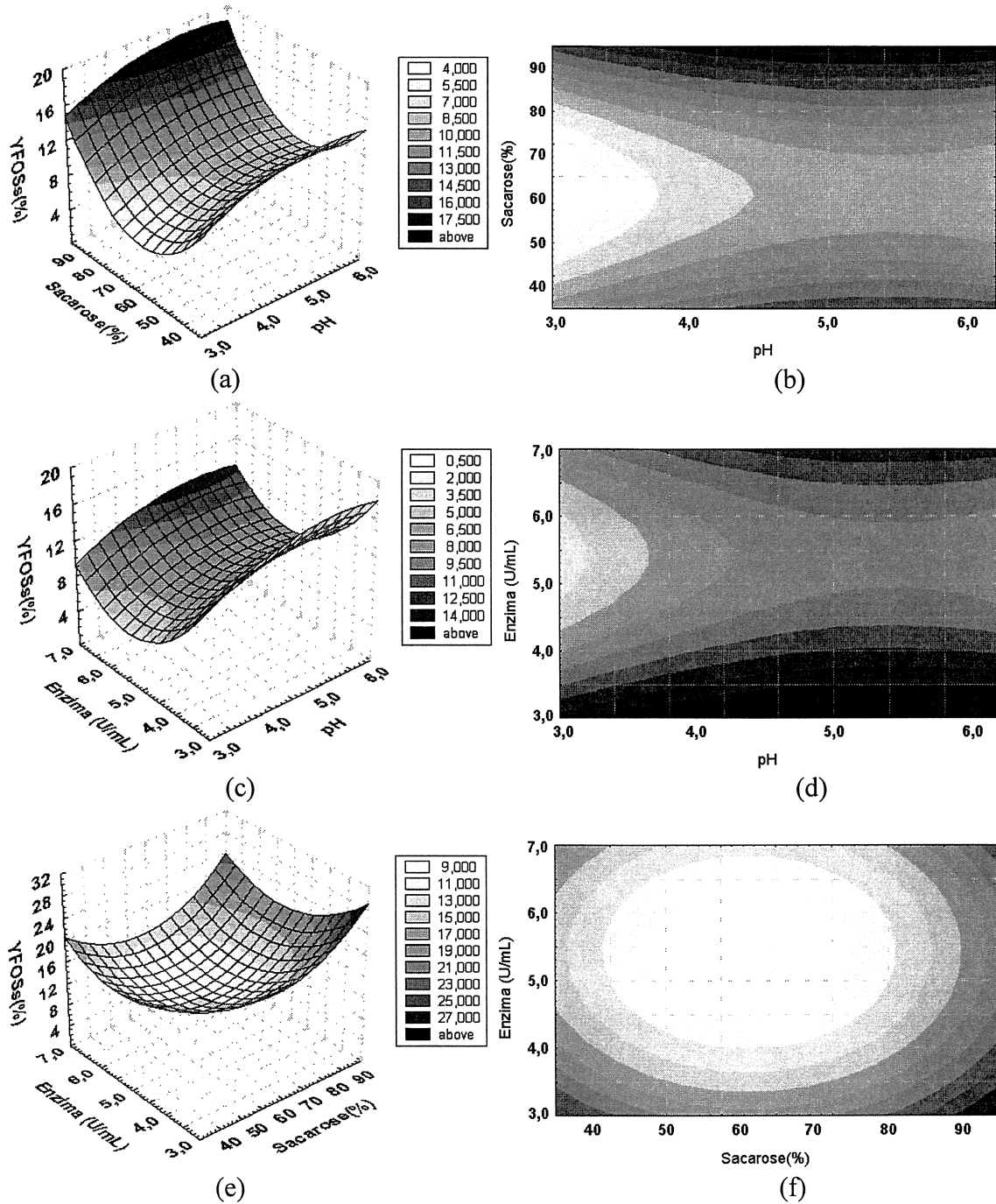


Figura 4.17: Superfícies de resposta e curvas de contorno para YFOSs(%) em função do pH e da sacarose (%) (a) e (b), do pH e da enzima (c) e (d) e em função da sacarose e da enzima (e) e (f), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).

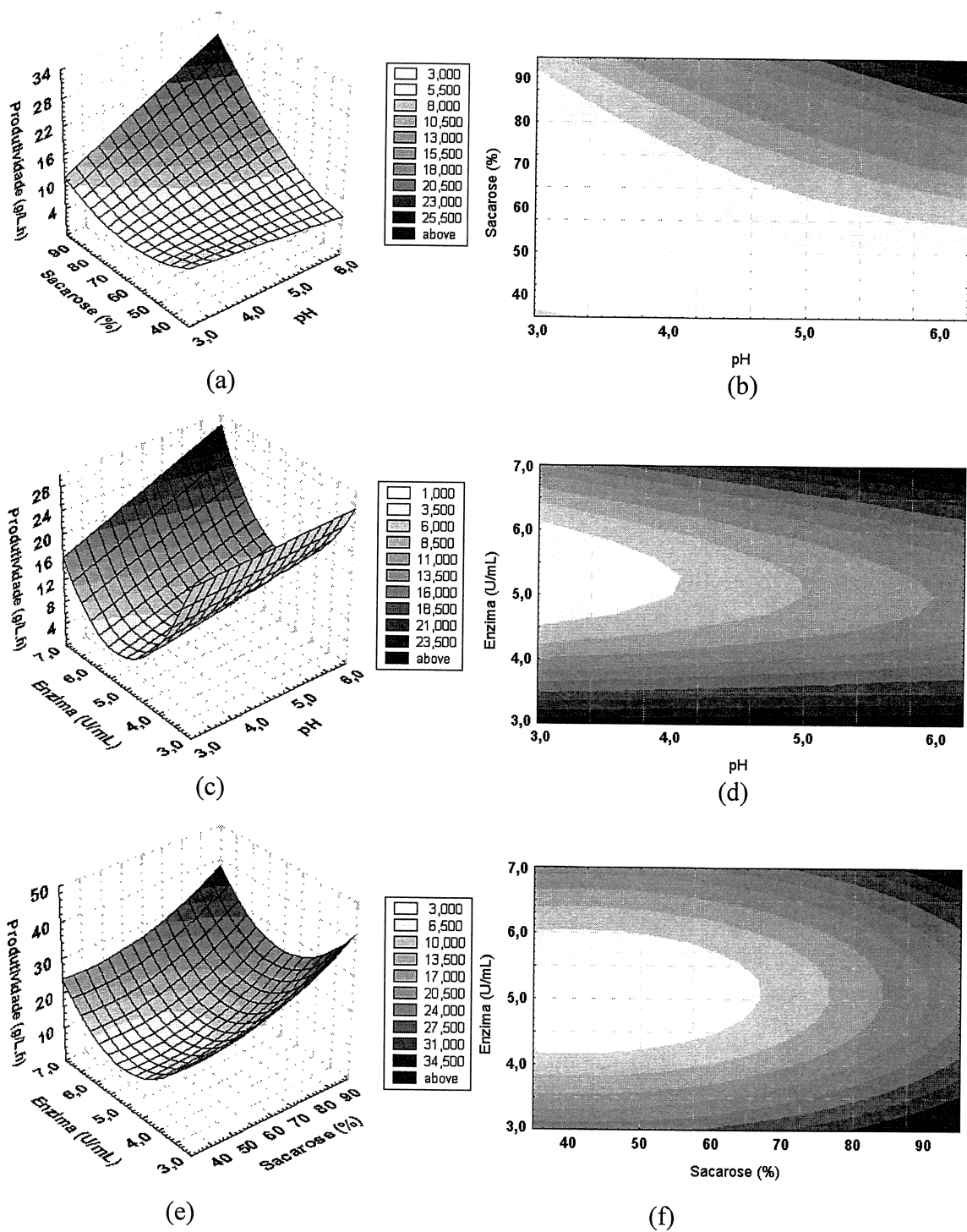


Figura 4.18: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a produtividade em função da sacarose e do pH (a) e (b), em função da enzima e do pH (c) e (d) e enzima e da sacarose (e) e (f), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).

Assim para validar experimentalmente estes resultados, realizaram-se 3 sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes para a percentagem de sacarose(40; 65 e 90) realizadas a temperatura de 40°C, pH 5,5 (tampão acetato), 3,3U/mL de atividade enzimática.

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” baseado na diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.18 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento.

Tabela 4.18: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes aos ensaios realizados (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 16045).

Ensaio	YFOSs(%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (40)*	11,3	11,0 ^a	0,9	6,1	5,4 ^d	0,7
1 β (40)*	10,0			4,6		
1 χ (40)*	11,9			5,5		
2 α (65)*	8,5	8,0 ^b	0,4	8,9	8,8 ^e	0,2
2 β (65)*	8,0			9,0		
2 χ (65)*	7,7			8,5		
3 α (90)*	15,4	15,3 ^c	0,6	16,9	16,3 ^f	0,7
3 β (90)*	15,9			16,5		
3 χ (90)*	14,7			15,5		

α , β , χ : são as triplicatas

* % de sacarose

** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Verificou-se através do teste de Tukey que existe diferença estatisticamente significativa entre as percentagens de sacarose tanto na resposta YFOSs(%) quanto na produtividade. A percentagem de sacarose ideal para a síntese foi de 90%, abaixo deste valor ocorreu um decréscimo nas duas respostas. Estes resultados são importantes para validar as superfícies de resposta obtidas.

Utilizando como substrato 90% de sacarose e enzima imobilizada a máxima YFOSs obtida foi de 15,3% enquanto que utilizando como substrato 55% de sacarose e enzima livre obteve-se a máxima de 13,5%. Comparando estas duas YFOSs obtidas pode-se observar que não se justifica a utilização desta alta percentagem de sacarose de 90% em

função da dificuldade operacional de uma solução com alta viscosidade, além da dificuldade da dissolução da sacarose e seu alto custo.

4.2.2. Cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

4.2.2.1. Sistema Orgânico com Enzima Livre

Primeiro Planejamento Fatorial Fracionado (2^{6-2})

Utilizando enzima livre em meio orgânico, foi realizado primeiramente um planejamento fracionário para avaliar o efeito das 6 variáveis (temperatura, pH, porcentagem de sacarose, atividade enzimática (U/mL), a relação solvente/tampão (%) e o estabilizante PEG (%), nas respostas YFOSs e produtividade.

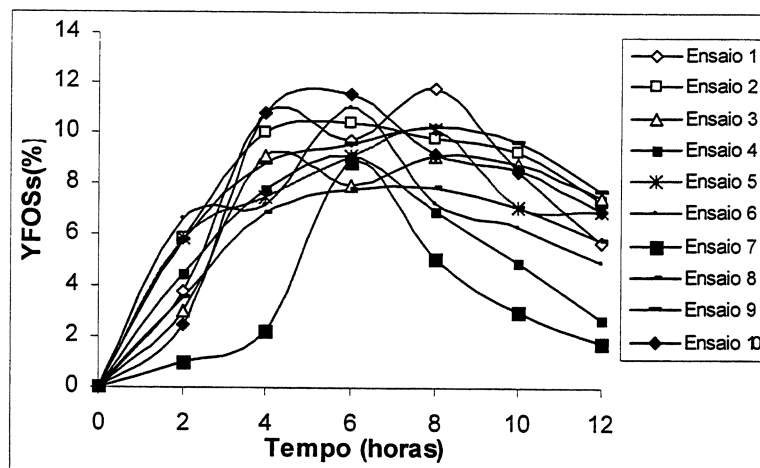
A Tabela 4.19 apresenta a matriz do planejamento 2^{6-2} com as respostas YFOSs e produtividade.

Pode-se observar que dentre os 19 ensaios realizados a YFOSs (%) variou de 7,8 a 11,8% de acordo com as condições da síntese.

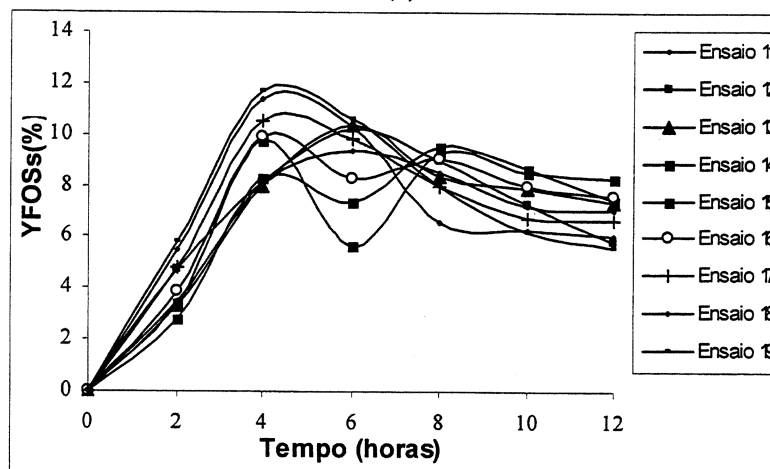
Tabela 4.19: Matriz do planejamento e as respostas YFOSs (%) e produtividade (g/(L.h)) (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

Ensaio	T (°C)	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	Solvente/tampão (%)	PEG (%)	YFOSs (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	30 (-1)	5(-1)	50(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	11,8	7,2
2	50(+1)	5(-1)	50(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	10,4	8,5
3	30 (-1)	7(1)	50(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	9,0	5,5
4	50(+1)	7(1)	50(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	9,0	7,7
5	30(-1)	5(-1)	70(1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	10,1	8,7
6	50(+1)	5(-1)	70(1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	11,0	12,7
7	30(-1)	7(1)	70(1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	8,8	10,3
8	50(+1)	7(1)	70(1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	7,8	6,9
9	30(-1)	5(-1)	50(-1)	8 (1)	25/75(-1)	4(+1)	10,2	6,5
10	50(+1)	5(-1)	50(-1)	8 (1)	50/50(+1)	4(+1)	11,5	9,4
11	30(-1)	7(1)	50(-1)	8 (1)	50/50(+1)	0(-1)	9,3	7,9
12	50(+1)	7(1)	50(-1)	8 (1)	25/75(-1)	0(-1)	10,2	8,7
13	30(-1)	5(-1)	70(1)	8 (1)	50/50(+1)	0(-1)	10,3	12,1
14	50(+1)	5(-1)	70(1)	8 (1)	25/75(-1)	0(-1)	9,7	16,8
15	30(-1)	7(1)	70(1)	8 (1)	25/75(-1)	4(+1)	9,5	8,5
16	50(+1)	7(1)	70(1)	8 (1)	50/50(+1)	4(+1)	9,9	17,8
17	40(0)	6(0)	60(0)	6 (0)	40/60(0)	2(0)	10,5	15,4
18	40(0)	6(0)	60(0)	6 (0)	40/60(0)	2(0)	11,4	17,3
19	40(0)	6(0)	60(0)	6 (0)	40/60(0)	2(0)	11,6	17,8

A Figura 4.19 (a e b) permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 19 ensaios do planejamento fatorial.



(a)



(b)

Figura 4.19: Acompanhamento de YFOSs (%) ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 10 (a) e os ensaios de 11 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

A Tabela 4.20 apresenta os efeitos das variáveis sendo que o pH apresentou efeito negativo e estatisticamente significativo a 5% de significância, indicando que ao passar de 5 para 7 ocorreu uma diminuição na conversão YFOSs, por isso os níveis de estudo foram deslocados para níveis inferiores de 4 à 6.

O efeito da temperatura foi positivo e estatisticamente significativo a 5% de significância para a produtividade, mas sua faixa não foi ampliada pois aumentar a temperatura mais do que 50°C provoca uma rápida desnaturação da enzima, por isso sua faixa foi mantida a mesma.

A porcentagem de sacarose apresentou efeito positivo e estatisticamente significativo a 5% de significância também para a produtividade, indicando que ao passar de 50 para 70% de sacarose ocorreu um aumento nesta resposta, enquanto que para YFOSs a sacarose não apresentou efeito significativo. Para avaliar seu efeito em função de diminuir custos a faixa foi deslocada para níveis inferiores. Para o PEG o efeito sobre as respostas analisadas não foi estatisticamente significativo ou seja sua presença não favoreceu nenhuma das respostas desejadas, podendo ser eliminado da reação, já que o nível -1 estudado correspondia a zero por cento de PEG.

A relação solvente/tampão não foi estatisticamente significativo, por isso foi fixada em 25/75 (%). O efeito da enzima não foi estatisticamente significativo, assim sua faixa foi mantida a mesma. Esta variável foi mantida no estudo já que a melhor porcentagem de sacarose ainda não tinha sido determinada.

Tabela 4.20: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema orgânico com enzima livre – Cepa 7571)

	YFOSs(%)				Produtividade(g/(L.h))			
	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p
Média	10,1	0,13	73,03	0,0001	10,8	0,29	37,42	0,0007
Temperatura (°C)	0,04	0,30	0,14	0,89	2,7*	0,63	4,33	0,049
pH	-1,4*	0,30	-4,76	0,04	-1,0	0,63	-1,70	0,23
Sacarose (%)	-0,5	0,30	-1,75	0,22	4,0*	0,63	6,42	0,023
Enzima (U/mL)	0,3	0,30	1,15	0,36	2,5	0,63	4,01	0,056
Solvente/Tampão	-0,2	0,30	-0,71	0,55	-0,2	0,63	-0,30	0,78
PEG	0,2	0,30	0,80	0,50	-0,2	0,63	-0,34	0,76

*fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$)

Assim, o pH, a porcentagem de sacarose, a enzima (U/mL) e a temperatura foram selecionadas e estudadas utilizando um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 repetições no ponto central.

Segundo planejamento fatorial fracionado (2^{4-1})

A Tabela 4.21 apresenta a matriz do planejamento 2^{4-1} com as respostas YFOSs e produtividade. Pode-se observar que os melhores resultados atingidos para YFOSs foram nos ensaios 3 e 4, com pH 6, 40% de sacarose, 8 e 4 U/mL de enzima e 30 e 50°C de temperatura.

Tabela 4.21: Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e resultados de YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

Ensaio	T(°C)	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	YFOSs (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	30(-1)	4(-1)	40(-1)	4(-1)	12,2	12,4
2	50(+1)	4(-1)	40(-1)	8(+1)	12,9	5,3
3	30(-1)	6(+1)	40(-1)	8(+1)	17,0	6,6
4	50(+1)	6(+1)	40(-1)	4(-1)	17,1	8,9
5	30(-1)	4(-1)	60(+1)	8(+1)	13,4	13,6
6	50(+1)	4(-1)	60(+1)	4(-1)	12,9	20,1
7	30(-1)	6(+1)	60(+1)	4(-1)	15,2	9,3
8	50(+1)	6(+1)	60(+1)	8(+1)	13,3	7,8
9	40(0)	5(0)	50(0)	6(0)	14,5	7,3
10	40(0)	5(0)	50(0)	6(0)	13,4	7,0
11	40(0)	5(0)	50(0)	6(0)	13,3	6,7

A Figura 4.20 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial.

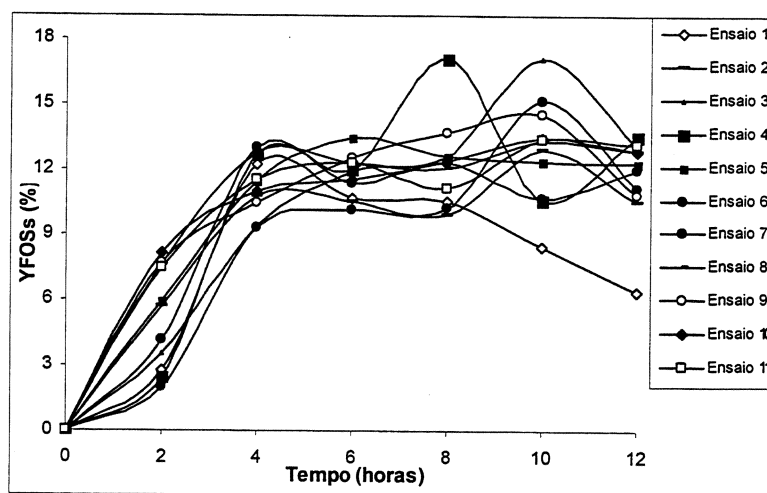


Figura 4.20: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

A Tabela 4.22 apresenta os efeitos das variáveis sobre a YFOSs e produtividade. O pH apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo na resposta YFOSs e significativo e negativo na produtividade em função disso sua faixa foi mantida a mesma. Estes efeitos significam que houve um aumento na conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs), mas num tempo maior.

A porcentagem de sacarose apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo, indicando que o incremento nos seus valores provocou o aumento na produtividade, por isso os níveis de estudo foram deslocados para níveis superiores.

A enzima foi estatisticamente significativa e negativa por isso foi fixada na condição inferior 4 U/mL. A temperatura não foi estatisticamente significativa dentro da faixa estudada por isso foi fixada a 40°C.

Tabela 4.22: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade (Sistema orgânico com enzima livre – Cepa 7571)

	YFOSs(%)				Produtividade (g/(L.h))			
	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p
Média	14,1	0,18	74,70	0,0001	9,5	0,10	94,41	0,0001
T(°C)	-0,4	0,44	-0,90	0,46	0,06	0,23	0,26	0,81
pH	2,8*	0,44	6,28	0,02	-4,7*	0,23	-19,77	0,002
Sacarose (%)	-1,0	0,44	-2,46	0,13	4,4*	0,23	18,57	0,002
Enzima (U/mL)	-0,2	0,44	-0,41	0,71	-4,3*	0,23	-18,29	0,002

*fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Assim, o pH e a porcentagem de sacarose foram selecionadas e estudadas utilizando um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes).

Terceiro planejamento fatorial completo

Na Tabela 4.23 encontram-se os resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da porcentagem de sacarose nas respostas máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e na produtividade.

Tabela 4.23: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da porcentagem de sacarose nas respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

Ensaio	pH	Sacarose (%)	YFOSs (%)	Ypredito YFOSs	Desvio YFOSs (%)	Prod. (g/(L.h))	Ypredito Prod.	Desvio Prod. (%)
1	4,3(-1)	44,3(-1)	6,2	6,8	-9,7	4,2	4,6	-9,5
2	5,7(+1)	44,3(-1)	7,5	10,6	-41,3	4,0	4,6	-15,0
3	4,3(-1)	65,6(1)	5,2	6,8	-30,8	3,0	7,2	-140,0
4	5,7(+1)	65,6(1)	8,1	10,6	-30,9	5,4	7,2	-33,3
5	4(-1,41)	55(0)	9,2	9,9	-7,8	8,8	6,7	23,5
6	6(+1,41)	55(0)	17,3	15,3	11,7	7,8	6,7	13,6
7	5(0)	40(-1,41)	4,5	4,8	-7,7	3,1	3,3	-6,8
8	5(0)	70(+1,41)	9,1	4,8	46,7	10,4	7,0	32,9
9	5(0)	55(0)	12,8	12,6	1,6	12,1	12,7	-5,0
10	5(0)	55(0)	13,5	12,6	6,7	12,5	12,7	-1,6
11	5(0)	55(0)	14,1	12,6	10,6	13,3	12,7	4,5

Sendo Prod. = Produtividade

A maior conversão de sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) ocorreu no ensaio 6 com o pH (tampão acetato) em 6,0 e 55% de sacarose e as maiores produtividades ocorreram nos pontos centrais com o pH 5,0 e 55% de sacarose conforme pode se observar na tabela acima.

A Figura 4.21 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial completo.

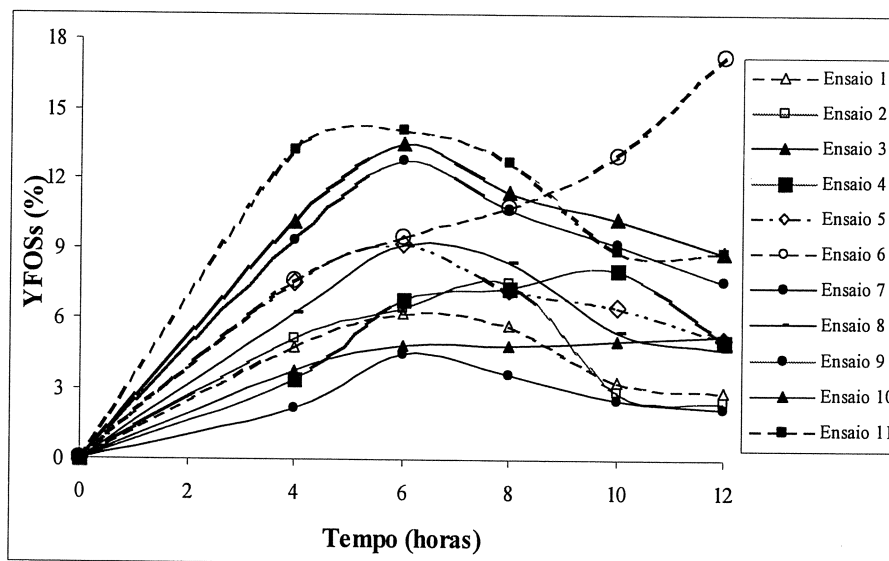


Figura 4.21: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem e verificar a validade do modelo de YFOSs em função das variáveis estudadas através da análise de variância (ANOVA).

Analisando-se a Tabela 4.24 (ANOVA) para as respostas YFOSs e produtividade. Para o modelo codificado, verifica-se que os coeficientes de correlação são 0,85 e 0,86, e o F calculado é 2,5 e 1,6 vezes superior ao F tabelado para 5% de significância, para YFOSs e produtividade, respectivamente. Assim foi possível obter os modelos quadráticos codificados (equações 4.6 e 4.7) que representam o comportamento de YFOSs(%) e produtividade em meio orgânico com enzima livre, utilizando 40°C de temperatura, 4 U/mL de enzima e 25/75 (%) de relação solvente/tampão dentro de uma determinada faixa estudada de pH e de porcentagem de sacarose. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. Os modelos são adequados para descrever as superfícies de resposta tanto de YFOSs(%) quanto da produtividade (Figura 4.22 e Figura 4.23).

Tabela 4.24: Análise de variância para YFOSs e produtividade (g/(L.h)) (Sistema orgânico com enzima livre – Cepa 7571)

Fontes de variação	Somadas de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrados Médios		F calculado	
	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade
Regressão	123,6	118,4	2	3	61,8	39,4	11,1	7,2
Resíduos	44,5	38,2	8	7	5,5	5,4		
Falta de ajuste	43,6	37,5	6	5				
Erro Puro	0,84	0,75	2	2				
Total	168,1	156,6	10	10				

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

YFOSs: $F_{0,95; 2,8} = 4,46$ Coeficiente de correlação: $R = 0,85$

Produtividade: $F_{0,95; 3,7} = 4,35$ Coeficiente de correlação: $R = 0,86$

$$\text{YFOSs}(\%) = 12,6 + 1,9 \text{ pH} - 3,9 (\% \text{sacarose})^2 \quad (4.6)$$

$$\text{Produtividade}(\text{g}/(\text{L.h})) = 12,7 - 3,0(\text{pH})^2 + 1,3(\% \text{sacarose}) - 3,8(\% \text{sacarose})^2 \quad (4.7)$$

O modelo para YFOSs (%) e para a produtividade foram utilizados para construir as superfícies de resposta e as curvas de contorno (Figura 4.22 e Figura 4.23). Verifica-se que, os valores máximos obtidos para YFOSs (%) correspondem a concentração de sacarose em 55% enquanto que o aumento do pH indica um aumento em YFOSs (%). Para melhor verificar este efeito do pH, realizaram-se testes em triplicata nos valores superiores aos estudados e iguais a 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5.

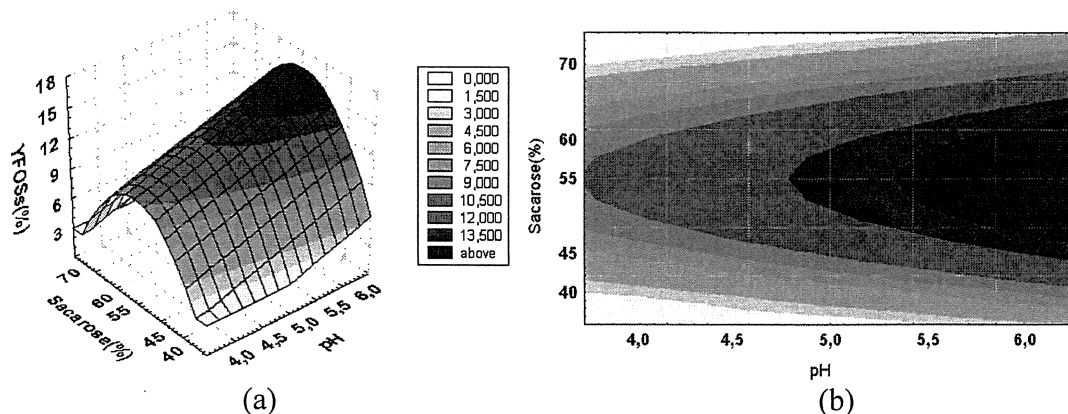


Figura 4.22: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função do pH e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

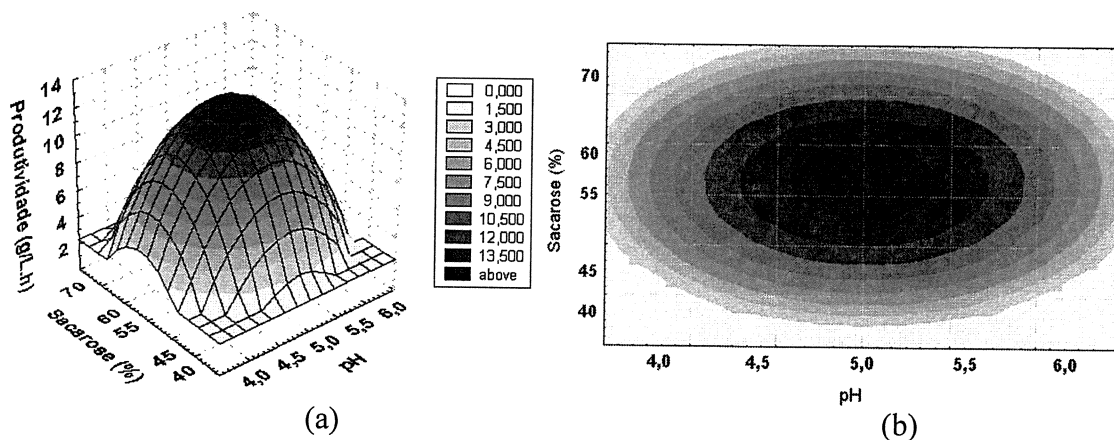


Figura 4.23: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função do pH e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

Assim sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes para o pH (6,0; 6,5; 7,0 e 7,5) foram realizadas a temperatura 40°C, 4U/mL de enzima, relação solvente/tampão de 25/75 (%) e 55% de sacarose. Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” baseado na diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.25 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento.

Tabela 4.25: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Orgânico com enzima livre – Cepa 7571).

Ensaio	YFOSs (%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (6,0)*	16,8			7,2		
1 β (6,0)*	17,8	16,7 ^a	1,1	8,5	7,6 ^d	0,8
1 χ (6,0)*	15,6			7,0		
2 α (6,5)*	14,7			6,2		
2 β (6,5)*	14,2	14,0 ^b	0,7	6,2	6,0 ^e	0,3
2 χ (6,5)*	13,2			5,6		
3 α (7,0)*	8,5			4,9		
3 β (7,0)*	7,0	7,4 ^c	0,9	4,0	4,2 ^f	0,6
3 χ (7,0)*	6,8			3,6		
4 α (7,5)*	5,6			3,0		
4 β (7,5)*	5,0	5,5 ^c	0,4	2,8	3,0 ^f	0,2
4 χ (7,5)*	5,9			3,3		

α , β , χ : são as triplicatas, * pH, ** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Verificou-se através do teste de Tukey que existe diferença estatisticamente significativa entre os pHs tanto para YFOSs como para a produtividade, a não ser entre os pHs 7,0 e 7,5 que não verificou-se diferença estatisticamente significativa.

O pH ideal para YFOSs (%) foi 6,0, e para a produtividade foi 5,0. Assim, é interessante um estudo de custo para a aplicação industrial em trabalhos futuros para se definir o pH de processo.

4.2.2.2. Sistema Aquoso com Enzima Livre da Cepa 7571

Baseado nos resultados anteriores foi realizado um planejamento completo no estudo do pH e da sacarose para a enzima livre em meio aquoso. Na Tabela 4.26 encontram-se os resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da porcentagem de sacarose nas respostas máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e na produtividade.

Tabela 4.26: Resultados do planejamento fatorial no estudo do pH e da porcentagem de sacarose nas respostas YFOSs (%) e produtividade (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).

Ensaio	pH	Sacarose (%)	YFOSs (%)	YFOSs(%) predito pelo modelo	Desvio relativo (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	4,3 (-1)	44,3 (-1)	2,8	6,4	-128,5	1,0
2	5,7 (+1)	44,3 (-1)	4,7	6,4	-36,1	5,3
3	4,3 (-1)	65,6 (+1)	11,4	14,0	-22,8	7,3
4	5,7 (+1)	65,6 (+1)	15,2	14,0	7,8	10,0
5	4,0(-1,41)	55 (0)	13,4	11,1	17,1	17,8
6	6,0 (+1,41)	55 (0)	12,1	11,1	8,2	7,0
7	5,0 (0)	40 (-1,41)	7,0	4,0	42,8	2,5
8	5,0 (0)	70 (+1,41)	15,0	14,7	2,0	11,1
9	5,0 (0)	55 (0)	14,9	14,4	3,3	12,8
10	5,0 (0)	55 (0)	14,5	14,4	0,7	13,7
11	5,0 (0)	55 (0)	13,7	14,4	-5,1	13,0

As maiores conversões de sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) ocorreram nos ensaios 4, 8 e nos pontos centrais e a maior produtividade ocorreu no ensaio 5 com o pH

4,0 e 55% de sacarose. Pode-se observar, na tabela acima, que dependendo da porcentagem de sacarose e do pH a YFOSs pode variar de 2,8 a 15,2%.

Pode-se observar que no ensaio 1 obteve-se um alto desvio relativo em função da menor YFOSs obtida.

A Figura 4.24 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese dos 11 ensaios do planejamento fatorial completo.

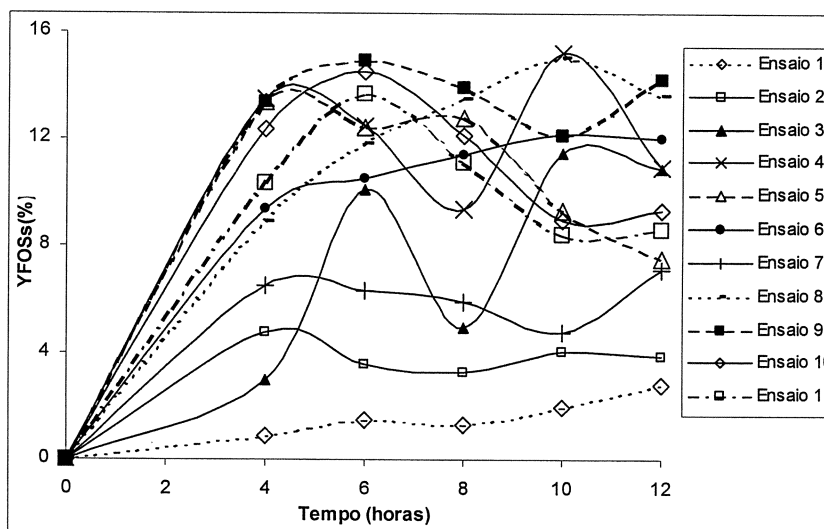


Figura 4.24: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem e verificar a validade dos mesmos através da análise de variância (ANOVA), que está apresentada na Tabela 4.27. Verifica-se que para o modelo codificado, o coeficiente de correlação é de 0,89, e que o F calculado é 2 vezes superior ao F tabelado para 5% de significância. Assim foi possível obter o modelo quadrático codificado (equação 4.8) que representa o comportamento de YFOSs (%) em meio aquoso, utilizando 4U/mL de enzima, e 40°C de temperatura, dentro de uma determinada faixa estudada de pH e porcentagem de sacarose. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. O modelo é adequado para descrever a superfície de resposta de YFOSs (%).

$$\text{YFOSs}(\%) = 14,37 - 1,64(\text{pH})^2 + 3,8 (\% \text{sacarose}) - 2,51 (\% \text{sacarose})^2 \quad (4.8)$$

Tabela 4.27: Análise de variância para YFOSs para sistema aquoso com enzima livre – Cepa 7571

Fontes de variação	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	155,62	3	51,87	9,05
Resíduos	40,14	7	5,73	
Falta de ajuste	39,4	5		
Erro puro	0,74	2		
Total	195,7	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

$F_{0,95; 3; 7} = 4,35$

Coefficiente de correlação: $R = 0,89$

O modelo para YFOSs (%) foi utilizado para construir a superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 4.25). Verifica-se que, os valores máximos obtidos para YFOSs (%) correspondem a pH 5,0 e uma faixa de concentração de sacarose entre 55 a 70%. Para validar estes resultados, realizaram-se testes em triplicata fixando o pH em 5,0 e a sacarose foi estudada em 55 e 65%.

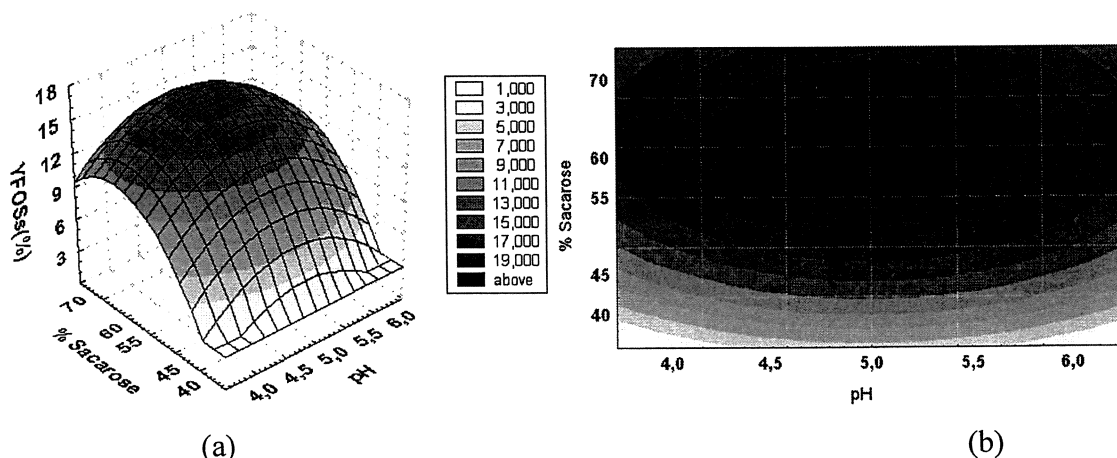


Figura 4.25: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função do pH e da sacarose (%), (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).

Assim 2 sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando 55 e 65% de sacarose e pH 5,0, foram realizadas a temperatura 40°C e 4U/mL de atividade enzimática.

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” baseado na diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.28 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento.

Tabela 4.28: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima livre – Cepa 7571).

Ensaio	YFOSs (%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (55)*	12,8			11,5		
1 β (55)*	11,9	12,8 ^a	1,0	11,2	11,5 ^a	0,3
1 χ (55)*	13,9			11,9		
2 α (65)*	16,0			10,8		
2 β (65)*	16,8	15,2 ^a	2,0	10,7	10,0 ^a	1,2
2 χ (65)*	13,0			8,6		

α , β , χ : são as triplicatas

* Valores de porcentagem de sacarose

** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Verificou-se através do teste de Tukey que não existe diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de sacarose tanto na resposta YFOSs quanto na produtividade.

A porcentagem de sacarose ideal foi de 55% já que não existe diferença então esta foi selecionada pelo menor custo.

4.2.2.3. Sistema Orgânico com Enzima Imobilizada

Primeiro Planejamento Fatorial Fracionado (2^{6-2})

Utilizando enzima imobilizada em meio orgânico, foi realizado primeiramente um planejamento fracionário para avaliar o efeito das 6 variáveis (temperatura, pH, porcentagem de sacarose, enzima (U/mL), a relação solvente/tampão (%) e o estabilizante PEG (%), nas respostas YFOSs e produtividade.

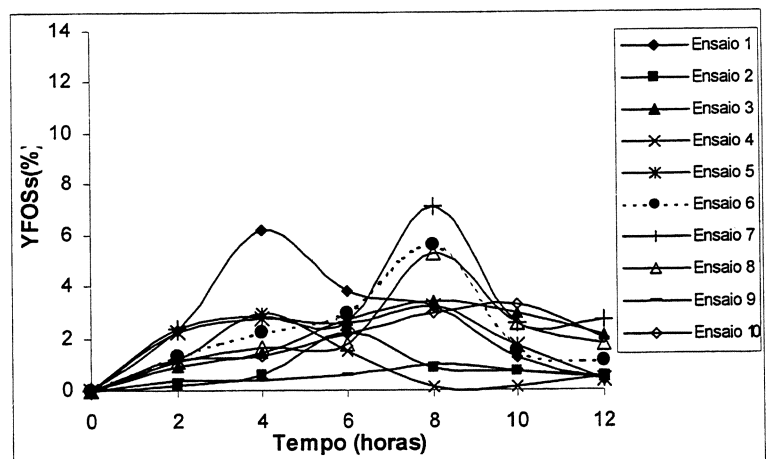
A Tabela 4.29 apresenta a matriz do planejamento 2^{6-2} com as respostas YFOSs e produtividade.

Pode-se observar que dentre os 19 ensaios realizados a YFOSs variou de 1,0 a 13,0% de acordo com as condições da síntese. Verificou-se que a produção de 13,0% foi atingida no ensaio 14, com temperatura de 50°C, pH igual a 5, atividade enzimática de 6 U/mL, 70% de sacarose, relação solvente/ tampão de 25/75 e 0% de PEG.

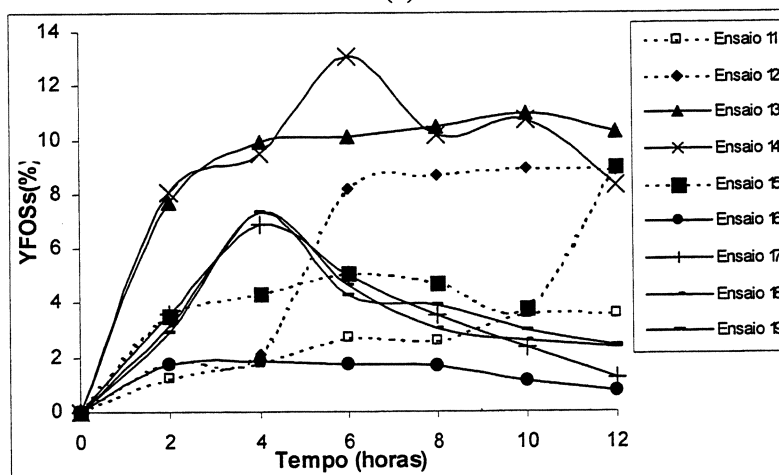
Tabela 4.29: Matriz do planejamento e as respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Ensaio	T (°C)	pH	Sacarose (%)	Enzima (U/mL)	Solvente/tampão	PEG (%)	YFOSs (%)	Produtividade (g/(L.h))
1	30 (-1)	5(-1)	50(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	6,1	8,0
2	50(+1)	5(-1)	50(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	2,2	1,8
3	30 (-1)	7(1)	50(-1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	3,4	2,0
4	50(+1)	7(1)	50(-1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	2,9	3,7
5	30(-1)	5(-1)	70(1)	4 (-1)	50/50(+1)	4(+1)	3,2	2,7
6	50(+1)	5(-1)	70(1)	4 (-1)	25/75(-1)	4(+1)	5,6	4,8
7	30(-1)	7(1)	70(1)	4 (-1)	25/75(-1)	0(-1)	7,1	6,3
8	50(+1)	7(1)	70(1)	4 (-1)	50/50(+1)	0(-1)	5,3	4,8
9	30(-1)	5(-1)	50(-1)	6 (1)	25/75(-1)	4(+1)	1,0	0,6
10	50(+1)	5(-1)	50(-1)	6 (1)	50/50(+1)	4(+1)	3,2	1,7
11	30(-1)	7(1)	50(-1)	6 (1)	50/50(+1)	0(-1)	3,6	1,5
12	50(+1)	7(1)	50(-1)	6 (1)	25/75(-1)	0(-1)	8,9	4,3
13	30(-1)	5(-1)	70(1)	6 (1)	50/50(+1)	0(-1)	10,9	7,8
14	50(+1)	5(-1)	70(1)	6 (1)	25/75(-1)	0(-1)	13,0	16,0
15	30(-1)	7(1)	70(1)	6 (1)	25/75(-1)	4(+1)	8,9	5,1
16	50(+1)	7(1)	70(1)	6 (1)	50/50(+1)	4(+1)	1,8	3,1
17	40(0)	6(0)	60(0)	5 (0)	40/60(0)	2(0)	6,8	10,7
18	40(0)	6(0)	60(0)	5 (0)	40/60(0)	2(0)	7,3	10,6
19	40(0)	6(0)	60(0)	5 (0)	40/60(0)	2(0)	7,3	11,4

A Figura 4.26 (a e b) permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 19 ensaios do planejamento fatorial.



(a)



(b)

Figura 4.26: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os ensaios de 1 a 10 (a) e os ensaios de 11 a 19 (b) do primeiro planejamento fatorial (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

A Tabela 4.30 apresenta os efeitos das variáveis sendo que o efeito da temperatura não foi estatisticamente significativo, por isso foi fixada em 40°C. O pH não foi estatisticamente significativo para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e teve um efeito negativo e significativo para a produtividade por isso foi fixado na condição inferior pH 5, a qual apresentou menor risco de contaminação microbiana.

A porcentagem de sacarose apresentou efeito positivo e estatisticamente significativo a 5% de significância, indicando que ao passar de 50 para 70% de sacarose ocorreu um

aumento nas respostas YFOSs e na produtividade, por isso a faixa estudada foi deslocada para níveis superiores até 80%.

A enzima apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo, indicando que um incremento nos seus valores provoca o aumento na conversão YFOSs, por isso os níveis de estudo foram deslocados para níveis superiores até 7 U/mL.

A relação solvente/tampão apresentou efeito estatisticamente significativo e negativo na conversão YFOSs e na produtividade, por isso foi fixada na condição inferior 25/75(%).

Enquanto que o PEG apresentou efeito negativo e estatisticamente significativo tanto para a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) quanto para a produtividade indicando que sua presença não favoreceu nenhuma das respostas desejadas, podendo ser eliminado da reação, já que o nível -1 estudado correspondia a zero por cento de PEG.

Tabela 4.30: Estimativa dos efeitos para YFOSs e produtividade para sistema orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571

	YFOSs(%)				Produtividade(g/(L.h))			
	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	Valor p	Efeito	Desvio padrão	t(2)	Valor p
Média	5,7	0,05	96,04	0,0001	5,66	0,097	58,24	0,0002
Temperatura (°C)	-0,16	0,13	-1,22	0,344	0,78	0,21	3,68	0,066
pH	-0,42	0,13	-3,22	0,084	-1,57*	0,21	-7,44	0,017
Sacarose (%)	3,05*	0,13	23,46	0,0018	3,37*	0,21	15,93	0,0039
Enzima (U/mL)	1,94*	0,13	14,9	0,0044	0,75	0,21	3,56	0,0704
Solvente/Tampão	-2,47*	0,13	-19,01	0,0027	-2,93*	0,21	-13,86	0,0051
PEG	-3,37*	0,13	-25,92	0,0014	-3,36*	0,21	-15,89	0,0039

*fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$)

Assim, a porcentagem de sacarose e a enzima (U/mL) foram selecionadas e estudadas utilizando um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes).

Planejamento fatorial completo

Na Tabela 4.31 encontram-se os resultados do planejamento fatorial no estudo da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e na produtividade.

Tabela 4.31: Resultados do planejamento fatorial no estudo da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas YFOSs e produtividade (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Ensaio	Enzima (U/mL)	Sacarose (%)	YFOSs (%)	Ypredito	Desvio (%)	Produtividade (g/(L.h))	Ypredito	Desvio (%)
1	4,4(-1)	45,8(-1)	7,6	11,7	-53,9	8,8	9,2	-4,2
2	6,5(+1)	45,8(-1)	8,8	9,7	-10,2	9,5	4,4	54,0
3	4,4(-1)	74,1(1)	5,9	11,7	-98,3	11,1	19,7	-77,4
4	6,5(+1)	74,1(1)	8,5	9,7	-14,1	5,4	14,9	-175,7
5	4(-1,41)	60(0)	13,9	8,1	41,9	14,3	9,6	33,1
6	7(+1,41)	60(0)	5,4	5,3	2,7	4,3	2,8	35,0
7	5,5(0)	40(-1,41)	17,4	14,8	14,9	5,5	10,6	-93,3
8	5,5(0)	80(+1,41)	17,9	14,8	17,2	36,6	25,5	30,4
9	5,5(0)	60(0)	16,6	17,4	-4,8	24,1	26,0	-7,9
10	5,5(0)	60(0)	18,2	17,4	4,4	28,7	26,0	9,4
11	5,5(0)	60(0)	17,3	17,4	-0,6	24,9	26,0	-4,4

A maior conversão de sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) ocorreu no ensaio 10 com 60% de sacarose e 5,5U/mL de enzima e a maior produtividade ocorreu no ensaio 8 com 80% de sacarose e 5,5U/mL de enzima conforme pode se observar na tabela acima.

A Figura 4.27 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial completo.

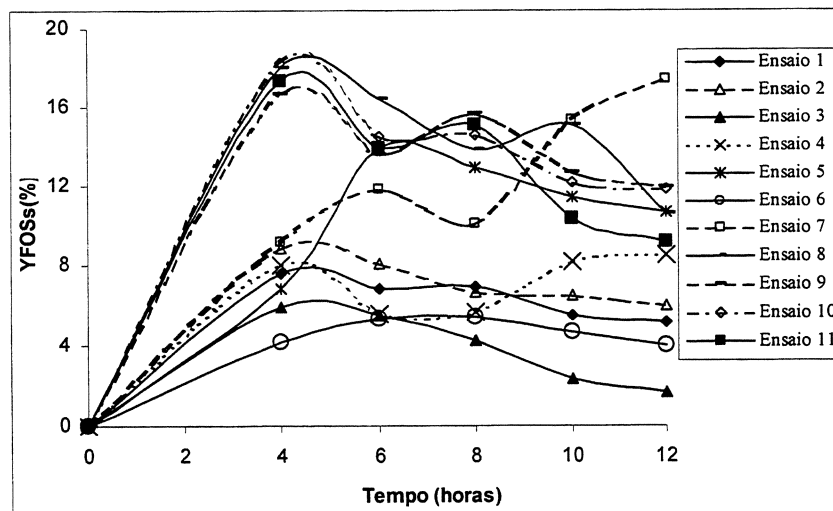


Figura 4.27: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem e verificar a validade dos mesmos através da análise de variância (ANOVA).

Analisando-se a Tabela 4.32 (ANOVA) para YFOSs e para a produtividade para o modelo codificado, verifica-se que o coeficiente de correlação é de 0,78 e 0,82, e que o F calculado é 1,2 e 1,0 vezes superior ao F tabelado para 10% de significância, respectivamente. Assim foi possível obter os modelos quadráticos codificado (equações 4.9 e 4.10) que representam o comportamento de YFOSs(%) em meio orgânico, utilizando 40°C de temperatura, pH igual a 5 e 25/75 (%) de relação solvente/tampão dentro de uma determinada faixa estudada de porcentagem de sacarose e de enzima (U/mL). Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. Os modelos para YFOSs(%) e para a produtividade não foram tão adequados quanto os outros modelos obtidos nos demais planejamentos realizados durante este trabalho, no entanto os maiores valores de YFOSs e produtividade foram obtidos nos pontos centrais, onde se tem menor erro e reprodução. Portanto, para a validação destes resultados foram realizados 3 ensaios em triplicata para confirmação do resultado.

Tabela 4.32: Análise de variância para YFOSs e para a produtividade para sistema orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571

Fontes de variação	Somadas de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrados Médios		F calculado	
	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade
Regressão	171,8	833,3	3	4	57,3	208,3	3,84	3,31
Resíduos	104,4	377,0	7	6	14,9	62,8		
Falta de ajuste	103,2	365,1	5	4				
Erro Puro	1,21	11,91	2	2				
Total	276,2	1210,4	10	10				

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

YFOSs: $F_{0,90; 3,7} = 3,07$ Coeficiente de correlação: $R = 0,78$

Produtividade: $F_{0,90; 4,6} = 3,18$ Coeficiente de correlação: $R = 0,82$

$$\text{YFOSs(\%)} = 17,4 - 1,0 (\text{atividade enzimática}) - 5,4 (\text{atividade enzimática})^2 - 1,3(\text{sacarose})^2 \quad (4.9)$$

$$\text{Produtividade(g/(L.h))} = 26 - 2,4(\text{atividade enzimática}) - 9,97(\text{atividade enzimática})^2 + 5,26(\% \text{sacarose}) - 4,0(\text{sacarose})^2 \quad (4.10)$$

Os modelos para YFOSs (%) e para a produtividade foram utilizados para construir as superfícies de resposta e as curvas de contorno (Figura 4.28 e Figura 4.29). Verifica-se que, os valores máximos obtidos para YFOSs (%) correspondem a atividade enzimática na faixa de 5,5 U/mL e a sacarose não influenciou na conversão. Para melhor verificar o efeito da porcentagem de sacarose, realizaram-se testes em triplicata nos valores de sacarose iguais a 40; 60 e 80% de sacarose.

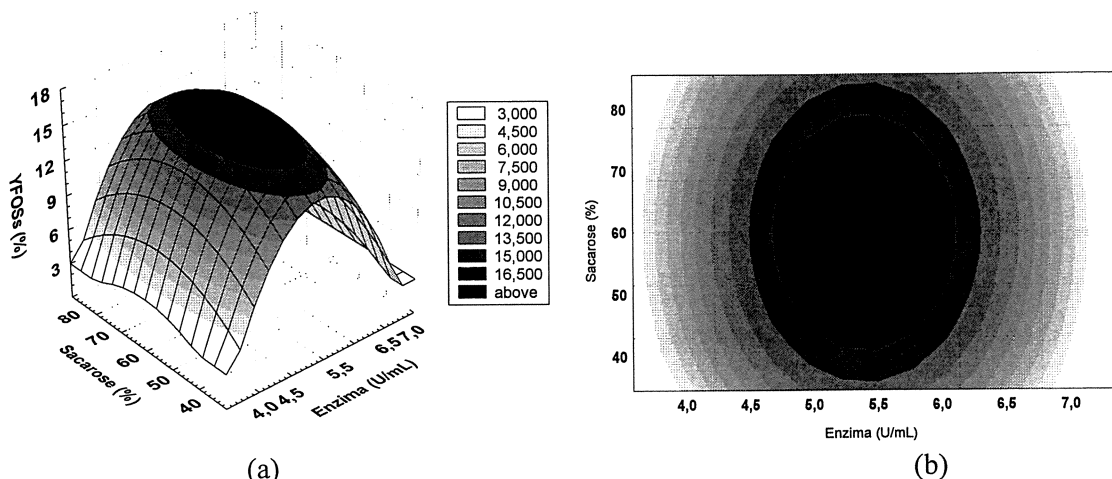


Figura 4.28: Superfícies de resposta para a Y_{FOSs} (%) (a) e curvas de contorno para a Y_{FOSs}(%) em função da enzima (U/mL) e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

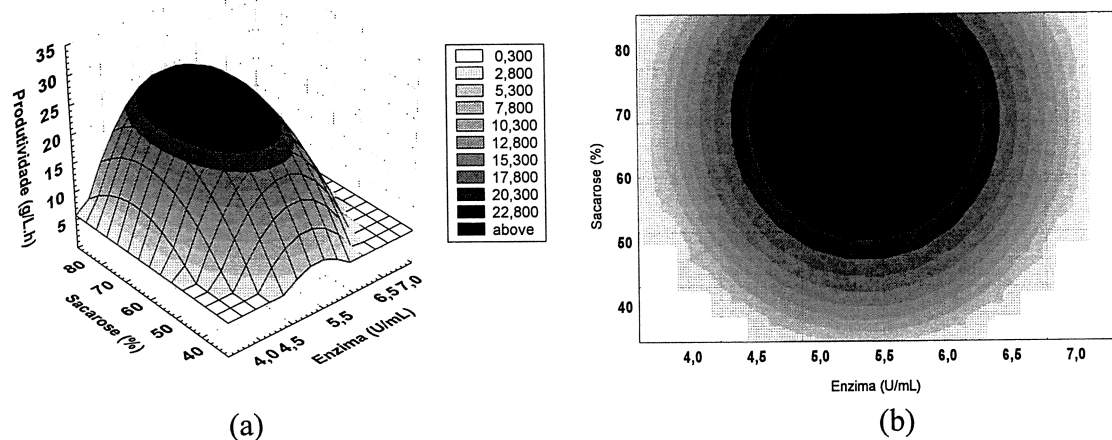


Figura 4.29: Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função da enzima (U/mL) e da sacarose (%), (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Assim sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes para a porcentagem de sacarose (40; 60 e 80%) foram realizadas a temperatura 40°C, 5,5 U/mL de enzima, pH 5,0 e relação solvente/tampão de 25/75 (%).

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” baseado na diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.33 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento.

Tabela 4.33: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Orgânico com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Ensaio	YFOSs (%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (40)*	15,2			6,4		
1 β (40)*	13,9	13,8 ^a	1,4	5,3	5,6 ^c	0,7
1 χ (40)*	12,4			5,1		
2 α (60)*	18,5			29,6		
2 β (60)*	19,0	18,2 ^b	0,9	26,7	27,8 ^d	1,5
2 χ (60)*	17,2			27,1		
3 α (80)*	11,0			15,6		
3 β (80)*	11,5	11,5 ^a	0,5	14,4	15,5 ^e	1,1
3 χ (80)*	12,0			16,7		

α , β , χ : são as triplicatas

* porcentagem de sacarose

** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Verificou-se através do teste de Tukey que existe diferença estatisticamente significativa a 5% de significância entre a porcentagem de 60 com a de 40 e 80% na resposta YFOSs enquanto que na resposta produtividade existe diferença estatisticamente significativa entre as três porcentagens de sacarose.

A porcentagem de sacarose ideal para a síntese foi de 60%, para ambas as respostas, abaixo ou acima deste valor ocorreu um decréscimo nas duas respostas

4.2.3. Sistema Aquoso com Enzima Imobilizada da Cepa 7571

Na Tabela 4.34 encontram-se os resultados do planejamento fatorial no estudo da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas máxima conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) e na produtividade.

Tabela 4.34: Resultados do planejamento fatorial no estudo da porcentagem de sacarose e da enzima nas respostas YFOSs e produtividade, (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Ensaio	Enzima (U/mL)	Sacarose (%)	YFOSs (%)	Ypredito YFOSs	Desvio (%)	Produtividade	Ypredito Produt.	Desvio (%)
1	4,4(-1)	45,8(-1)	9,5	10,5	-10,0	4,1	5,4	-31,5
2	6,5(+1)	45,8(-1)	10,3	11,8	-14,5	4,8	5,6	-16,5
3	4,4(-1)	74,1(1)	11,5	12,0	-4,3	10,9	10,2	6,1
4	6,5(+1)	74,1(1)	6,8	7,9	-15,4	6,5	5,4	17,7
5	4(-1,41)	60(0)	16,5	15,9	3,5	11,9	11,1	6,3
6	7(+1,41)	60(0)	15,4	13,9	9,4	7,9	7,9	0,6
7	5,5(0)	40(-1,41)	8,3	6,9	16,4	3,6	2,2	39,1
8	5,5(0)	80(+1,41)	5,9	5,2	11,1	4,1	5,4	-32,6
9	5,5(0)	60(0)	8,8	9,3	-5,3	8,5	9,5	-11,8
10	5,5(0)	60(0)	9,3	9,3	0,3	9,1	9,5	-4,4
11	5,5(0)	60(0)	9,7	9,3	4,4	10,2	9,5	6,9

A Figura 4.30 permite uma melhor visualização de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese nos 11 ensaios do planejamento fatorial completo.

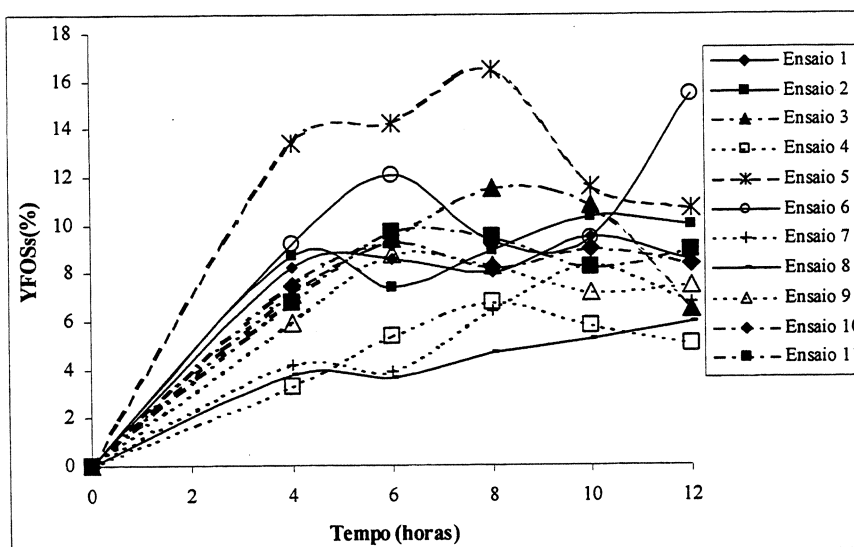


Figura 4.30: Acompanhamento de YFOSs ao longo das 12 horas de síntese para os 11 ensaios do planejamento fatorial completo (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem e verificar a validade dos mesmos através da análise de variância (ANOVA).

Analizando-se a Tabela 4.35 (ANOVA) para as respostas YFOSs e produtividade para o modelo codificado, verifica-se que o coeficiente de correlação é de 0,95 e 0,94; e que o F calculado é 3,0 e 3,7 vezes superior ao F tabelado para 10% de significância, respectivamente. Assim foi possível obter os modelos quadráticos codificados (equações 4.11 e 4.12) que representam o comportamento de YFOSs (%) e da produtividade em meio aquoso, utilizando 40°C de temperatura e pH 5,0 dentro de uma determinada faixa estudada de porcentagem de sacarose e de enzima (U/mL). Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. O modelo é adequado para descrever as superfícies de resposta de YFOSs (%) e da produtividade.

Tabela 4.35: Análise de variância para YFOSs e produtividade para sistema aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571

Fontes de variação	Somadas de Quadrados		Graus de liberdade		Quadrados Médios		F calculado	
	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade	YFOSs	Produtividade
Regressão	96	78,4	5	4	19,2	19,6	10	11,7
Resíduos	9,6	10,0	5	6	1,9	1,67		
Falta de ajuste	9,2	8,5	3	4				
Erro Puro	0,40	1,5	2	2				
Total	105,6	88,4	10	10				

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

YFOSs: $F_{0,90; 5,5} = 3,45$ Coeficiente de correlação: $R = 0,95$

Produtividade: $F_{0,90; 4,6} = 3,18$ Coeficiente de correlação: $R = 0,94$

$$\text{YFOSs}(\%) = 9,27 - 0,7 (\text{enzima}) + 2,85 (\text{enzima})^2 - 0,6* (\% \text{sacarose}) - 1,6 (\% \text{ Sacarose})^2 - 1,37* (\text{enzima}) * (\% \text{ sacarose}) \quad (4.11)$$

$$\text{Produtividade}(\text{g}/(\text{L.h})) = 9,5 - 1,17 (\text{enzima}) + 1,15 (\% \text{sacarose}) - 2,86 (\% \text{sacarose})^2 - 1,27* (\text{enzima}) * (\% \text{sacarose}) \quad (4.12)$$

O modelo para YFOSs e para a produtividade foram utilizados para construir as superfícies de resposta e as curvas de contorno (Figura 4.31 e Figura 4.32). Verifica-se que, os valores máximos obtidos correspondem a sacarose na faixa de 60 a 70%. Para melhor verificar este efeito da sacarose e da enzima, realizaram-se testes em triplicata nos valores de 40; 60 e 80% de sacarose com enzima de 5,5U/mL. Além disso, realizaram-se outros testes em triplicata nos valores de 4,0; 5,5 e 7,0U/mL com 60% de sacarose para melhor verificar o efeito da enzima.

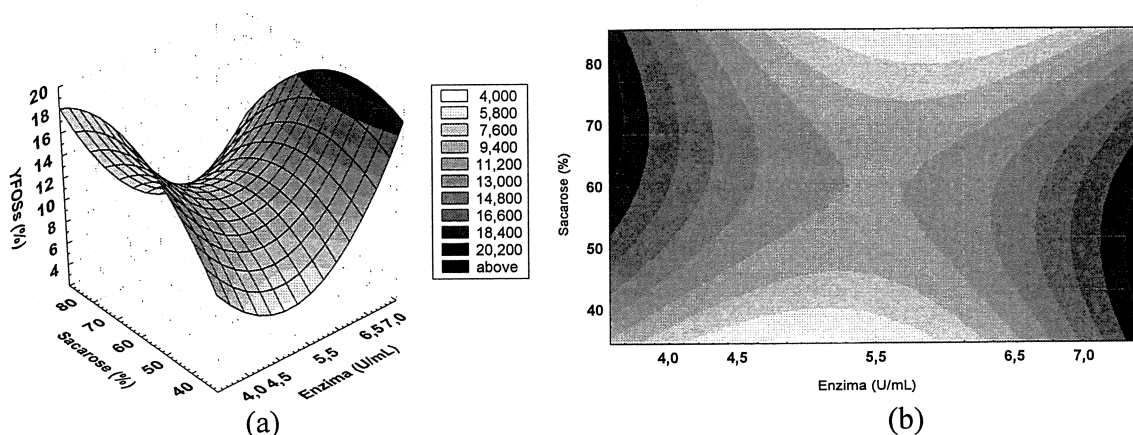


Figura 4.31: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a YFOSs (%) em função da enzima e da sacarose(%), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).

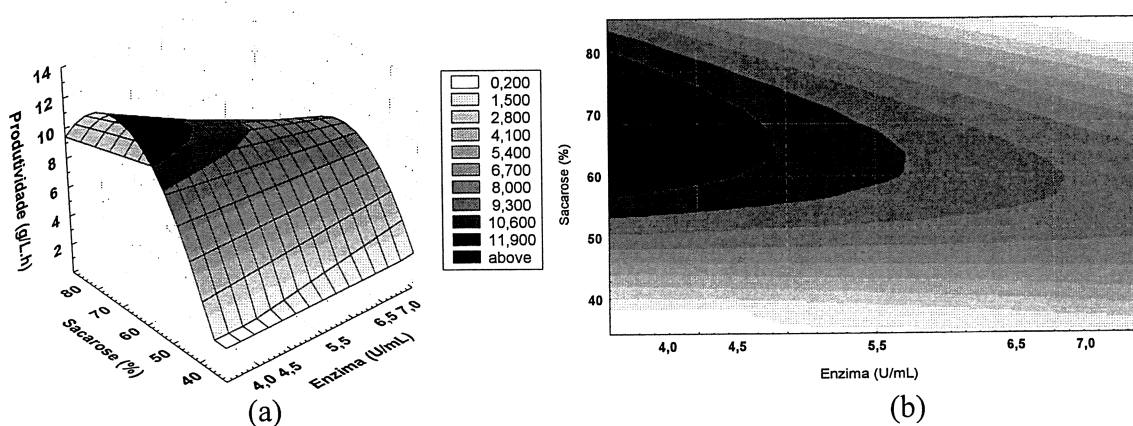


Figura 4.32: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno para a produtividade em função da enzima e da sacarose(%), (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Assim sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes para a porcentagem de sacarose (40; 60 e 80%) foram realizadas a temperatura 40°C, pH 5,0 e 5,5 U/mL de enzima.

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” baseado na diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.36 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento.

Tabela 4.36: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Ensaio	YFOSs (%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (40)*	10,7			4,9		
1 β (40)*	11,4	10,6 ^a	0,8	6,0	5,1 ^c	0,7
1 χ (40)*	9,7			4,6		
2 α (60)*	13,5			12,8		
2 β (60)*	12,8	12,6 ^a	0,9	13,2	12,8 ^d	0,4
2 χ (60)*	11,7			12,4		
3 α (80)*	6,8			5,8		
3 β (80)*	5,5	6,5 ^b	0,9	4,2	5,2 ^c	0,9
3 χ (80)*	7,3			5,7		

α , β , χ : são as triplicatas
* porcentagem de sacarose

**Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A máxima YFOSs obtida foi utilizando 60% de sacarose, mas como através do teste de Tukey pode-se verificar que não existe diferença estatisticamente significativa a 5% de significância entre a porcentagem de sacarose de 40 e 60 então a opção selecionada foi a de 40% por menor custo, mas por outro lado terá menor produtividade nesta porcentagem, pois para esta resposta existe diferença estatisticamente significativa entre 40 e 60%.

Além disso, realizaram-se outras sínteses em triplicata (α , β , χ), utilizando condições diferentes para a enzima (4,0; 5,5 e 7,0U/mL), estas foram realizadas a temperatura 40°C, pH 5,0 e 60% de sacarose.

Realizou-se o teste de Tukey do tipo “HSD” baseado na diferença entre médias para verificar se existe diferença significativa entre as condições estudadas. A Tabela 4.37 apresenta os valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada tratamento.

Tabela 4.37: Valores de YFOSs, produtividade, médias e desvio padrão referentes a cada ensaio (Sistema Aquoso com enzima imobilizada – Cepa 7571).

Ensaio	YFOSs (%)	Média **	Desvio Padrão	Produtividade (g/(L.h))	Média **	Desvio Padrão
1 α (4,0)*	17,0			9,7		
1 β (4,0)*	15,9	16,8 ^a	0,9	9,9	10,2 ^c	0,7
1 χ (4,0)*	17,7			11,1		
2 α (5,5)*	10,2			9,8		
2 β (5,5)*	11,8	10,6 ^b	1,0	11,6	10,5 ^c	0,9
2 χ (5,5)*	9,8			10,2		
3 α (7,0)*	12,8			10,1		
3 β (7,0)*	13,5	12,6 ^b	0,9	9,5	9,5 ^c	0,5
3 χ (7,0)*	11,6			9,0		

α , β , χ : são as triplicatas

* enzima

**Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p $\leq$ 0,05) pelo teste de Tukey.

Verificou-se através do teste de Tukey que não existe diferença estatisticamente significativa entre 5,5 e 7,0U/mL para YFOSs mas existe diferença entre 4U/mL, e as outras condições. Enquanto que para a produtividade não existe diferença estatisticamente significativa entre as condições estudadas.

A atividade enzimática ideal para a síntese foi a de 4U/mL, para ambas as respostas, por ter apresentado maior YFOSs e menor custo.

Para os diferentes tipos de sistemas estudados as máximas YFOSs(%) foram as seguintes:

Para a cepa ATCC 16045 utilizando a enzima na forma livre a máxima YFOSs obtida foi de 13,5 e 11,9%, nos sistemas orgânico e aquoso, respectivamente. Enquanto que para a enzima na forma imobilizada os resultados foram os seguintes: 18,7 e 15,3, sistema

orgânico e aquoso, respectivamente.

Para a cepa NRRL Y-7571 utilizando a enzima na forma livre a máxima YFOSs obtida foi de 16,7 e 15,2%, nos sistemas orgânico e aquoso, respectivamente. Enquanto que para a enzima na forma imobilizada os resultados foram os seguintes: 18,2 e 16,8, sistema orgânico e aquoso, respectivamente.

Estas máximas conversões da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs (%) obtidas neste trabalho tanto a partir da cepa 16045 quanto da NRRL Y-7571 são suficientes para serem adicionadas em um alimento.

Santos (2002) verificou que a inulinase apresentava uma ação hidrolítica, além daquela de transfrutossilacção.

A conversão da sacarose em frutooligossacarídeos em meio orgânico, a partir das cepas ATCC 16045 e NRRL Y-7571, apresentou o mesmo mecanismo de conversão que em meio aquoso. Apesar do meio orgânico ser responsável por mudar o equilíbrio da reacção em direcção a hidrólise reversa, esta condição não foi suficiente para aumentar significativamente a reacção de síntese pois a actividade hidrolítica da enzima foi mais significativa que a de transferência.

A sacarose actuou tanto como doadora quanto acceptora, verificou-se a formação de glicose, frutose, kestose, nistose e 1-fructosilnistose, sendo que a produção deste último foi mínima. A inulinase obtida por ambas as cepas apresentou o mesmo comportamento, ou seja a enzima apresentou tanto acção hidrolítica quanto de transferência, mas vale ressaltar que a hidrolítica actuou de maneira mais significativa, mas ambas actuaram simultaneamente durante um determinado tempo da cinética, ocorrendo a formação de glicose, frutose, kestose, nistose e 1-fructosilnistose.

Na literatura utilizando-se solventes orgânicos na síntese de frutooligossacarídeos a partir de leveduras, a produção máxima obtida pelos autores Somiari & Bielecki (1998) foi de 3,1% e 12,1% utilizando-se SDS (Lauril Sulfato de Sódio).

Em meio aquoso a produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose, obtida por Somiari & Bielecki, (1995), foi de 4,8% depois de 24 horas de reacção. Os frutooligossacarídeos foram obtidos a partir da enzima β -D-fructofuranosidase obtida da Novo Nordisk Ferment Ltd.

Na literatura pode-se observar que as máximas produções de frutooligossacarídeos são obtidas na maior parte a partir de fungos como por exemplo o microrganismo *Aspergillus*, o qual é bem mais trabalhoso e dispendioso devido a dificuldade de processo por ser um fungo filamentoso e pela enzima ser intracelular, enquanto neste trabalho a produção foi realizada a partir de uma levedura *Kluyveromyces* a qual apresenta vantagens em relação ao *Aspergillus*, pois ela é um microrganismo de fácil manipulação e esta produz diretamente a enzima desejada. Além disso, a inulinase em forma imobilizada pode ser reutilizada diversas vezes, sem prejuízo da sua ação, a única desvantagem é o menor rendimento quando comparado com o *Aspergillus*, o qual apresenta um rendimento de em média 40%.

5. Resultados da Caracterização da enzima livre para as cepas *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571

5.1. Influência da temperatura na atividade enzimática

Os resultados obtidos da atividade enzimática na presença do solvente orgânico, (25, 50 e 70%) acetato de butila, a diferentes temperaturas de 30 a 70°C estão apresentados na Tabela 5.2 e na Figura 5.1.

Na Figura 5.1(a) podemos observar que a enzima para a cepa ATCC 16045 apresentou atividade máxima na temperatura de 55°C independente da porcentagem de solvente utilizada. Para temperaturas acima de 55°C a enzima perde rapidamente a atividade devido a desnaturação. Enquanto que para a NRRL Y-7571 (Figura 5.1b) a atividade máxima foi na temperatura de 50°C independente da porcentagem de solvente utilizada, acima desta a enzima perde rapidamente a atividade.

Santos (2002), obteve com a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 um máximo de atividade a 63°C em meio aquoso, para temperaturas acima de 63°C a enzima perdia rapidamente a atividade. Segundo Schneider citado por Santos (2002), trabalhando com a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 obteve um máximo de atividade a 55°C.

Vários estudos de temperatura ótima foram realizados com outros microrganismos conforme pode se observar na Tabela 5.1, sendo que para todas as referências o estudo da temperatura ótima foi realizado em meio aquoso.

Tabela 5.1: Valores obtidos de temperatura ótima por outros autores para enzimas de diferentes cepas

Gênero	Espécie/ Variedade	Temperatura Ótima (°C)	Referência	Observações
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i> NRRL Y-7571	65	Makino (2001)	Inulinase livre
	<i>marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .	55	Kushi <i>et al</i> , (2000)	Inulinase extracelular
	<i>marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> CDBB-L-278	60	Barranco <i>et al.</i> , (2001)	Inulinase
	<i>fragilis</i> e <i>Cândida</i> espécie	45 a 55	Zittan & Bagsvaerd, (1981)	Inulinase
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i> ATCC 20611	50-60	Hirayama <i>et al.</i> ; (1989)	βfrutofurano-sidase
	<i>japonicus</i> ;	60	Cheng <i>et al.</i> , (1996)	-
	<i>ficuum</i>	60	Ettalibi & Baratti, (2001)	Inulinase livre
	<i>Niger</i>	50 e 55	L'Hocine <i>et al.</i> , (2000)	Frutossiltrans-ferase e invertase
<i>Penicillium</i>	<i>rugulosum</i>	55	Barthomeuf <i>et al.</i> , (1991)	-
	<i>pullulans</i>	55	Jung <i>et al.</i> , (1989)	Frutossiltrans-ferase
<i>Aureobasidium</i>	<i>stearothermophilus</i> KP 1289	60	Kato <i>et al.</i> , (1999)	-
<i>Bacillus</i>				
<i>Fusarium</i>				
<i>Arthrobacter</i>	<i>Oxysporum</i>	35 a 45	Kaur <i>et al.</i> ; (1992)	Inulinase
	-	50	Kang <i>et al.</i> , (1998)	Endo-inulinase

5.1.1. Determinação da Energia de Ativação

Utilizando a equação de Arrhenius, na forma linearizada, determinou-se a energia de ativação. Na Tabela 5.3 estão apresentados os dados experimentais utilizados para a determinação da Ea (energia de ativação) para a enzima livre na presença de 25, 50 e 70% de solvente. Para o cálculo da Ea, construiu-se o gráfico $\ln(A)$ em função do inverso da temperatura, que representa a forma linearizada de Arrhenius conforme pode se observar na Figura 5.2.

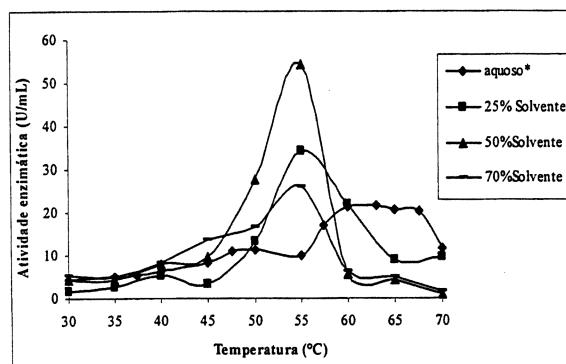
Segundo Makino (2001) a energia de ativação necessária foi de 8,9 Kcal/mol, utilizando a NRRL Y-7571 e a sacarose como substrato, mas em meio aquoso.

A energia de ativação obtida por (Ettalibi & Baratti, 2001) foi de 29,4 KJ/mol para a inulinase livre, a qual foi obtida a partir do *Aspergillus ficuum*.

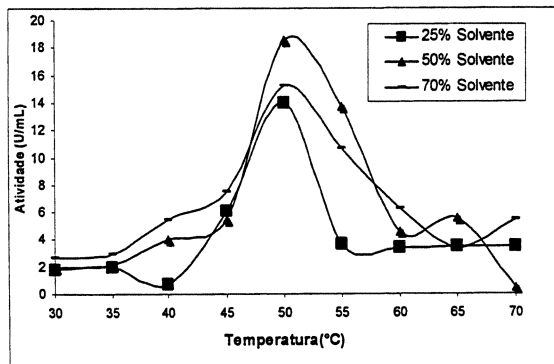
Santos (2002) obteve uma energia de ativação de 16,4 Kcal/mol em meio aquoso, para a ATCC 16045 e utilizando como substrato a sacarose. Conforme pode se observar na Tabela 5.4 a energia de ativação necessária na presença de solvente acetato de butila é de praticamente o dobro da energia em relação ao aquoso para as duas cepas.

Tabela 5.2: Atividade enzimática em função da temperatura, para a inulinase livre, das duas cepas, na presença de 25, 50 e 70% de acetato de butila

Temperatura (°C)	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
	Atividade (U/mL)			Atividade (U/mL)		
	25%	50%	70%	25%	50%	70%
30	1,6	4,1	5,4	1,7	1,9	2,6
35	2,6	4,5	4,9	2,0	2,1	2,9
40	5,3	7,9	8,2	0,7	4,0	5,4
45	3,4	9,7	13,8	6,1	5,4	7,5
50	13,1	27,5	16,7	14,0	18,5	15,2
55	34,2	54,2	25,9	3,7	13,7	10,7
60	21,8	5,7	6,3	3,3	4,5	6,2
65	8,9	4,4	4,9	3,5	5,5	3,3
70	9,6	1,0	1,6	3,4	0,4	5,4



(a)



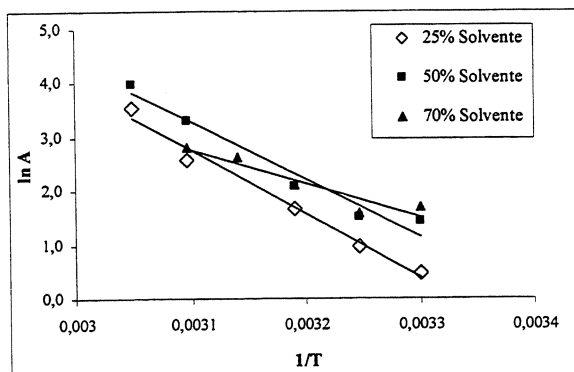
(b)

*Santos (2002)

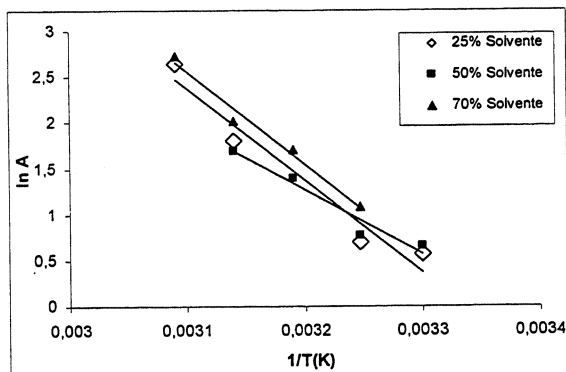
Figura 5.1: Efeito da temperatura na atividade da inulinase livre na presença de acetato de butila (a) Cepa ATCC 16045 e (b) Cepa NRRL Y-7571.

Tabela 5.3: Atividade enzimática da inulinase livre, das duas cepas, na presença de 25; 50 e 70% de solvente, em função da temperatura

	T(°C)	T(K)	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
			A (U/mL)	1/T(K)	ln(A)	A (U/mL)	1/T(K)	ln(A)
25% Solvente	30	303	1,6	$3,30 \cdot 10^{-3}$	0,4	1,7	$3,30 \cdot 10^{-3}$	0,5
	35	308	2,6	$3,24 \cdot 10^{-3}$	0,9	2,0	$3,24 \cdot 10^{-3}$	0,7
	40	313	5,3	$3,19 \cdot 10^{-3}$	1,6	-	-	-
	45	318	-	-	-	6,1	$3,14 \cdot 10^{-3}$	1,8
	50	323	13,1	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,5	14,0	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,6
	55	328	34,2	$3,04 \cdot 10^{-3}$	3,5	-	-	-
50% Solvente	30	303	4,17	$3,30 \cdot 10^{-3}$	1,4	1,9	$3,30 \cdot 10^{-3}$	0,6
	35	308	4,5	$3,24 \cdot 10^{-3}$	1,5	2,1	$3,24 \cdot 10^{-3}$	0,7
	40	313	7,9	$3,19 \cdot 10^{-3}$	2,0	4,0	$3,19 \cdot 10^{-3}$	1,4
	45	318	-	-	-	5,4	$3,14 \cdot 10^{-3}$	1,7
	50	323	27,5	$3,09 \cdot 10^{-3}$	3,3	-	-	-
	55	328	54,2	$3,04 \cdot 10^{-3}$	3,9	-	-	-
70% Solvente	30	303	5,4	$3,30 \cdot 10^{-3}$	1,7	-	-	-
	35	308	4,9	$3,24 \cdot 10^{-3}$	1,6	2,9	$3,24 \cdot 10^{-3}$	1,0
	40	313	8,2	$3,19 \cdot 10^{-3}$	2,1	5,4	$3,19 \cdot 10^{-3}$	1,7
	45	318	13,8	$3,14 \cdot 10^{-3}$	2,6	7,5	$3,14 \cdot 10^{-3}$	2,0
	50	323	16,7	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,8	15,2	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,7



(a)



(b)

Figura 5.2: Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase livre na presença de solvente (25; 50 e 70%), para o cálculo da energia de ativação para a cepa (a) ATCC 16045 e (b) NRRL Y-7571.

A partir das três equações abaixo determinaram-se as energias de ativação (E_a).

Para a Cepa ATCC 16045

$$\ln(A) = -11758 (1/T) + 39,19 \quad R^2 = 0,98 \text{ para 25\% de solvente}$$

$$\ln(A) = -10757 (1/T) + 36,631 \quad R^2 = 0,96 \text{ para 50\% de solvente}$$

$$\ln(A) = -6366,9 (1/T) + 22,508 \quad R^2 = 0,90 \text{ para 70\% de solvente}$$

Para a Cepa NRRL Y-7571

$$\ln(A) = -9959,6 (1/T) + 33,24 \quad R^2 = 0,95 \text{ para 25\% de solvente}$$

$$\ln(A) = -6990,4 (1/T) + 23,63 \quad R^2 = 0,94 \text{ para 50\% de solvente}$$

$$\ln(A) = -10076 (1/T) + 33,789 \quad R^2 = 0,98 \text{ para 70\% de solvente}$$

Os valores das energias de ativação na presença de 25; 50 e 70% de solvente estão na tabela abaixo.

Tabela 5.4: Valores de energia de ativação na presença de 25, 50 e 70% de solvente para as duas cepas

	Cepa ATCC 16045	Cepa NRRL Y-7571
	Ea (Kcal/mol)	Ea (Kcal/mol)
Aquoso	16,4*	8,9**
25% Solvente	23,3	19,7
50% Solvente	21,3	13,8
70% Solvente	12,6	20,0

*Santos (2002) em meio aquoso utilizando o mesmo microrganismo.

**Makino (2001) em meio aquoso utilizando o mesmo microrganismo

5.2. Estabilidade Térmica para enzima livre

Os resultados obtidos da atividade enzimática da inulinase, na presença das três porcentagens de solvente orgânico, em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas de 50 a 65°C, para a enzima livre estão apresentados na Tabela 5.5 a Tabela 5.17. Estas mostram o decaimento da atividade enzimática com o tempo, a diferentes temperaturas.

Tabela 5.5: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%.

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	15,5	0	17,7	0	19,9	0
25	14,5	-0,06	17,4	-0,01	19,2	-0,03
40	13,6	-0,12	16,5	-0,07	18,8	-0,05
60	14,1	-0,09	16,8	-0,05	17,7	-0,11
120	12,7	-0,19	15,3	-0,14	18,0	-0,10
145	13,0	-0,17	15,0	-0,16	17,4	-0,13
190	12,6	-0,20	13,4	-0,27	16,4	-0,19
240	12,0	-0,25	13,8	-0,24	17,2	-0,14
480	9,2	-0,51	10,7	-0,49	13,1	-0,41
545	8,9	-0,54	8,7	-0,70	12,8	-0,44
700	7,8	-0,68	6,5	-0,99	10,8	-0,61
780	8,3	-0,62	6,0	-1,07	11,5	-0,54
1380	4,4	-1,25	4,8	-1,29	5,6	-1,26
1420	3,9	-1,38	4,1	-1,45	5,2	-1,34
1450	3,5	-1,48	4,2	-1,43	4,0	-1,60
1470	3,7	-1,43	3,9	-1,49	3,3	-1,79

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.6: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade e (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	6,8	0	8,2	0	24,8	0
60	-	-	-	-	22,2	-0,11
80	-	-	-	-	20,3	-0,20
120	-	-	5,8	-0,34	-	-
130	-	-	-	-	21,5	-0,14
150	5,6	-0,20	-	-	19,2	-0,25
160	5,5	-0,22	5,5	-0,40	-	-
180	5,3	-0,26	-	-	-	-
250	-	-	4,6	-0,58	14,6	-0,53
340	4,2	-0,50	-	-	-	-
360	4,0	-0,54	-	-	-	-
380	3,9	-0,56	-	-	-	-
420	3,8	-0,60	-	-	-	-
1420	-	-	-	-	5,5	-1,50
1860	-	-	-	-	4,8	-1,64
1950	-	-	-	-	4,1	-1,80
2970	-	-	1,1	-1,99	-	-
3040	-	-	1,0	-2,12	-	-
3145	-	-	0,9	-2,17	-	-
4285	-	-	0,8	-2,23	1,5	-2,77
4535	-	-	0,8	-2,28	-	-

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.7: Estabilidade a temperatura de 52,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	Ln(A/Ao)
0	16	0	16,5	0	22,1	0
30	15,5	-0,03	16,0	-0,03	21,3	-0,03
90	13,1	-0,19	9,8	-0,51	15,6	-0,34
140	12,5	-0,24	7,5	-0,78	11,2	-0,67
210	6,8	-0,85	3,5	-1,53	4,0	-1,70
240	6,3	-0,93	3,7	-1,48	4,4	-1,59
270	4,6	-1,24	2,8	-1,74	3,2	-1,93
300	3,3	-1,57	2,6	-1,83	2,1	-2,35

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.8: Estabilidade a temperatura de 52,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	8,8	0	12,7	0	17,8	0
30	-	-	7,2	-0,57	12,8	-0,32
45	-	-	6,4	-0,68	-	-
60	4,2	-0,74	5,7	-0,80	8,0	-0,80
75	3,8	-0,83	-	-	-	-
90	3,5	-0,92	3,7	-1,22	7,2	-0,90
120	2,8	-1,14	3,1	-1,40	6,1	-1,06
150	2,6	-1,21	2,9	-1,48	4,3	-1,42
180	-	-	-	-	2,8	-1,84
240	1,5	-1,75	-	-	-	-
300	0,9	-2,28	-	-	-	-

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.9: Estabilidade a temperatura de 55°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	10,1	0	10,9	0	11,2	0
60	8,4	-0,18	8,7	-0,22	9,8	-0,13
110	5,5	-0,59	5,8	-0,62	7,7	-0,36
145	3,4	-1,07	5,2	-0,74	6,5	-0,53
200	2,2	-1,52	-	-	2,3	-1,56
240	0,9	-2,32	-	-	1,0	-2,37
390	0,4	-3,11	0,3	-3,56	0,3	-3,38

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.10: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	15,5	0	14,8	0	15,6	0
5	13,4	-0,14	12,7	-0,15	14,4	-0,08
10	12,1	-0,24	10,7	-0,32	13,4	-0,15
12	10,3	-0,40	-	-	-	-
15	9,6	-0,47	-	-	-	-
17	8,7	-0,57	8,5	-0,55	9,2	-0,53
22	4,3	-1,28	5,9	-0,90	5,4	-1,05
30	3	-1,64	3,0	-1,57	3	-1,65
32	2,0	-2,00	-	-	-	-
37	1,8	-2,11	2,1	-1,95	1,6	-2,25

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.11: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	6,0	0	7,6	0	33,5	0
5	5,8	-0,04	3,5	-0,78	18,8	-0,57
10	5,3	-0,13	2,5	-1,11	-	-
15	4,9	-0,20	1,8	-1,44	6,9	-1,57
17	-	-	1,2	-1,85	6,5	-1,64
18	4,5	-0,30	-	-	-	-
20	-	-	0,9	-2,14	5,2	-1,86
25	4,1	-0,38	0,7	-2,40	4,3	-2,05
30	-	-	-	-	2,8	-2,45
40	-	-	-	-	1,5	-3,10

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.12: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	15,2	0	14,8	0	9,9	0
5	6,8	-0,80	5,5	-0,98	4,3	-0,83
8	5,0	-1,10	-	-	-	-
12	4,5	-1,22	4,3	-1,23	2,4	-1,40
20	2,6	-1,77	1,6	-2,18	1,2	-2,09
25	1,7	-2,15	0,9	-2,70	1,0	-2,29
37	0,4	-3,52	0,4	-3,43	0,3	-3,44

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.13: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	9,0	0	10,4	0	3,6	0
2	-	-	2,4	-1,47	2,4	-0,42
4	5,2	-0,55	1,2	-2,16	-	-
6	5,0	-0,59	-	-	1,1	-1,20
8	4,6	-0,67	0,8	-2,56	0,9	-1,40
10	4,3	-0,74	-	-	0,6	-1,80
12	-	-	0,7	-2,70	0,4	-2,21
15	3,8	-0,87	-	-	-	-
16	-	-	0,5	-3,03	0,4	-2,21
20	-	-	-	-	0,2	-2,90

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.14: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	15,5	0	14,9	0	19,9	0
1,68e-02	12,3	-0,23	13,6	-0,09	17,9	-0,10
8,33e-02	9,7	-0,46	13,2	-0,12	17,2	-0,14
0,466	7,6	-0,71	10,1	-0,39	12,3	-0,48
3	6,3	-0,89	-	-	-	-
4	5,3	-1,07	-	-	-	-
5	4,3	-1,27	5,6	-0,98	9,5	-0,73
6	-	-	4,1	-1,29	5,3	-1,32
8	-	-	-	-	1,8	-2,35
10	-	-	-	-	1,2	-2,77

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.15: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	35,0	0	12,1	0	16,5	0
2	11,5	-1,11	5,9	-0,72	6,3	-0,96
4	3,4	-2,31	1,8	-1,87	1,9	-2,16
6	1,7	-2,98	-	-	-	-
8	1,1	-3,42	0,6	-2,95	0,3	-3,96
10	0,7	-3,83	0,5	-3,12	0,2	-4,31
12	0,4	-4,43	0,3	-3,51	0,2	-4,45
15	-	-	-	-	0,06	-5,50

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.16: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	17,3	0	15,3	0	14,3	0
0,166	14,2	-0,19	13,3	-0,14	12,6	-0,12
1	10,5	-0,49	6,5	-0,85	4,2	-1,22
2	8,2	-0,74	-	-	-	-
3	6,4	-0,98	-	-	-	-
4	5,6	-1,11	2,6	-1,75	1,9	-1,97
5	4,6	-1,32	-	-	-	-
6	-	-	0,8	-2,86	1,0	-2,62
7	2,3	-2,02	-	-	-	-
8	-	-	0,5	-3,29	0,6	-3,06
10	0,3	-4,05	0,2	-4,19	0,1	-4,55

Solvente: Acetato de Butila

Tabela 5.17: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente 25, 50 e 70%

Tempo (min)	25% Solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln(A/Ao)
0	14,7	0	23,9	0	12,8	0
2	6,2	-0,85	4,5	-1,67	0,4	-3,36
3	5,4	-1,00	-	-	0,5	-3,24
4	3,6	-1,41	3,4	-1,95	-	-
5	2,3	-1,86	2,1	-2,43	0,2	-4,16
6	-	-	1,2	-2,96	0,06	-5,32
8	-	-	0,5	-3,74	0,05	-5,40

Solvente: Acetato de Butila

Através dos resultados encontrados para a temperatura de estabilidade para inulinase recuperada e livre de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571 observou-se que a temperatura em que a enzima permaneceu por mais tempo estável foi a de 50°C independente da porcentagem de solvente utilizada.

Santos (2002) trabalhando com ATCC 16045 e Makino (2001) com a NRRL Y-7571, ambas em sistema aquoso também encontraram 50°C como a temperatura de maior estabilidade. Öngen-Baysel *et al.*, (1994), também verificaram que a inulinase de *Aspergillus niger* apresentava uma estabilidade máxima a 50°C.

A atividade decaiu rapidamente em temperaturas superiores a 60°C segundo Cheng *et al.*, (1996) para a enzima produzida pelo *Aspergillus japonicus*.

A faixa da temperatura de maior estabilidade encontrada para a inulinase a partir do *Penicillium rugulosum* foi de 4 a 30°C (Barthomeuf *et al.*, 1991). Enquanto que a faixa encontrada para a endo-inulinase a partir do *Arthrobacter sp* foi de 30 a 40°C segundo Kang *et al.*, (1998).

5.2.1. Determinação da Energia de Ativação para a reação de desnaturação (Ed)

Os dados obtidos experimentalmente foram graficados em $\ln A/A_0$ vs tempo e desses gráficos, obteve-se um valor de K_d (desativação térmica) para cada temperatura, como mostra a Tabela 5.18. Com estes valores, graficou-se o $\ln K_d$ em função de $1/T$ (K) para o cálculo de E_d (energia de ativação para a reação de desnaturação), mostrado na Figura 5.3 (a) para a Cepa ATCC 16045 e (b) Cepa NRRL Y-7571.

$$\ln K_d = \ln K_{d0} - E_d/RT \quad (5.1)$$

Utilizou-se este procedimento para as três porcentagens de solvente.

A partir da inclinação da reta da Figura 5.3 obtém-se o valor de E_d para cada porcentagem de solvente apresentados na Tabela 5.19. Pode-se observar que para as 3 porcentagens de solvente estudadas o valor de E_d é praticamente igual, com uma variação que está dentro do erro experimental para sua determinação.

A expressão para determinar os valores de K_d é:

K_d (teórico) = $K_{do} * \exp(-E_d/RT)$, sendo T = temperatura em Kelvin.

Os valores dos tempos de meia vida (min) foram calculados de acordo com a equação 5.2, para as temperaturas estudadas, como mostram as Tabela 5.20 e Tabela 5.21.

$$t_{1/2} = -\ln 0,5 / K_d \quad (5.2)$$

Para a cepa ATCC 16045 utilizando a enzima livre, as meias vida obtidas na temperatura de 50°C (323,1K) foram de 12,8; 11,5 e 11,5 horas para 25; 50 e 70% de solvente, respectivamente. Utilizando a mesma enzima, mas em meio aquoso, Santos (2002) obteve meia vida de 240 horas. Através dos resultados pode-se observar que a presença do solvente orgânico faz com que o tempo de meia vida se reduza significativamente.

Para a cepa NRRL Y-7571 utilizando a enzima livre, os tempos de meia vida obtidos na temperatura de 50°C foram de 7,7; 23,1 e 16,5 horas para 25; 50 e 70% de solvente, respectivamente. Enquanto que Makino (2001) utilizando a mesma cepa, mas em meio aquoso obteve um tempo de meia vida de 7,7 horas. Através dos resultados pode-se observar que para esta cepa mesmo com a presença do solvente orgânico o tempo de meia-vida obtido foi maior.

O tempo de meia-vida obtido por Kato *et al.*, (1999), foi de 10 minutos na temperatura de 69°C e no pH 7,0 utilizando a inulinase a partir do *Bacillus stearothermophilus* KP 1289.

Conforme pode se observar na Figura 5.4 na presença de 25 e 50 e 70% de solvente, utilizando enzima livre, os valores de K_d teóricos e experimentais foram ajustados adequadamente com exceção das temperaturas de 62,5 e 65°C por serem as temperaturas mais altas trabalhadas em que ocorreu uma rápida desnaturação e por serem mais difíceis de trabalhar na presença do solvente orgânico.

Tabela 5.18: Valores de Kd em função da temperatura para 25, 50 e 70% de acetato de butila

	T(°C)	T(K)	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
			Kd experi- mental	1/T(K)	Ln Kd	Kd experi- mental	1/T(K)	ln Kd
25% Solvente	50	323,1	9.10^{-4}	$3,09.10^{-3}$	-7,0	$1,5.10^{-3}$	$3,09.10^{-3}$	-6,5
	52,5	325,6	$5,1.10^{-3}$	$3,07.10^{-3}$	-5,2	$6,8.10^{-3}$	$3,07.10^{-3}$	-4,9
	55	328,1	$8,7.10^{-3}$	$3,05.10^{-3}$	-4,7	-	-	-
	57,5	330,6	$64,2.10^{-3}$	$3,02.10^{-3}$	-2,7	$16,3.10^{-3}$	$3,02.10^{-3}$	-4,1
	60	333,1	$8,6.10^{-2}$	$3,0.10^{-3}$	-2,4	$29,5.10^{-3}$	$3,0.10^{-3}$	-3,5
	62,5	335,6	$2,1.10^{-1}$	$2,98.10^{-3}$	-1,5	$3,08.10^{-1}$	$2,98.10^{-3}$	-1,1
	65	338,1	$3,5.10^{-1}$	$2,95.10^{-3}$	-1,0	$4,2.10^{-1}$	$2,95.10^{-3}$	-0,8
50% Solvente	50	323,1	1.10^{-3}	$3,09.10^{-3}$	-6,9	5.10^{-4}	$3,09.10^{-3}$	-7,6
	52,5	325,6	$6,7.10^{-3}$	$3,07.10^{-3}$	-5,0	$8,2.10^{-3}$	$3,07.10^{-3}$	-4,8
	55	328,1	$9,5.10^{-3}$	$3,05.10^{-3}$	-4,6	-	-	-
	57,5	330,6	$5,4.10^{-2}$	$3,02.10^{-3}$	-2,9	$9,4.10^{-2}$	$3,02.10^{-3}$	-2,3
	60	333,1	$9,0.10^{-2}$	$3,0.10^{-3}$	-2,4	$9,8.10^{-2}$	$3,0.10^{-3}$	-2,3
	62,5	335,6	$2,6.10^{-1}$	$2,98.10^{-3}$	-1,3	$2,6.10^{-1}$	$2,98.10^{-3}$	-1,3
	65	338,1	$4,0.10^{-1}$	$2,95.10^{-3}$	-0,9	$3,6.10^{-1}$	$2,95.10^{-3}$	-1,0
70% Solvente	50	323,1	1.10^{-3}	$3,09.10^{-3}$	-6,9	7.10^{-4}	$3,09.10^{-3}$	-7,2
	52,5	325,6	$8,1.10^{-3}$	$3,07.10^{-3}$	-4,8	$9,5.10^{-3}$	$3,07.10^{-3}$	-4,6
	55	328,1	$9,7.10^{-3}$	$3,05.10^{-3}$	-4,6	-	-	-
	57,5	330,6	$6,3.10^{-2}$	$3,02.10^{-3}$	-2,7	$7,5.10^{-2}$	$3,02.10^{-3}$	-2,5
	60	333,1	$8,7.10^{-2}$	$3,0.10^{-3}$	-2,4	$1,4.10^{-1}$	$3,0.10^{-3}$	-1,9
	62,5	335,6	$4,1.10^{-1}$	$2,98.10^{-3}$	-0,8	$3,6.10^{-1}$	$2,98.10^{-3}$	-1,0
	65	338,1	$4,0.10^{-1}$	$2,95.10^{-3}$	-0,9	$4,0.10^{-1}$	$2,95.10^{-3}$	-0,9

Tabela 5.19: Valores de Ed em função da porcentagem de solvente estudada

% de solvente	Cepa ATCC 16045	Cepa NRRL Y-7571
	Ed (Kcal/mol)	Ed (Kcal/mol)
25	84,3	78,3
50	84,1	88,2
70	85,1	87,5

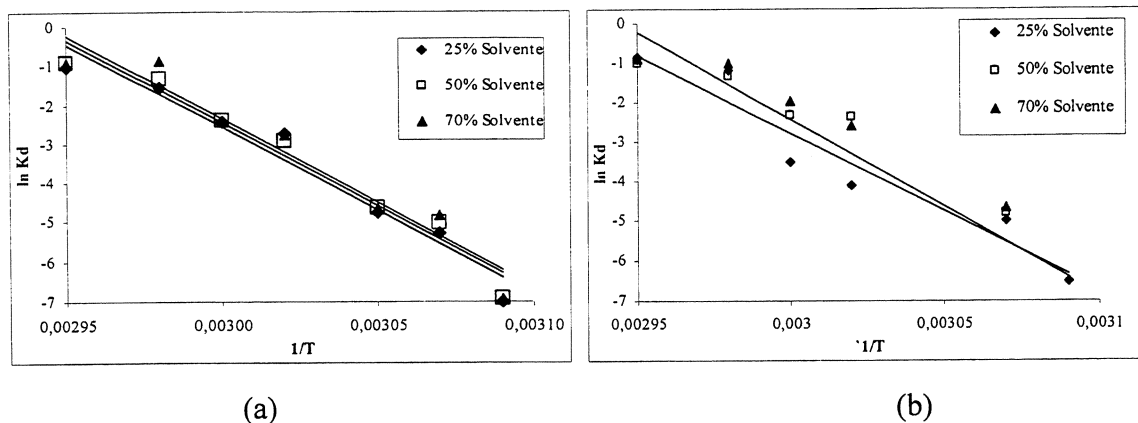


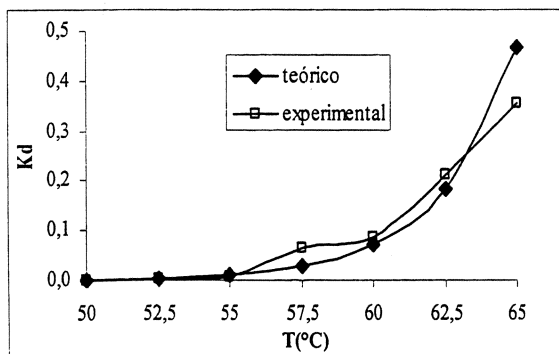
Figura 5.3: Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius para a Cepa (a) ATCC 16045 e (b) NRRL Y-7571.

Tabela 5.20: Valores de K_d e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima livre na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa ATCC 16045

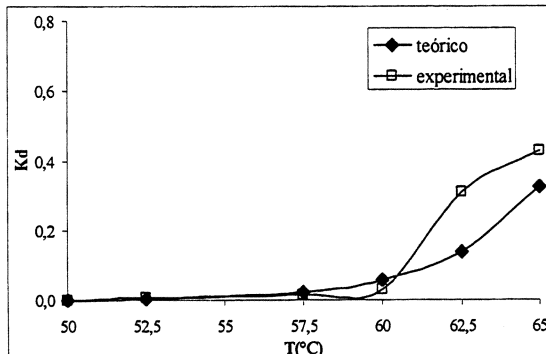
	T(K)	K_d teórico	$t_{1/2}$ (min) teórico	K_d experimental	$t_{1/2}$ (min) experimental
25% Solvente	323,1	$1,4 \cdot 10^{-3}$	495,0	$0,9 \cdot 10^{-3}$	770,1
	325,6	$3,8 \cdot 10^{-3}$	182,4	$5,1 \cdot 10^{-3}$	135,9
	328,1	$10,2 \cdot 10^{-3}$	67,9	$8,7 \cdot 10^{-3}$	79,6
	330,6	$27,0 \cdot 10^{-3}$	25,6	$64,2 \cdot 10^{-3}$	10,8
	333,1	$70,8 \cdot 10^{-3}$	9,8	$86,3 \cdot 10^{-3}$	8,0
	335,6	$182 \cdot 10^{-3}$	3,8	$212,3 \cdot 10^{-3}$	3,2
	338,1	$466 \cdot 10^{-3}$	1,5	$355,4 \cdot 10^{-3}$	1,9
50% Solvente	323,1	$1,5 \cdot 10^{-3}$	462,0	$1 \cdot 10^{-3}$	693,1
	325,6	$4,2 \cdot 10^{-3}$	165,4	$6,7 \cdot 10^{-3}$	103,4
	328,1	$11,2 \cdot 10^{-3}$	61,5	$9,5 \cdot 10^{-3}$	73,0
	330,6	$29,9 \cdot 10^{-3}$	23,2	$54,4 \cdot 10^{-3}$	12,7
	333,1	$78,1 \cdot 10^{-3}$	8,8	$90,6 \cdot 10^{-3}$	7,6
	335,6	$201 \cdot 10^{-3}$	3,4	$268,6 \cdot 10^{-3}$	2,6
	338,1	$511,4 \cdot 10^{-3}$	1,3	$406,3 \cdot 10^{-3}$	1,7
70% Solvente	323,1	$1,6 \cdot 10^{-3}$	433,2	$1 \cdot 10^{-3}$	693,1
	325,6	$4,5 \cdot 10^{-3}$	154,0	$8,1 \cdot 10^{-3}$	85,5
	328,1	$12,4 \cdot 10^{-3}$	55,9	$9,7 \cdot 10^{-3}$	71,4
	330,6	$33,2 \cdot 10^{-3}$	20,8	$63,4 \cdot 10^{-3}$	10,9
	333,1	$87,8 \cdot 10^{-3}$	7,9	$87,6 \cdot 10^{-3}$	8,0
	335,6	$228,9 \cdot 10^{-3}$	3,0	$410,6 \cdot 10^{-3}$	1,6
	338,1	0,588	1,1	$402,5 \cdot 10^{-3}$	1,7

Tabela 5.21: Valores de Kd e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima livre na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa NRRL Y-7571

	T(K)	Kd teórico	t _{1/2} (min) teórico	Kd experimental	t _{1/2} (min) experimental
25% Solvente	323,1	$1,5 \cdot 10^{-3}$	462	$1,5 \cdot 10^{-3}$	462
	325,6	$3,7 \cdot 10^{-3}$	187,3	$6,8 \cdot 10^{-3}$	101,9
	330,6	$2,3 \cdot 10^{-2}$	30,0	$1,6 \cdot 10^{-2}$	42,5
	333,1	$5,6 \cdot 10^{-2}$	12,2	$2,9 \cdot 10^{-2}$	23,5
	335,6	$1,3 \cdot 10^{-1}$	5,0	$3,0 \cdot 10^{-1}$	2,2
	338,1	$3,2 \cdot 10^{-1}$	2,1	$4,2 \cdot 10^{-1}$	1,6
50% Solvente	323,1	$1,3 \cdot 10^{-3}$	525	$5 \cdot 10^{-4}$	1386
	325,6	$3,8 \cdot 10^{-3}$	182,3	$8,2 \cdot 10^{-3}$	84,5
	330,6	$2,9 \cdot 10^{-2}$	23,9	$9,4 \cdot 10^{-2}$	7,3
	333,1	$8,1 \cdot 10^{-2}$	8,5	$9,8 \cdot 10^{-2}$	7,0
	335,6	$2,2 \cdot 10^{-1}$	3,1	$2,6 \cdot 10^{-1}$	2,6
	338,1	0,5853	1,1	$3,6 \cdot 10^{-1}$	1,9
70% Solvente	323,1	0,0016	433,1	$7 \cdot 10^{-4}$	990
	325,6	0,0046	150,6	$9,5 \cdot 10^{-3}$	73,0
	330,6	0,0356	19,4	$7,5 \cdot 10^{-2}$	9,1
	333,1	0,0966	7,1	$1,4 \cdot 10^{-1}$	5,0
	335,6	0,2586	2,6	$3,6 \cdot 10^{-1}$	1,9
	338,1	0,6822	1,0	$4,0 \cdot 10^{-1}$	1,7



(a)



(d)

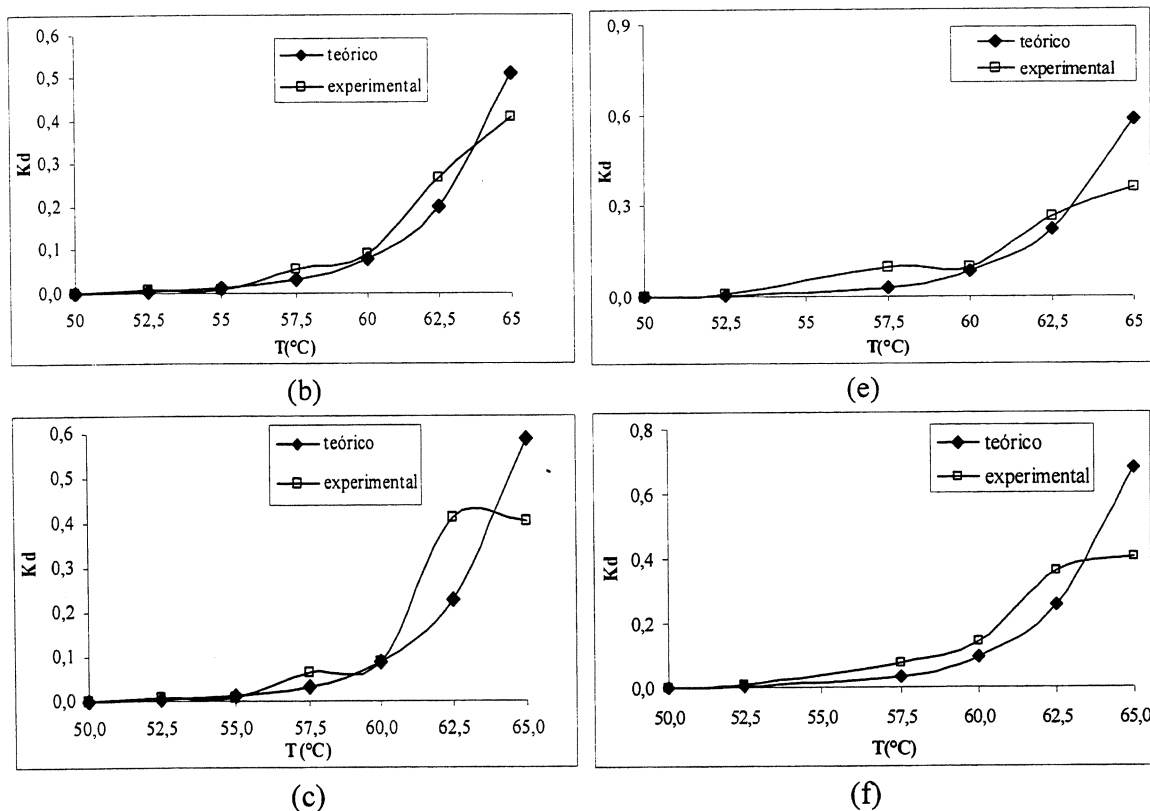


Figura 5.4: Gráfico do K_d teórico e experimental versus temperatura para as porcentagens de solvente para a cepa ATCC 16045 (a) 25, (b) 50 e (c) 70%; para a cepa NRRL Y-7571 (d) 25, (e) 50 e (f) 70%.

5.2.2. Determinação do pH ótimo da enzima livre

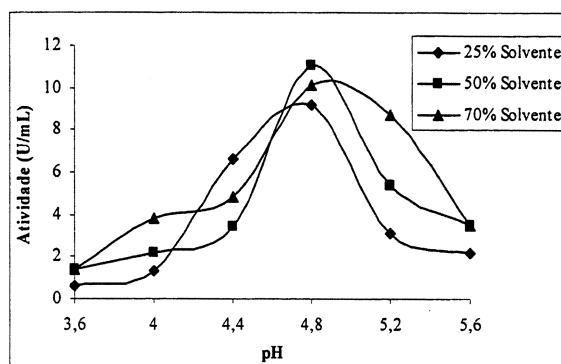
Os resultados das atividades enzimáticas da inulinase recuperada em função do pH, para enzima livre em tampão acetato de sódio 0,1M pH (3,6 – 5,6) e fosfato de sódio 0,05M pH (5,5- 8,0), na presença de 25, 50 e 70% de solvente, estão apresentados na Tabela 5.22 e na Figura 5.5.

Tanto para a cepa ATCC 16045 quanto para a NRRL Y-7571 podemos verificar que a máxima atividade para a enzima livre, independente da porcentagem de solvente utilizada, foi obtida no pH 4,8 utilizando o tampão acetato de sódio 0,1 M enquanto que utilizando o fosfato de sódio a máxima atividade foi obtida no pH 6,0 (Figura 5.5).

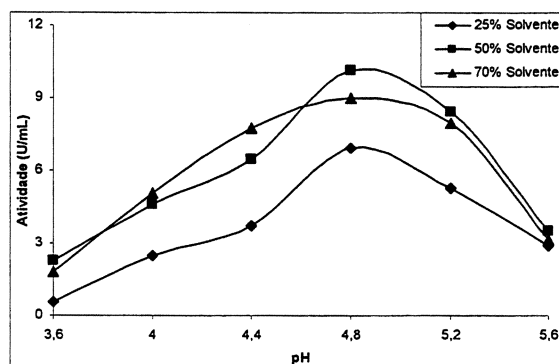
Vários estudos de pH ótimo foram realizados a partir de outros microrganismos conforme pode se observar na Tabela 5.23.

Tabela 5.22: Atividade enzimática da inulinase recuperada, das duas cepas, em função do pH, para enzima livre em tampão acetato de sódio 0,1M e fosfato de sódio 0,05M na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila)

	pH	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
		25% Solvente	50% Solvente	70% Solvente	25% Solvente	50% Solvente	70% Solvente
Tampão acetato de sódio	3,6	0,5	1,4	1,4	0,6	2,2	1,8
	4,0	1,3	2,2	3,8	2,5	4,6	5,0
	4,4	6,6	3,4	4,8	3,7	6,4	7,7
	4,8	9,2	11,1	10,9	6,9	10,1	9,0
	5,2	3,1	5,4	8,7	5,2	8,4	7,9
	5,6	2,2	3,5	3,5	2,8	3,5	3,1
Tampão fosfato de sódio	5,5	0,2	1,5	5,1	1,0	2,4	5,1
	6,0	2,3	4,5	6,6	4,5	4,6	7,0
	7,0	0,5	1,1	0,3	2,6	0,8	0,5
	7,5	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3
	8,0	0,03	0,06	0,1	0,06	0,05	0,08



(a)



(c)

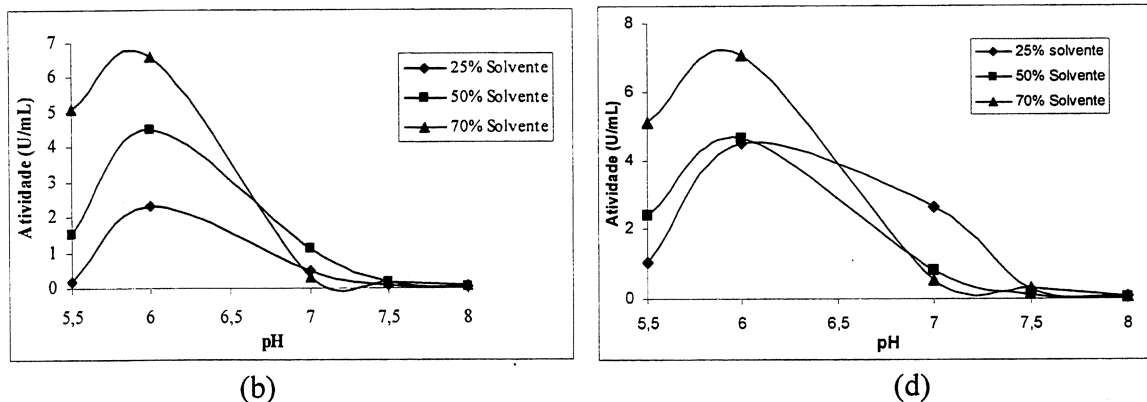


Figura 5.5: Atividade enzimática da inulinase livre em função do pH, para a cepa ATCC 16045 em (a) tampão acetato de sódio 0,1M e (b) em fosfato de sódio 0,05M; e para a cepa NRRL Y-7571 em (c) tampão acetato de sódio 0,1M e (d) em fosfato de sódio 0,05M.

Tabela 5.23: Valores de pH ótimo obtidos por outros autores para diferentes microrganismos

Microrganismo	pH Ótimo	Referência	Observações
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	4,5	Makino (2001)	Inulinase livre
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	4,7	Kushi <i>et al.</i> , (2000)	Inulinase extracelular
<i>Aspergillus ficuum</i>	4,7	Ettalibi & Baratti, (2001)	Inulinase livre
<i>Aspergillus japonicus</i> ;	5,4	Cheng <i>et al.</i> , (1996)	Enzima livre
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5,0	Vitolo citado por Santos (2002)	Inulinase
<i>Bacillus subtilis</i>	5,0	Cheetham <i>et al.</i> , (1989)	Frutossiltransferase
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> ATCC 16045	4,8	Santos (2002)	Inulinase livre
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20611	5,0-6,0	Hirayama <i>et al.</i> , (1989)	β -frutofuranosidase
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5,5	Jung <i>et al.</i> , (1989)	frutossiltransferase
<i>Kluyveromyces fragilis</i> e <i>Candida</i>	3,5-5,5	Zittan & Bagsvaerd (1981)	inulinasas
<i>Penicillium rugulosum</i>	5,5-5,6	Barthomeuf <i>et al.</i> , (1991)	inulinase
<i>Aspergillus niger</i>	5,8	L'Hocine <i>et al.</i> , (2000)	frutossiltransferase
<i>Bacillus stearothermophilus</i> KP 1289	6,1	Kato <i>et al.</i> , (1999)	inulinase

5.2.3. Estabilidade com o pH

Os resultados das atividades enzimáticas, na presença do tampão acetato de sódio 0,1M em diferentes valores de pH e de porcentagens de solvente, estão apresentados nas Tabela 5.24 e Tabela 5.25 e na Figura 5.6.

Através dos resultados pode-se concluir que a inulinase na forma livre a partir da cepa ATCC 16045, na presença de 25, 50 e 70% de solvente, apresenta uma maior estabilidade nos pHs 4,4; 4,8 e 4,4, respectivamente. Enquanto que para a cepa NRRL Y-7571 pode-se concluir que a inulinase apresenta uma maior estabilidade nos pHs 4,4; 4,4 e 4,0, respectivamente.

A maior estabilidade obtida por Santos (2002) foi no pH 4,8 para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045 na forma livre em meio aquoso com 30 horas de incubação. Barthomeuf *et al.*, (1991), encontraram para a inulinase de *Penicillium rugulosum* uma maior estabilidade no pH 4,0 até 6,5 com 24 horas de incubação.

A maior estabilidade obtida por Makino (2001) foi na faixa de pH de 4 a 6, para a inulinase obtida a partir da NRRL Y-7571 na forma livre em meio aquoso após 2 horas de incubação a 50°C.

Estudando as propriedades da inulinase, a partir do *Aspergillus niger*, Öngen *et al.*, (1994) obtiveram a faixa de 5 a 6 para o pH de maior estabilidade. Enquanto que para a inulinase a partir do *Penicillium rugulosum* foi de 4,0 a 6,5 (Barthomeuf *et al.*, 1991).

Para a frutossiltransferase e invertase a partir do *Aspergillus niger* foi de 4,5 a 11,0 (L'Hocine *et al.*, 2000). A faixa de pH de maior estabilidade encontrado para a endo-inulinase a partir do *Arthrobacter sp* foi de 5,0 a 10,5 segundo Kang *et al.*, (1998).

Tabela 5.24: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) utilizando enzima livre - Cepa ATCC 16045

	Tempo (h)	pH 4,0	pH 4,4	pH 4,8	pH 5,2	pH 5,6
25% Solvente	0	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
	1	7,3	7,1	7,2	7,9	7,6
	2	6,5	5,7	6,4	5,1	3,6
	6	5,0	4,8	4,7	3,0	0,4
	24	3,0	3,7	1,8	0,3	0,2
50% Solvente	0	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
	1	8,7	7,5	9,2	8,6	7,7
	2	7,3	6,6	9,0	8,1	6,4
	6	6,2	5,3	7,1	2,8	0,5
	24	2,3	1,7	3,4	1,1	0,3
70% Solvente	0	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
	1	6,8	5,8	6,1	6,0	4,9
	2	6,6	3,6	2,2	4,2	1,3
	6	3,8	3,0	2,0	1,9	0,4
	24	1,6	2,1	1,4	0,6	0,2

Tabela 5.25: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) utilizando enzima livre - Cepa NRRL Y-7571

	Tempo (h)	pH 4,0	pH 4,4	pH 4,8	pH 5,2	pH 5,6
25% Solvente	0	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
	1	5,6	8,0	7,5	5,8	6,7
	2	3,6	8,0	5,3	3,7	5,6
	6	2,8	6,8	5,0	3,0	4,3
	24	1,5	4,5	3,7	1,3	2,4
50% Solvente	0	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
	1	5,3	7,5	6,9	5,1	3,8
	2	3,7	5,3	4,6	4,5	1,5
	6	1,9	3,4	3,8	4,8	1,5
	24	0,074	1,5	1,0	0,2	0,05
70% Solvente	0	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
	1	8,6	3,6	6,4	4,2	1,3
	2	5,4	8,3	6,7	4,3	0,8
	6	8,0	3,0	2,2	1,9	0,2
	24	4,9	2,5	1,9	1,5	0,4

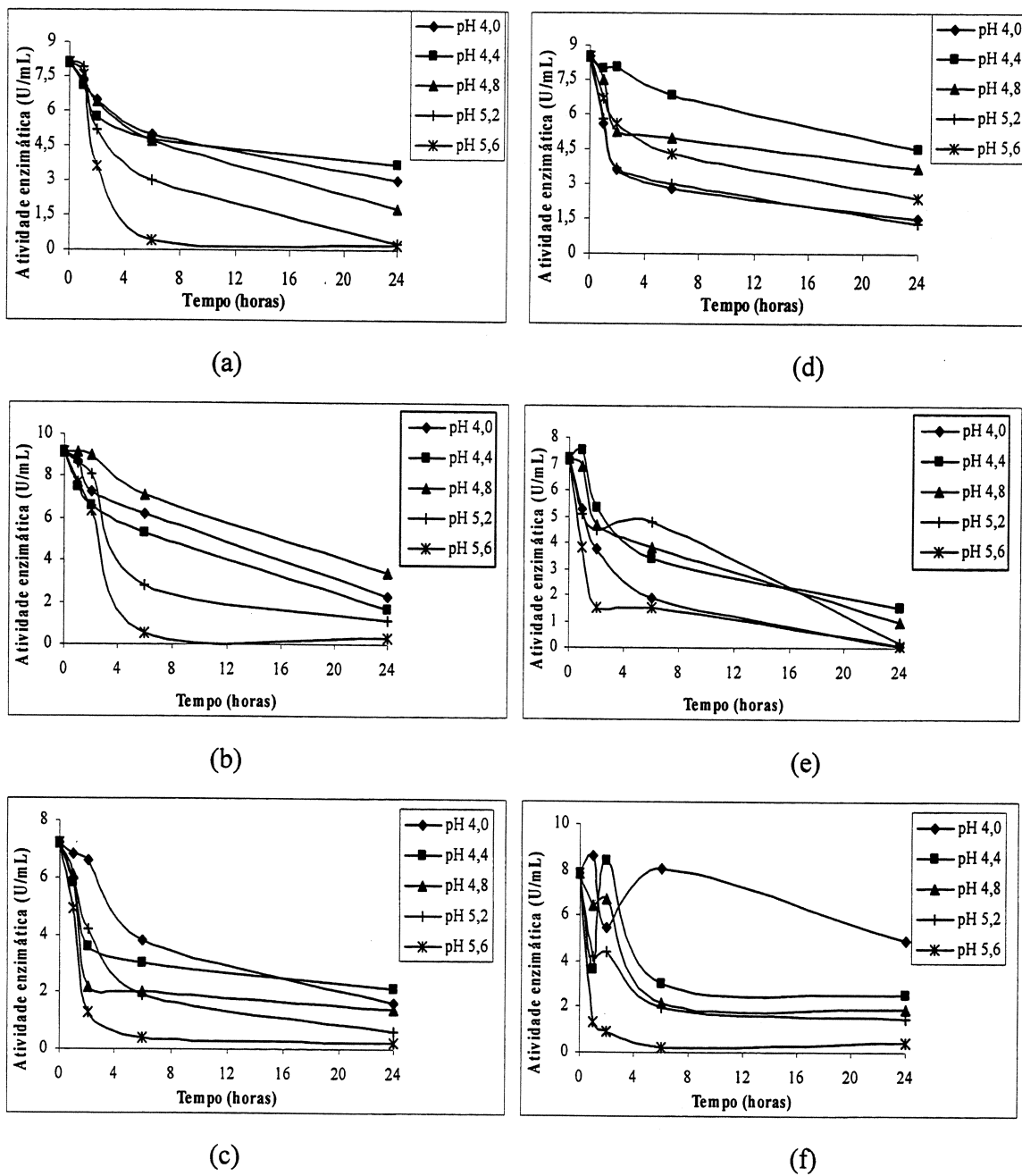


Figura 5.6: Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase livre para a cepa ATCC 16045 na presença de (a)25%, (b)50% e (c)70% e para a NRRL Y-7571 (d) 25, (e)50 e (f) 70% de solvente.

5.2.4. Determinação de K_m e V_{max}

Na Tabela 5.26 e na Figura 5.7 estão apresentados os valores das atividades enzimáticas (U/mL), utilizando a enzima na forma livre na presença de 25, 50 e 70% de solvente, utilizando uma faixa de concentração de substrato sacarose de 0,5 a 35g/L.

Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Para a determinação dos parâmetros utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a equação a seguir:

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (5.3)$$

Através da linearização da equação temos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}} \quad (5.4)$$

Graficando-se $1/[S]$ versus $1/v$, conforme a Figura 5.8, obtem-se K_m e V_{max} .

Vários estudos para a determinação de K_m e V_{max} foram realizados a partir de outros microrganismos conforme pode se observar na Tabela 5.28.

Tabela 5.26: Atividades enzimáticas (U/mL), na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de sacarose [S]

S (g/L)	S (mol/L)	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
		Atividade (U/mL)			Atividade (U/mL)		
		25%	50%	70%	25%	50%	70%
		solvente	solvente	solvente	solvente	solvente	solvente
0,5	0,001	1,1	0,6	0,4	0,6	0,8	0,4
0,75	0,002	1,2	0,6	0,2	0,9	1,5	0,5
1	0,002	1,7	0,6	0,5	1,5	1,8	1,2
1,5	0,004	2,4	0,8	0,7	1,9	2,1	1,8
2	0,005	2,8	0,6	0,4	2,5	2,9	3,7
3	0,008	1,6	1,0	1,2	2,9	3,5	4,2
4	0,011	3,8	1,6	3,5	3,5	6,2	4,5
5	0,014	4,7	1,8	6,3	4,2	7,1	7,6
10	0,029	8,8	7,7	7,5	5,8	9,8	9,8
15	0,043	9,0	8,8	8,3	6,8	11,6	12,1
20	0,058	8,6	10,0	8,8	7,4	12,8	12,7
25	0,073	9,1	9,1	8,5	7,2	13,5	12,5
30	0,087	8,6	8,5	8,2	7,9	13,9	13,2
35	0,102	8,5	7,6	8,0	8,2	13,4	12,5

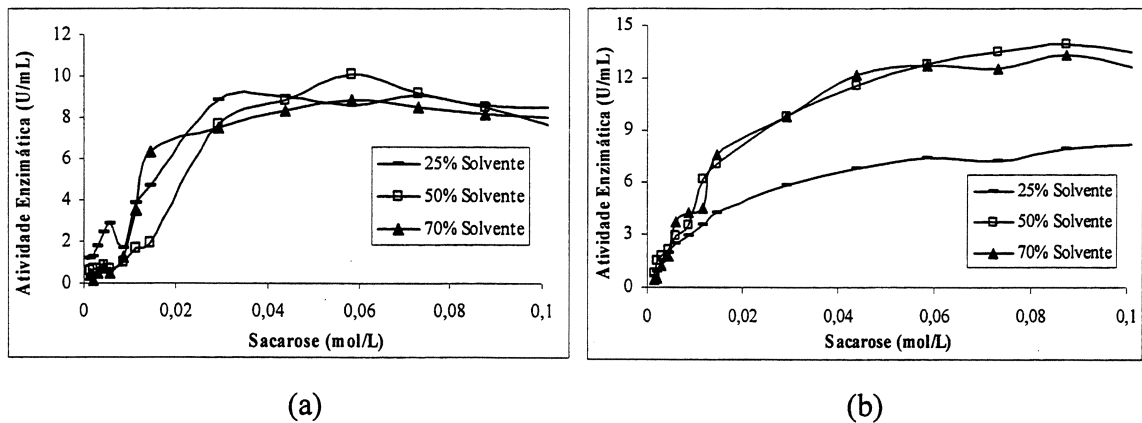


Figura 5.7: Atividade enzimática da inulinase livre a $T = 50^{\circ}\text{C}$, na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de substrato (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571.

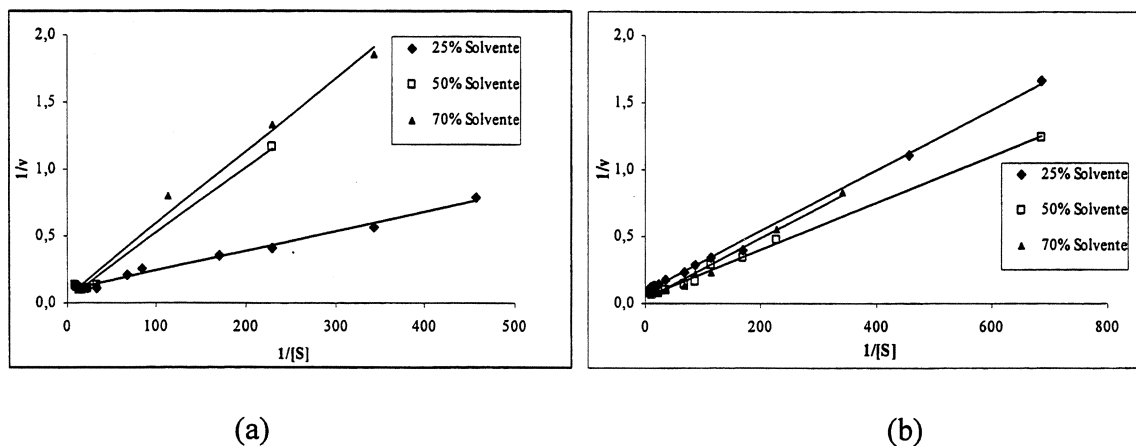


Figura 5.8: Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{\max}$ para 25, 50 e 70% de solvente (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571.

Pelas equações do gráfico linearizado, obtêm-se os valores de K_m e $V_{\max}$. As equações foram as seguintes:

Para a cepa ATCC 16045

$$1/v = 0,0015 (1/[S]) + 0,0937 \quad \text{com } R^2 = 0,99 \quad \text{para 25\% de solvente}$$

$$1/v = 0,0049 (1/[S]) + 0,0288 \quad \text{com } R^2 = 0,98 \quad \text{para 50\% de solvente}$$

$$1/v = 0,0055 (1/[S]) + 0,0421 \quad \text{com } R^2 = 0,98 \quad \text{para 70\% de solvente}$$

Para a cepa NRRL Y-7571

$$1/v = 0,0023 (1/[S]) + 0,0882 \quad \text{com } R^2 = 0,99 \quad \text{para 25\% de solvente}$$

$$1/v = 0,0018 (1/[S]) + 0,0471 \quad \text{com } R^2 = 0,99 \quad \text{para 50\% de solvente}$$

$$1/v = 0,0023 (1/[S]) + 0,0284 \quad \text{com } R^2 = 0,98 \quad \text{para 70\% de solvente}$$

Os valores de K_m e V_{max} para as porcentagens de solvente estudadas encontram-se na Tabela 5.27.

Tabela 5.27: Parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para as três porcentagens de solvente estudadas

	Cepa ATCC 16045		Cepa NRRL Y-7571	
	K_m (M)	V_{max} (mol/(min.L))	K_m (M)	V_{max} (mol/(min.L))
25% de solvente	0,016	10,6	0,026	11,3
50% de solvente	0,17	34,7	0,038	21,2
70% de solvente	0,13	23,7	0,08	35,2
Aquoso*	0,0389	$126,8 \cdot 10^{-9}$	-	-

*Santos (2002) utilizando o mesmo microrganismo

Tabela 5.28: Valores obtidos de K_m e V_{max} por outros autores em meio aquoso

Microrganismo	K_m	V_{max}	Referência	Observações
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y 7571	20,4 μmol/ml	769,2 μmol/min	Makino (2001)	inulinase
<i>Aspergillus ficuum.</i>	0,06 M	192 U/mg	Ettalibi & Baratti, 2001	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	4,58 mg/ml	-	Kushi <i>et al.</i> , (2000)	inulinase extracelular
<i>Bacillus subtilis</i>	0,7M	-	Cheetham <i>et al.</i> , 1989	Frutossiltrans-ferase
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20611.	0,29M	-	Hirayama, <i>et al.</i> , 1989	β-frutofurano-sidase
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> CDBB-L-278	0,15 M	250 μmol/min	Barranco-Florido <i>et al.</i> , 2001	-
<i>Aureobasidium pullulans.</i>	330g/L	130g/(Lh)	Jung <i>et al.</i> , 1989	Frutossiltrans-ferase
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	14,6mM	-	Rouwenhorst <i>et al.</i> , (1990)	-
<i>Aspergillus niger</i>	35,6 mM	398 μmol/(mlmin)	L'Hocine <i>et al.</i> , 2000	a invertase

5.3. Caracterização da enzima imobilizada para as cepas *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571

5.3.1. Influência da temperatura na atividade enzimática

Os resultados obtidos da atividade enzimática na presença do solvente orgânico, acetato de butila, a diferentes temperaturas de 30 a 70°C, para a enzima imobilizada, estão apresentados na Tabela 5.30 e na Figura 5.9.

Na Figura 5.9 a pode-se observar que a enzima imobilizada para a cepa ATCC 16045 apresentou uma atividade máxima na mesma temperatura que a livre, ou seja na temperatura de 55°C independente da porcentagem de solvente utilizada. Para temperaturas acima de 55°C a enzima perde rapidamente a atividade devido a desnaturação. Enquanto que para a NRRL Y-7571 (Figura 5.9 b) a atividade máxima foi na temperatura de 55; 60 e 55°C na presença de 25; 50 e 70% de solvente, respectivamente.

Santos (2002), também trabalhando com a inulinase imobilizada, mas com um método de imobilização diferente do utilizado neste trabalho, de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 obteve um máximo de atividade a 57,5°C em meio aquoso.

Trabalhando com a inulinase imobilizada, e mesmo método de imobilização deste trabalho, de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, Lorenço (2004) obteve um máximo de atividade a 60°C em meio aquoso.

Vários estudos para a determinação da temperatura ótima foram realizados com outros microrganismos conforme pode se observar na Tabela 5.29, sendo que para todas as referências o estudo foi realizado em meio aquoso.

Tabela 5.29: Valores de temperatura ótima para inulinase de vários microrganismos obtidos por outros autores.

Microrganismo	Temperatura Ótima(°C)	Referência	Observações
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> ATCC 16045	57,5	Santos, (2002)	inulinase imobilizada em alginato.
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	55	Makino (2001)	inulinase imobilizada em alginato
<i>Aspergillus ficuum</i>	70	Ettalibi & Baratti, (2001)	Inulinase imobilizada
<i>Aspergillus japonicus</i> ;	60 a 65	Cheng <i>et al.</i> , (1996)	Inulinase imobilizada

5.3.1.1. Determinação da Energia de Ativação

O mesmo procedimento descrito no item 5.1.1 para a enzima livre na determinação da E_a (energia de ativação) foi usado para a enzima imobilizada. Os resultados estão apresentados a seguir na Tabela 5.31 e na Figura 5.10.

A energia de ativação em meio aquoso obtida por Lorenço (2004), utilizando a ATCC 16045 e o mesmo método de imobilização utilizados neste trabalho, foi de 10,9 Kcal/mol.

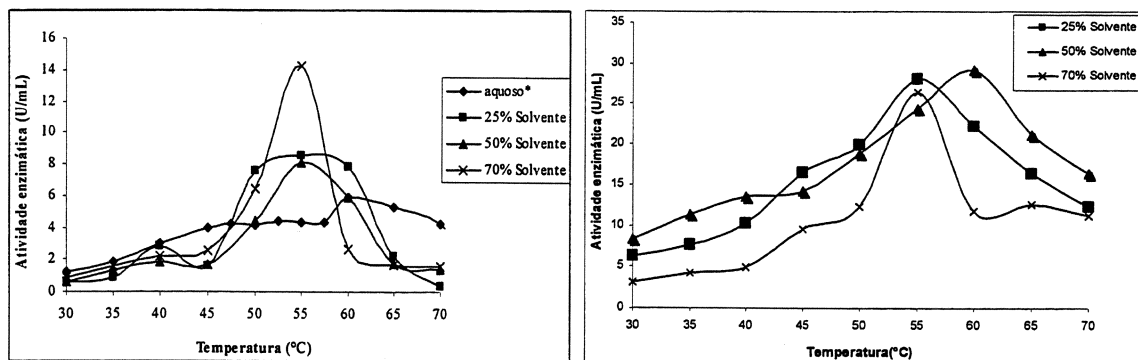
Santos (2002) obteve uma energia de ativação em meio aquoso de 13,5Kcal/mol, também utilizando a ATCC 16045 e o método de imobilização diferente do deste trabalho.

A energia de ativação em meio aquoso obtida por Makino (2001) foi de 14,0 Kcal/mol, a partir da cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Pode-se observar na Tabela 5.32 que na presença de solvente orgânico, acetato de butila, necessita-se de maior energia de ativação praticamente o dobro do meio aquoso para a cepa ATCC 16045.

Tabela 5.30: Atividade enzimática em função da temperatura, para a inulinase imobilizada na presença de 25, 50 e 70% de acetato de butila

Temperatura (°C)	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
	Atividade (U/mL)			Atividade (U/mL)		
	25%	50%	70%	25%	50%	70%
30	0,6	0,5	0,8	6,3	8,2	3,1
35	0,8	1,3	1,5	7,6	11,3	4,2
40	2,8	1,8	2,2	10,2	13,5	4,9
45	1,5	1,6	2,5	16,5	14,1	9,5
50	7,5	4,4	6,4	19,9	18,8	12,2
55	8,5	8,1	14,2	28,1	24,4	26,4
60	7,7	5,9	2,6	22,2	29,1	11,7
65	2,2	1,7	1,7	16,4	21,1	12,5
70	0,3	1,4	1,5	12,2	16,3	11,1



* Lorenço, 2004 utilizando o mesmo microrganismo e o mesmo método de imobilização utilizados neste trabalho, mas em meio aquoso.

(a)

(b)

Figura 5.9: Efeito da temperatura na atividade da inulinase imobilizada na presença de acetato de butila (a) Cefa ATCC 16045 e (b) Cefa NRRL Y-7571.

Tabela 5.31: Atividade enzimática da inulinase imobilizada na presença de 25; 50 e 70% de solvente (acetato de butila), em função da temperatura

	T(°C)	T(K)	Cefa ATCC 16045			Cefa NRRL Y-7571		
			A (U/mL)	1/T(K)	ln(A)	A (U/mL)	1/T(K)	ln(A)
25% Solvente	30	303	0,6	$3,30 \cdot 10^{-3}$	-0,4	6,3	$3,30 \cdot 10^{-3}$	1,8
	35	308	0,8	$3,24 \cdot 10^{-3}$	-0,1	-	-	-
	40	313	2,8	$3,19 \cdot 10^{-3}$	1,0	10,2	$3,19 \cdot 10^{-3}$	2,3
	45	318	-	-	-	16,5	$3,14 \cdot 10^{-3}$	2,8
	50	323	7,5	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,0	19,9	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,9
	55	328	8,5	$3,04 \cdot 10^{-3}$	2,1	28,1	$3,04 \cdot 10^{-3}$	3,3
50% Solvente	30	303	0,5	$3,30 \cdot 10^{-3}$	-0,5	8,2	$3,30 \cdot 10^{-3}$	2,1
	35	308	1,3	$3,24 \cdot 10^{-3}$	0,3	11,3	$3,24 \cdot 10^{-3}$	2,4
	40	313	1,8	$3,19 \cdot 10^{-3}$	0,6	13,5	$3,19 \cdot 10^{-3}$	2,6
	45	318	-	-	-	14,1	$3,14 \cdot 10^{-3}$	2,64
	50	323	4,4	$3,09 \cdot 10^{-3}$	1,4	18,8	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,9
	55	328	8,1	$3,04 \cdot 10^{-3}$	2,0	24,4	$3,04 \cdot 10^{-3}$	3,2
70% Solvente	30	303	0,8	$3,30 \cdot 10^{-3}$	-0,1	-	-	-
	35	308	1,5	$3,24 \cdot 10^{-3}$	0,4	4,2	$3,24 \cdot 10^{-3}$	1,4
	40	313	2,2	$3,19 \cdot 10^{-3}$	0,8	-	-	-
	45	318	-	-	-	9,5	$3,14 \cdot 10^{-3}$	1,5
	50	323	6,4	$3,09 \cdot 10^{-3}$	1,8	12,2	$3,09 \cdot 10^{-3}$	2,5
	55	328	14,2	$3,04 \cdot 10^{-3}$	2,6	26,4	$3,04 \cdot 10^{-3}$	3,2

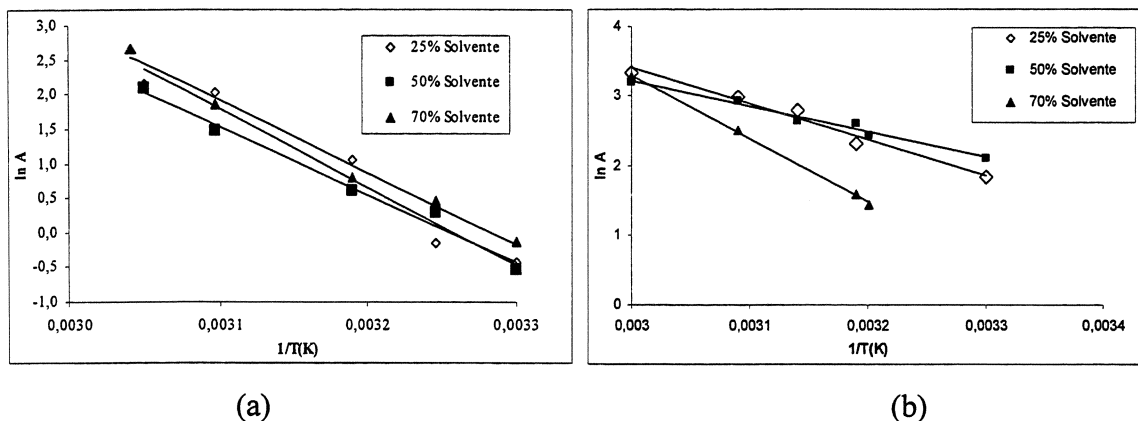


Figura 5.10: Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase imobilizada na presença de solvente (25; 50 e 70%), para o cálculo da energia de ativação para a Cepa (a) ATCC 16045 e (b)NRRL Y-7571.

A partir das três equações abaixo determinaram-se as energias de ativação (E_a).

Para a Cepa ATCC 16045

$$\ln(A) = -11251 (1/T) + 36,66 \quad R^2 = 0,95 \text{ para } 25\% \text{ de solvente}$$

$$\ln(A) = -9770,9 (1/T) + 31,82 \quad R^2 = 0,98 \text{ para } 50\% \text{ de solvente}$$

$$\ln(A) = -10443 (1/T) + 34,27 \quad R^2 = 0,98 \text{ para } 70\% \text{ de solvente}$$

Para a Cepa NRRL Y-7571

$$\ln(A) = -5169,7 (1/T) + 18,91 \quad R^2 = 0,97 \text{ para } 25\% \text{ de solvente}$$

$$\ln(A) = -3660,3 (1/T) + 14,19 \quad R^2 = 0,97 \text{ para } 50\% \text{ de solvente}$$

$$\ln(A) = -9090 (1/T) + 30,56 \quad R^2 = 0,99 \text{ para } 70\% \text{ de solvente}$$

Os valores das energias de ativação na presença de 25; 50 e 70% de solvente estão na tabela abaixo.

Tabela 5.32: Valores de energia de ativação na presença de 25, 50 e 70% de solvente para as duas cepas

	Cepa ATCC 16045	Cepa NRRL Y-7571
	Ea (Kcal/mol)	Ea (Kcal/mol)
Aquoso	10,9*	14,0**
25% Solvente	22,3	10,2
50% Solvente	19,4	7,2
70% Solvente	20,7	18,0

* Lorenço (2004) em meio aquoso utilizando ATCC 16045

**Makino (2001) em meio aquoso utilizando NRRL Y-7571

5.3.2. Estabilidade térmica para enzima imobilizada

Os resultados obtidos da atividade enzimática da inulinase, na presença das três porcentagens de solvente orgânico, em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas de 50 a 65°C, para a enzima imobilizada estão apresentados na Tabela 5.33 a Tabela 5.44. Estas mostram o decaimento da atividade enzimática com o tempo, a diferentes temperaturas.

Tabela 5.33: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	6,8	0	6,9	0	4,6	0
25	6,5	-0,05	6,5	-0,06	4,6	-0,004
40	6,2	-0,09	6,2	-0,11	4,4	-0,05
60	5,7	-0,17	5,6	-0,20	4,6	-0,01
120	5,9	-0,14	6,0	-0,13	4,1	-0,13
145	5,2	-0,27	5,3	-0,27	4,5	-0,03
190	5,0	-0,30	5,1	-0,29	4,4	-0,05
240	-	-	5,2	-0,28	3,6	-0,23
480	4,6	-0,40	5,0	-0,31	4,2	-0,10
540	-	-	-	-	3,8	-0,18
545	4,7	-0,36	4,7	-0,38	-	-
700	4,3	-0,46	3,9	-0,58	3,5	-0,28
730	4,5	-0,41	4,5	-0,43	3,4	-0,31
780	4,2	-0,48	4,1	-0,53	-	-
1200	-	-	3,7	-0,62	-	-
1590	3,0	-0,81	2,4	-1,05	3,0	-0,43
2970	2,4	-1,05	-	-	1,6	-1,03

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.34: Estabilidade a temperatura de 50°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	Ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	8,0	0	8,0	0	11,1	0
30	7,6	-0,06	-	-	11,0	-0,01
60	7,8	-0,03	-	-	-	-
90	-	-	7,5	-0,07	-	-
100	7,1	-0,12	-	-	9,8	-0,12
120	6,6	-0,20	-	-	-	-
150	6,8	-0,17	-	-	-	-
200	-	-	-	-	9,6	-0,14
1095	-	-	4,4	-0,60	-	-
1440	-	-	3,5	-0,82	-	-
1475	2,1	-1,31	3,4	-0,84	-	-
1565	-	-	2,9	-1,00	-	-
2430	1,1	-1,95	2,0	-1,40	1,3	-2,1
2540	1,2	-1,87	-	-	-	-
2620	0,9	-2,17	-	-	1,0	-2,3
2760	-	-	1,7	-1,54	0,7	-2,7
3945	-	-	-	-	0,2	-3,7
4115	-	-	0,7	-2,35	-	-

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.35: Estabilidade a temperatura de 52,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	9,4	0	9,4	0	9,1	0
90	3,6	-0,95	5,0	-0,62	3,9	-0,84
110	-	-	-	-	3,5	-0,95
130	3,4	-1,01	3,8	-0,90	3,0	-1,09
150	-	-	3,6	-0,95	-	-
180	2,4	-1,33	3,5	-0,97	2,5	-1,28
260	2,0	-1,50	3,2	-1,08	1,8	-1,61
385	1,0	-2,18	2,12	-1,48	-	-
440	-	-	-	-	0,9	-2,27

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.36: Estabilidade a temperatura de 55°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	5,3	0	5,6	0	4,5	0
30	5,1	-0,05	4,9	-0,11	4,3	-0,05
65	4,8	-0,11	5,2	-0,07	4	-0,12
120	3,5	-0,43	4,3	-0,25	3,6	-0,21
200	3,1	-0,53	4,0	-0,31	2,9	-0,42
530	2,2	-0,85	-	-	2,4	-0,62
1440	1,1	-1,58	1,3	-1,41	1,7	-0,98
1710	1,3	-1,42	1,3	-1,40	1,4	-1,16

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.37: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	7,2	0	7,3	0	9,6	0
15	6,5	-0,09	5,7	-0,2	6,3	-0,42
20	-	-	4,9	-0,4	-	-
24	5,3	-0,30	5,3	-0,32	-	-
50	-	-	-	-	2,8	-1,22
70	4,7	-0,41	-	-	-	-
120	2,8	-0,91	2,8	-0,93	1,9	-1,60
150	2,5	-1,03	-	-	1,8	-1,68
190	2,2	-1,17	2,1	-1,22	1,7	-1,70
220	-	-	2,2	-1,18	-	-
250	1,9	-1,29	2,0	-1,25	-	-

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.38: Estabilidade a temperatura de 57,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	9,4	0	9,4	0	7,9	0
20	-	-	6,6	-0,34	3,6	-0,78
40	4,4	-0,74	4,8	-0,66	3,5	-0,80
60	3,0	-1,12	-	-	3,2	-0,90
80	2,9	-1,14	3,1	-1,09	2,0	-1,36
100	2,5	-1,28	2,8	-1,20	1,6	-1,59
120	-	-	2,3	-1,38	-	-
180	1,3	-1,94	-	-	0,6	-2,45

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.39: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	7,2	0	5,7	0	9,0	0
20	6,5	-0,09	4,7	-0,18	8,4	-0,07
40	-	-	3,9	-0,38	6,3	-0,36
60	4,7	-0,41	-	-	-	-
90	4,3	-0,50	3,2	-0,57	2,6	-1,21
110	4,2	-0,53	2,8	-0,68	2,2	-1,40
170	3,2	-0,79	2,3	-0,88	2,1	-1,45
200	2,5	-1,03	2,0	-1,04	-	-

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.40: Estabilidade a temperatura de 60°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	6,3	0	6,3	0	6,2	0
15	2,9	-0,74	3,2	-0,67	5,2	-0,17
30	1,6	-1,33	2,5	-0,91	3,4	-0,60
40	-	-	-	-	2,9	-0,75
45	1,5	-1,44	2,0	-1,11	2,1	-1,07
60	1,2	-1,60	1,6	-1,36	-	-
75	-	-	1,5	-1,42	1,3	-1,50
150	0,4	-2,67	-	-	-	-

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.41: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	7,4	0	5,6	0	8,8	0
20	3,8	-0,64	3,2	-0,56	4,5	-0,67
40	2,8	-0,96	2,9	-0,64	4,0	-0,77
60	2,2	-1,20	2,6	-0,75	3,3	-0,97
90	1,9	-1,31	1,9	-1,07	2,4	-1,30
105	1,7	-1,43	1,5	-1,28	2,2	-1,39
120	1,5	-1,58	1,4	-1,36	2,1	-1,44

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.42: Estabilidade a temperatura de 62,5°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	Ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	7,1	0	7,1	0	7,9	0
15	3,1	-0,82	1,7	-1,44	2,6	-1,10
20	-	-	1,6	-1,50	-	-
30	1,4	-1,63	1,4	-1,61	1,3	-1,78
45	1,3	-1,71	0,7	-2,33	0,8	-2,19
60	-	-	0,5	-2,66	0,5	-2,68
90	0,4	-2,77	0,2	-3,43	0,3	-3,22

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.43: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa ATCC 16045 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	7,8	0	5,3	0	8,5	0
30	1,7	-1,50	2,0	-0,97	1,7	-1,56
40	1,2	-1,85	1,7	-1,10	1,5	-1,70
50	1,0	-2,06	1,0	-1,58	1,3	-1,85
60	0,7	-2,31	1,0	-1,67	1,0	-2,06
70	0,6	-2,48	0,8	-1,89	0,7	-2,44

Solvente: acetato de butila

Tabela 5.44: Estabilidade a temperatura de 65°C - Cepa NRRL Y-7571 para diferentes concentrações de solvente

Tempo (min)	25% solvente		50% Solvente		70% Solvente	
	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)	Atividade (U/mL)	ln (A/Ao)
0	19,8	0	8,0	0	8,8	0
5	8,0	-0,90	2,2	-1,29	2,9	-1,09
10	2,3	-2,13	1,5	-1,62	0,9	-2,29
15	1,7	-2,41	0,8	-2,21	0,7	-2,46
25	-	-	0,5	-2,77	0,4	-3,02
30	0,5	-3,58	0,2	-3,77	0,2	-3,87
40	-	-	0,1	-4,38	0,1	-4,48

Solvente: acetato de butila

Através dos resultados encontrados para a temperatura de estabilidade para inulinase recuperada e imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571 observou-se que a temperatura em que a enzima permaneceu por mais tempo estável foi a de 50°C independente da porcentagem de solvente utilizada.

Lorenço (2004) também apresentou a temperatura de 50°C como a de maior estabilidade, utilizando o mesmo método de imobilização e enzima utilizados neste trabalho, de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045, porém em sistema aquoso.

Santos (2002) apresentou a temperatura de 40°C como a de maior estabilidade para a enzima imobilizada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045 em meio aquoso, mas utilizando um método diferente do utilizado neste trabalho.

Makino (2001) apresentou a temperatura de 55°C como a de maior estabilidade, utilizando a cepa NRRL Y-7571 em meio aquoso, mas utilizando outro método de imobilização.

5.3.2.1. Determinação da Energia de Ativação para a reação de desnaturação (Ed)

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 5.2.1. A Tabela 5.45 apresenta os valores de Kd (desativação térmica) para cada temperatura e a Figura 5.11 apresenta o ln Kd em função de 1/T (K) para o cálculo de Ed (energia de ativação para a reação de desnaturação) (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) Cepa NRRL Y-7571.

A partir da inclinação da reta da Figura 5.11 obtém-se o valor de E_d para cada porcentagem de solvente apresentados na Tabela 5.46.

Os valores dos tempos de meia vida (min) para as temperaturas estudadas estão apresentados nas Tabela 5.47 e Tabela 5.48.

Para a cepa ATCC 16045 utilizando a enzima imobilizada, a meia vida obtida na temperatura de 50°C (323,1K) foram de 38,5; 23,1 e 38,5 horas para 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente.

Enquanto que Lorenço (2004) obteve uma meia vida de 44 dias, em meio aquoso utilizando a mesma enzima e o mesmo método de imobilização. Através dos resultados pode-se observar que a presença do solvente diminuiu drasticamente o tempo de meia vida da enzima.

Para a cepa NRRL Y-7571 utilizando enzima imobilizada, a meia vida obtida na temperatura de 50°C foram de 14,4; 19,2 e 11,5 horas para 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente. Os tempos de meia-vida obtidos por Cheng *et al.*, (1996) para a enzima imobilizada, obtida a partir do *Aspergillus japonicus*, foram de 4 horas na temperatura de 70°C, 36 horas para 65°C e 61 horas para 60°C.

Pode-se observar na Figura 5.12 que na presença de 25, 50 ou 70% de solvente, utilizando enzima imobilizada, todos os valores de K_d teóricos e experimentais foram ajustados adequadamente, com exceção da temperatura de 65°C por ser a temperatura mais alta e difícil de trabalhar na presença de solvente orgânico.

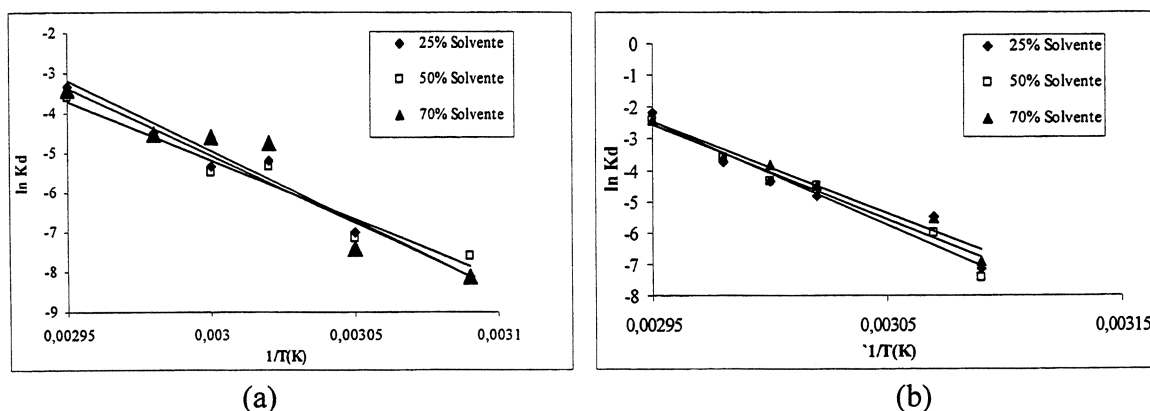


Figura 5.11: Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius para a Cepa (a) ATCC 16045 e (b) NRRL Y-7571.

Tabela 5.45: Valores de Kd em função da temperatura para 25, 50 e 70% de acetato de butila

	T(°C)	T(K)	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
			Kd experi- mental	1/T(K)	Ln Kd	Kd experi- mental	1/T(K)	ln Kd
25% Solvente	50	323,1	$0,3 \cdot 10^{-3}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	-8,1	$8 \cdot 10^{-4}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	-7,13
	52,5	325,6	-	-	-	$4,2 \cdot 10^{-3}$	$3,07 \cdot 10^{-3}$	-5,47
	55	328,1	$0,9 \cdot 10^{-3}$	$3,05 \cdot 10^{-3}$	-7,0	-	-	-
	57,5	330,6	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	-5,2	$8 \cdot 10^{-3}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	-4,82
	60	333,1	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-5,3	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-4,35
	62,5	335,6	$11,5 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	-4,4	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	-3,73
	65	338,1	$35,4 \cdot 10^{-3}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	-3,3	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	-2,16
50% Solvente	50	323,1	$0,5 \cdot 10^{-3}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	-7,6	$6 \cdot 10^{-4}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	-7,42
	52,5	325,6	-	-	-	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$3,07 \cdot 10^{-3}$	-5,99
	55	328,1	$0,8 \cdot 10^{-3}$	$3,05 \cdot 10^{-3}$	-7,1	-	-	-
	57,5	330,6	$4,8 \cdot 10^{-3}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	-5,3	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	-4,48
	60	333,1	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-5,4	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-4,34
	62,5	335,6	$10,3 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	-4,5	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	-3,58
	65	338,1	$27,3 \cdot 10^{-3}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	-3,6	$9,0 \cdot 10^{-2}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	-2,40
70% Solvente	50	323,1	$0,3 \cdot 10^{-3}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	-8,1	$1 \cdot 10^{-3}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	-6,90
	52,5	325,6	-	-	-	$4 \cdot 10^{-3}$	$3,07 \cdot 10^{-3}$	-5,52
	55	328,1	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$3,05 \cdot 10^{-3}$	-7,4	-	-	-
	57,5	330,6	$8,6 \cdot 10^{-3}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	-4,7	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	-4,48
	60	333,1	0,01	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-4,6	$2,1 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-3,84
	62,5	335,6	0,01	$2,98 \cdot 10^{-3}$	-4,5	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	-3,58
	65	338,1	0,03	$2,95 \cdot 10^{-3}$	-3,4	$8,9 \cdot 10^{-2}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	-2,41

Tabela 5.46: Valores de Ed em função da porcentagem de solvente estudada

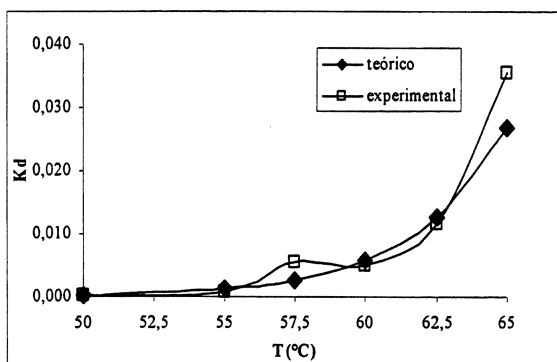
% de solvente	Cepa ATCC 16045	Cepa NRRL Y-7571
	Ed (Kcal/mol)	Ed (Kcal/mol)
25	67,5	60,0
50	58,5	65,1
70	70,1	57,6

Tabela 5.47: Valores de Kd e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima imobilizada na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa ATCC 16045

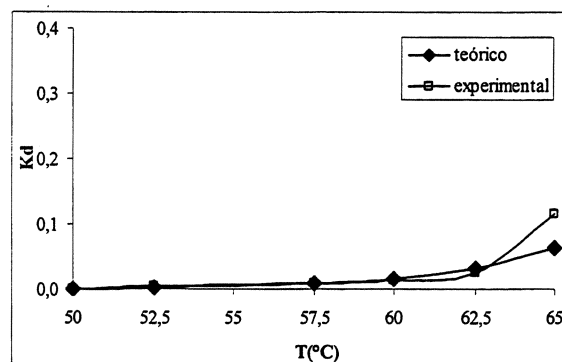
	T(K)	Kd teórico	t _{1/2} (min) teórico	Kd experimental	t _{1/2} (min) experimental
25% Solvente	323,1	$0,3 \cdot 10^{-3}$	2310,3	$0,3 \cdot 10^{-3}$	2310,3
	328,1	$1,2 \cdot 10^{-3}$	577,6	$0,9 \cdot 10^{-3}$	770,1
	330,6	$2,7 \cdot 10^{-3}$	256,7	$5,5 \cdot 10^{-3}$	126,0
	333,1	$5,9 \cdot 10^{-3}$	117,4	$4,9 \cdot 10^{-3}$	141,4
	335,6	$12,6 \cdot 10^{-3}$	55,0	$11,5 \cdot 10^{-3}$	60,2
	338,1	$26,7 \cdot 10^{-3}$	25,9	$35,4 \cdot 10^{-3}$	19,5
50% Solvente	323,1	$0,35 \cdot 10^{-3}$	1980,2	$0,5 \cdot 10^{-3}$	1386,2
	328,1	$1,4 \cdot 10^{-3}$	495	$0,8 \cdot 10^{-3}$	866,3
	330,6	$2,7 \cdot 10^{-3}$	256,6	$4,8 \cdot 10^{-3}$	144,4
	333,1	$5,3 \cdot 10^{-3}$	130,7	$4,1 \cdot 10^{-3}$	169,0
	335,6	$10,3 \cdot 10^{-3}$	67,3	$10,3 \cdot 10^{-3}$	67,3
	338,1	$19,7 \cdot 10^{-3}$	35,1	$27,3 \cdot 10^{-3}$	25,4
70% Solvente	323,1	$0,3 \cdot 10^{-3}$	2310,3	$0,3 \cdot 10^{-3}$	2310,3
	328,1	$1,3 \cdot 10^{-3}$	533,1	$0,6 \cdot 10^{-3}$	1155,1
	330,6	$3,0 \cdot 10^{-3}$	231,0	$8,6 \cdot 10^{-3}$	80,6
	333,1	$6,7 \cdot 10^{-3}$	103,4	0,01	69,3
	335,6	$14,8 \cdot 10^{-3}$	46,8	0,01	69,3
	338,1	$32,2 \cdot 10^{-3}$	21,5	0,032	21,6

Tabela 5.48: Valores de Kd e meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima imobilizada na presença de 25, 50 e 70% de solvente (acetato de butila) - Cepa NRRL Y-7571

	T(K)	Kd teórico	t _{1/2} (min) teórico	Kd experimental	t _{1/2} (min) experimental
25% Solvente	323,1	1.10^{-3}	693	8.10^{-4}	866,2
	325,6	2.10^{-3}	346,5	$4,2.10^{-3}$	165
	330,6	$8,3.10^{-3}$	83,5	8.10^{-3}	86,6
	333,1	$1,6.10^{-2}$	42,2	$1,2.10^{-2}$	53,7
	335,6	$3,2.10^{-2}$	21,5	$2,4.10^{-2}$	28,8
	338,1	$6,2.10^{-2}$	11,0	$1,1.10^{-1}$	6,0
50% Solvente	323,1	$7,5.10^{-4}$	924	6.10^{-4}	1155
	325,6	$1,6.10^{-3}$	425,1	$2,5.10^{-3}$	277,2
	330,6	$7,4.10^{-3}$	93,1	$1,1.10^{-2}$	61,3
	333,1	$1,5.10^{-2}$	44,2	$1,3.10^{-2}$	53,3
	335,6	$3,2.10^{-2}$	21,2	$2,7.10^{-2}$	27,8
	338,1	$6,7.10^{-2}$	10,3	$9,0.10^{-2}$	7,6
70% Solvente	323,1	$1,3.10^{-3}$	533	1.10^{-3}	693
	325,6	$2,5.10^{-3}$	277,2	4.10^{-3}	173,2
	330,6	$9,7.10^{-3}$	71,4	$1,1.10^{-2}$	61,3
	333,1	$1,8.10^{-2}$	37,2	$2,1.10^{-2}$	32,5
	335,6	$3,5.10^{-2}$	19,4	$2,7.10^{-2}$	25,0
	338,1	$6,7.10^{-2}$	10,2	$8,9.10^{-2}$	7,7



(a)



(d)

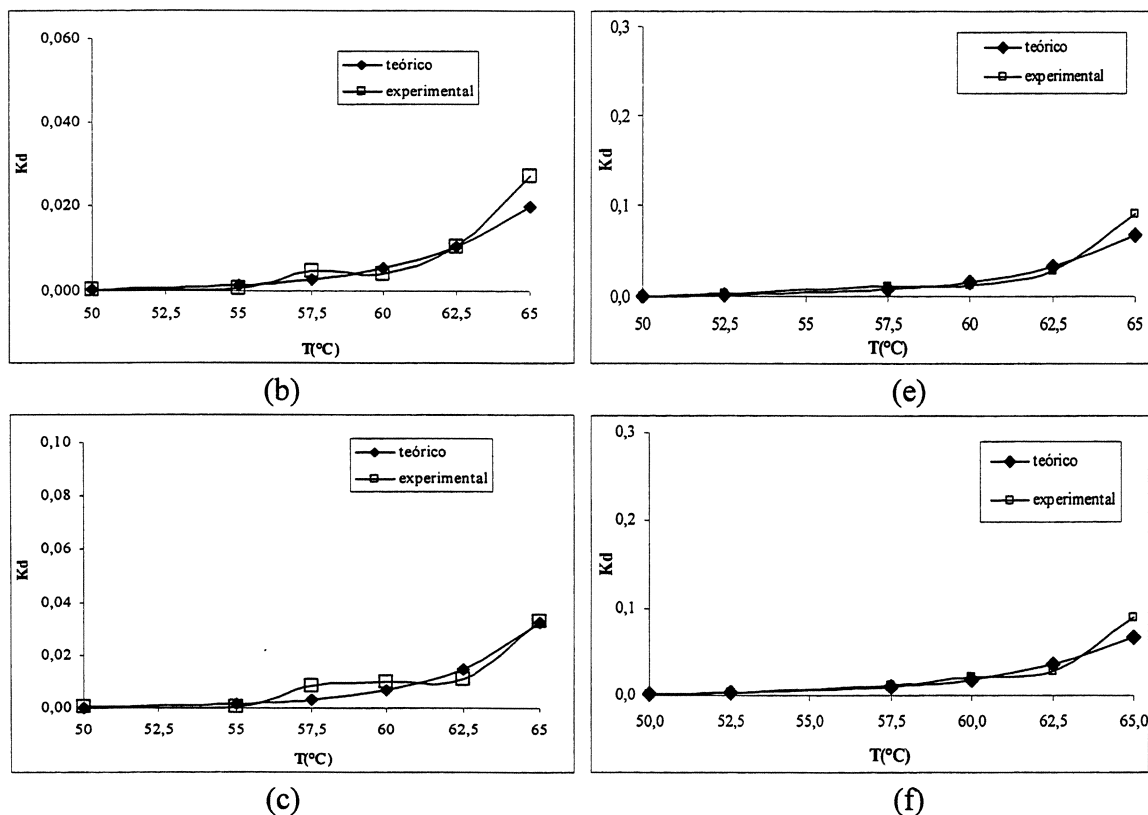


Figura 5.12: Gráfico do K_d teórico e experimental versus temperatura para as porcentagens de solvente para a cepa ATCC 16045 (a) 25, (b) 50 e (c) 70%; para a cepa NRRL Y-7571 (d) 25, (e) 50 e (f) 70%.

5.3.3. Influência do pH na atividade enzimática – Determinação do pH ótimo

Os resultados das atividades enzimáticas da inulinase recuperada em função do pH, para enzima imobilizada em tampão acetato de sódio 0,1M pH (3,6 – 5,6) e fosfato de sódio 0,05M pH (5,5- 8,0), na presença de 25, 50 e 70% de solvente, estão apresentados na Tabela 5.49 e na Figura 5.13.

Para a cepa ATCC 16045 podemos verificar que a máxima atividade para a enzima imobilizada em carvão, alginato, sacarose e glutaraldeído, independente da porcentagem de solvente utilizada, foi obtida no pH 4,4 utilizando o tampão acetato de sódio 0,1 M e no pH 7,0 utilizando o tampão fosfato de sódio (Figura 5.13).

Em meio aquoso, a máxima atividade obtida por Lorenço (2004) foi no pH 5,0, para a ATCC 16045 utilizando o mesmo método de imobilização deste trabalho.

Para a cepa NRRL Y-7571 podemos verificar que a máxima atividade para a enzima imobilizada em carvão, alginato, sacarose e glutaraldeído, independente da porcentagem de solvente utilizada, foi obtida no pH 4,8 utilizando o tampão acetato de sódio 0,1 M e no pH 7,0 utilizando o tampão fosfato de sódio (Figura 5.13).

O pH ótimo obtido por Ettalibi & Baratti, (2001) foi de 5,0 para a inulinase imobilizada. A enzima foi obtida a partir do *Aspergillus ficuum*. Enquanto que o valor obtido por Cheng *et al.*, (1996) foi de 4,0 a 5,5 para a enzima imobilizada produzida pelo *Aspergillus japonicus*, sendo que ambos utilizaram métodos de imobilização diferentes do utilizado neste trabalho.

Tabela 5.49: Atividade enzimática da inulinase recuperada em função do pH, para enzima imobilizada em tampão acetato de sódio 0,1M e fosfato de sódio 0,05M na presença de 25, 50 e 70% de solvente

	pH	Cepa ATCC 16045			Cepa NRRL Y-7571		
		25% Solvente	50% Solvente	70% Solvente	25% Solvente	50% Solvente	70% Solvente
Tampão acetato de sódio	3,6	1,5	9,5	9,3	6,8	9,0	7,7
	4,0	1,6	9,4	9,3	11,6	11,4	9,2
	4,4	44,7	39,1	33,4	10,6	13,1	10,8
	4,8	23,7	21,9	19,7	16,8	15,7	15,7
	5,2	23,7	30	18,8	13,2	10,1	8,9
	5,6	18,6	25,3	15,1	9,3	9,5	7,3
Tampão fosfato de sódio	5,5	5,7	1,8	3,8	4,7	4,6	6,2
	6,0	12,1	16,3	10,5	6,8	6,9	7,1
	7,0	13,5	19,4	17,4	9,8	8,6	10,4
	7,5	10,2	10,1	16,5	5,7	5,9	4,9
	8,0	8,5	6,7	4,9	2,8	5,6	3,4

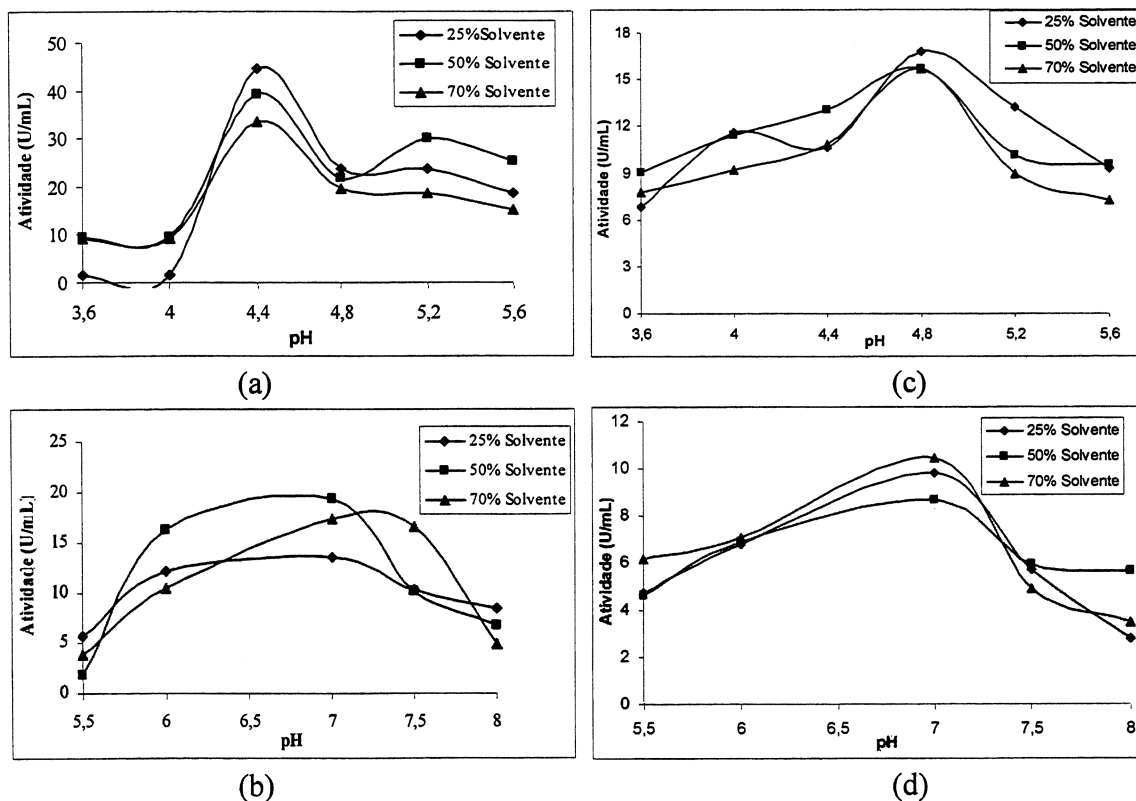


Figura 5.13: Atividade enzimática da inulinase imobilizada em função do pH, para a cepa ATCC 16045 em (a) tampão acetato de sódio 0,1M e (b) em fosfato de sódio 0,05M; e para a cepa NRRL Y-7571 em (c) tampão acetato de sódio 0,1M e (d) em fosfato de sódio 0,05M.

5.3.4. Estabilidade com o pH

O mesmo procedimento utilizado para a enzima livre na influência do pH no estudo da estabilidade da enzima foi usado para a enzima imobilizada. Os resultados das atividades enzimáticas, na presença do tampão acetato de sódio 0,1M em diferentes valores de pH e de três porcentagens de solvente, estão apresentados nas Tabela 5.50 e Tabela 5.51 e na Figura 5.14. Através dos resultados pode-se concluir que a inulinase na forma imobilizada, a partir da cepa ATCC 16045, na presença de 25, 50 e 70% de solvente, apresenta uma maior estabilidade no pH 4,8 (Figura 5.14).

Com 9 horas de incubação em meio aquoso, utilizando a também a ATCC 16045, Santos (2002) obteve uma maior estabilidade no pH 4,4, utilizando o método de

imobilização diferente do deste trabalho.

Enquanto que para a cepa NRRL Y-7571 pode-se concluir que a enzima apresenta uma maior estabilidade nos pHs 4,0; 4,0 e 4,4, na presença de 25, 50 e 70% de solvente, respectivamente (Figura 5.14).

Tabela 5.50: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente utilizando enzima imobilizada - Cepa ATCC 16045

	Tempo (h)	pH 4,0	pH 4,4	pH 4,8	pH 5,2	pH 5,6
25% Solvente	0	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
	1	7,9	7,7	8,2	7,2	6,2
	4	6,1	7,3	6,7	6,6	4,4
	6	4,7	5,2	5,9	6,1	3,8
	24	3,0	3,3	3,8	1,8	0,9
50% Solvente	0	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3
	1	6,8	7,2	7,2	6,5	6,8
	4	5,9	6,2	6,8	5,7	4,3
	6	5,0	4,8	6,6	5,4	4,0
	24	1,3	3,0	5,0	3,4	1,1
70% Solvente	0	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
	1	5,8	6,1	6,3	5,0	5,9
	4	5,5	5,0	5,8	4,3	5,7
	6	4,4	4,1	5,3	3,6	4,0
	24	2,2	3,6	4,1	2,6	1,7

Tabela 5.51: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados na presença de 25, 50 e 70% de solvente utilizando enzima imobilizada - Cepa NRRL Y-7571

	Tempo (h)	pH 4,0	pH 4,4	pH 4,8	pH 5,2	pH 5,6
25% Solvente	0	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
	1	13,3	8,0	8,4	6,6	6,1
	4	11,4	7,4	8,9	5,1	4,8
	6	9,9	6,8	8,0	5,5	5,0
	24	8,0	5,4	4,2	4,0	3,7
50% Solvente	0	14	14	14	14	14
	1	10	9,7	12,9	13,2	12,8
	4	11,2	9,2	10,8	11,7	8,6
	6	10,5	8,6	8,4	8,4	7,3
	24	9,2	8,5	6,7	3,5	3,8
70% Solvente	0	15,9	15,9	15,9	15,9	15,9
	1	14,0	17,3	15,9	14,6	12,9
	4	13,2	12,2	13,4	12,8	10,8
	6	10,9	11,7	10,9	11,8	9,9
	24	8,1	9,2	5,1	3,8	4,0

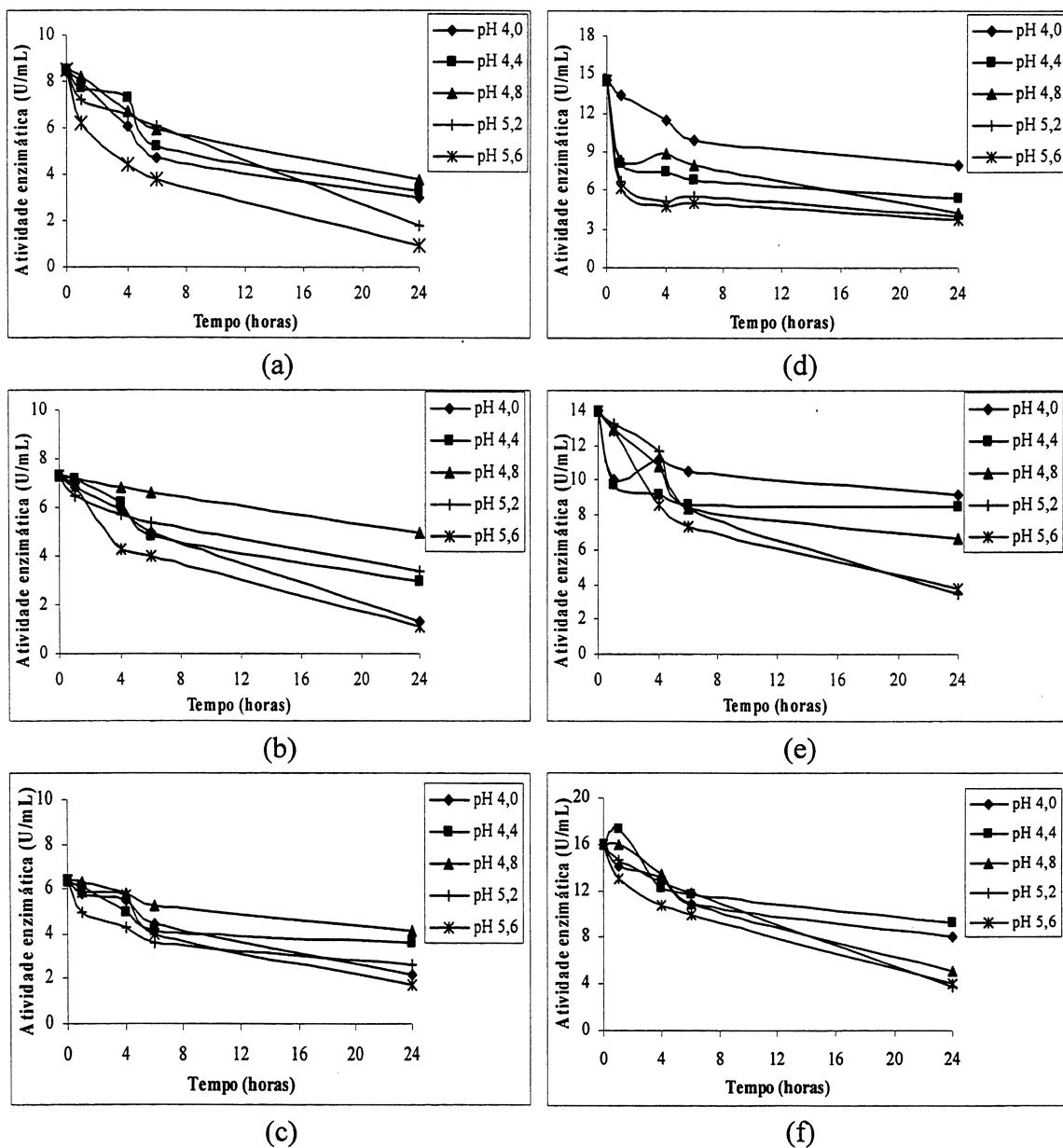


Figura 5.14: Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase imobilizada para a cepa ATCC 16045 na presença de (a)25%, (b)50% e (c)70% e para a NRRL Y-7571 (d) 25, (e)50 e (f) 70% de solvente.

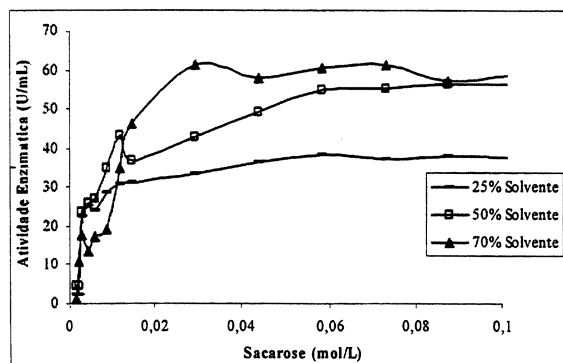
5.3.5. Determinação de K_m e V_{max}

O mesmo procedimento utilizado no item 5.2.3 para a enzima livre na determinação de K_m e V_{max} foi usado para a enzima imobilizada. Na Tabela 5.52 e na Figura 5.15 estão

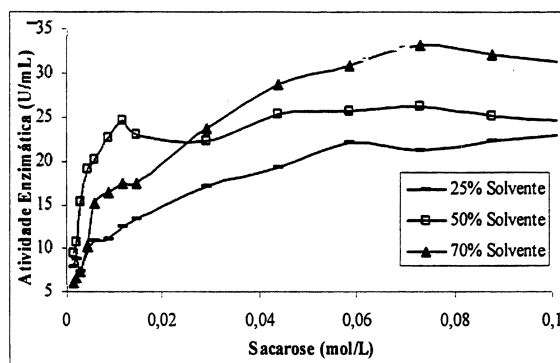
apresentados os valores das atividades enzimáticas (U/mL), utilizando a enzima na forma imobilizada na presença das três porcentagens de solvente, utilizando uma faixa de concentração de substrato sacarose de 0,5 a 35 g/L.

Tabela 5.52: Atividades enzimáticas (U/mL), na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de sacarose [S] para enzima imobilizada

S (g/L)	S (mol/L)	Cepa ATCC 16045 Atividade (U/mL)			Cepa NRRL Y-7571 Atividade (U/mL)		
		25% solvente	50% solvente	70% solvente	25% solvente	50% solvente	70% solvente
0,5	0,001	2,3	4,3	1,2	7,8	9,5	6,0
0,75	0,002	2,2	4,6	11,0	8,8	10,8	6,6
1	0,002	22,5	23,7	17,5	7,3	15,4	7,4
1,5	0,004	25,0	26,0	13,7	9,7	19,1	10,3
2	0,005	24,0	27,2	17,4	10,8	20,1	15,2
3	0,008	28,4	35,0	19,3	11,0	22,6	16,4
4	0,011	30,9	43,4	35,0	12,4	24,6	17,4
5	0,014	31,2	37,0	46,2	13,4	23,1	17,5
10	0,029	33,6	43,0	61,3	17,1	22,3	23,7
15	0,043	36,4	49,1	57,9	19,3	25,4	28,7
20	0,058	38,2	55,0	60,5	22,1	25,7	30,9
25	0,073	37,2	55,3	61,4	21,3	26,3	33,3
30	0,087	38,0	56,4	57,2	22,4	25,2	32,2
35	0,102	37,7	56,5	58,8	23,1	24,5	31,2



(a)



(b)

Figura 5.15: Atividade enzimática da inulinase imobilizada a $T = 50^{\circ}\text{C}$, na presença das três porcentagens de solvente, em função da concentração de substrato (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571.

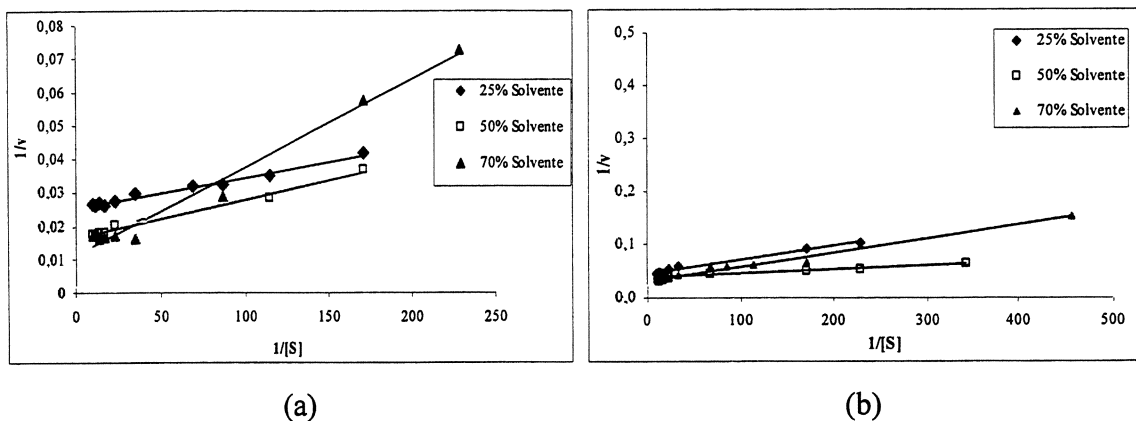


Figura 5.16: Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para 25, 50 e 70% de solvente (a) para a cepa ATCC 16045 e (b) para a cepa NRRL Y-7571, para enzima imobilizada.

Pelas equações do gráfico linearizado (Figura 5.16), obtêm-se os valores de K_m e V_{max} . As equações foram as seguintes:

Para a cepa ATCC 16045

$$1/v = 9.10^{-5} (1/[S]) + 0,0254 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para 25\% de solvente}$$

$$1/v = 1.10^{-4} (1/[S]) + 0,0166 \text{ com } R^2 = 0,99 \text{ para 50\% de solvente}$$

$$1/v = 3.10^{-4} (1/[S]) + 0,0116 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para 70\% de solvente}$$

Para a cepa NRRL Y-7571

$$1/v = 3.10^{-4} (1/[S]) + 0,0435 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para 25\% de solvente}$$

$$1/v = 7.10^{-5} (1/[S]) + 0,0376 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para 50\% de solvente}$$

$$1/v = 3.10^{-4} (1/[S]) + 0,0301 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para 70\% de solvente}$$

Os valores de K_m e V_{max} para as porcentagens de solvente estudadas encontram-se na Tabela 5.53.

Tabela 5.53: Parâmetros cinéticos K_m e V_{max} para as três porcentagens de solvente estudadas, enzima imobilizada

	Cepa ATCC 16045		Cepa NRRL Y-7571	
	K_m (M)	V_{max} (mol/(min.L))	K_m (M)	V_{max} (mol/(min.L))
25% de solvente	0,0035	39,3	0,006	22,9
50% de solvente	0,006	60,2	0,002	27,0
70% de solvente	0,025	86,2	0,01	33,2
Aquoso*	0,096	$33,4 \cdot 10^{-9}$	-	-

* Santos (2002) utilizando ATCC 16045 mas método de imobilização diferente do utilizado neste trabalho.

Utilizando como substrato a inulina, os valores encontrados por Barranco *et al.*, (2001) foram de 0,52 M e 113,7 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para a inulinase imobilizada. A enzima foi obtida a partir do *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* CDBB-L-278.

6. Conclusões

A enzima inulinase, a partir das cepas ATCC 16045 e NRRL Y-7571, foi caracterizada tanto nas formas livres como imobilizadas na presença do solvente orgânico acetato de butila e os resultados de temperatura ótima e de estabilidade, pH ótimo e de estabilidade, meia-vida (min), os valores de energia de ativação da reação (Kcal/mol) e da desnaturação (Ed), e os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} estão nas tabelas abaixo:

Tabela 6.1: Caracterização da Cepa *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045.

	% de solvente	Enzima livre	Enzima imobilizada
Temperatura ótima	25	55°C	55°C
	50	55°C	55°C
	70	55°C	55°C
Estabilidade Térmica	25	50°C	50°C
	50	50°C	50°C
	70	50°C	50°C
t_{1/2} (h)	25	12,8	38,5
	50	11,5	23,1
	70	11,5	38,5
pH ótimo	25	4,8	4,4
	50	4,8	4,4
	70	4,8	4,4
pH de estabilidade	25	4,4	4,8
	50	4,8	4,8
	70	4,4	4,8
Ea (Kcal/mol)	25	23,3	22,3
	50	21,3	19,4
	70	12,6	20,7
K_m (M)	25	0,016	0,0035
	50	0,170	0,006
	70	0,130	0,025
V_{max} (mol/(min.L))	25	10,6	39,3
	50	34,7	60,2
	70	23,7	86,2
Ed (Kcal/mol)	25	84,3	67,5
	50	84,1	58,5
	70	85,1	70,1

Tabela 6.2: Caracterização da Cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

	% de solvente	Enzima livre	Enzima imobilizada
Temperatura ótima	25	50°C	55°C
	50	50°C	60°C
	70	50°C	55°C
Estabilidade Térmica	25	50°C	50°C
	50	50°C	50°C
	70	50°C	50°C
t_{1/2} (h)	25	7,7	14,4
	50	23,1	19,2
	70	16,5	11,5
pH ótimo	25	4,8	4,8
	50	4,8	4,8
	70	4,8	4,8
pH de estabilidade	25	4,4	4,0
	50	4,4	4,0
	70	4,0	4,4
Ea (Kcal/mol)	25	19,8	10,2
	50	13,8	7,2
	70	20,0	18,0
K_m (M)	25	0,026	0,006
	50	0,038	0,002
	70	0,08	0,01
V_{max} (mol/(min.L))	25	11,3	22,9
	50	21,2	27,0
	70	35,2	33,2
Ed (Kcal/mol)	25	78,3	60,0
	50	88,2	65,1
	70	87,5	57,6

Foram realizadas sínteses utilizando diversos solventes e através dos resultados pode-se observar que é possível a realização da síntese em meio orgânico. Dentre os solventes estudados, o mais adequado para a síntese de frutooligossacarídeos utilizando a enzima inulinase foi o acetato de butila, o qual forma um sistema bifásico com o tampão.

A metodologia do planejamento experimental mostrou-se muito útil para este estudo de otimização da conversão da sacarose em frutooligossacarídeos YFOSs (%). As variáveis independentes estudadas foram: pH, porcentagem de sacarose, relação solvente/tampão,

atividade enzimática, temperatura e PEG. Além da sensível redução no número de ensaios, as faixas utilizadas foram modificadas em função dos efeitos apresentados a cada planejamento realizado.

A partir da cepa 16045:

Utilizando o sistema orgânico enzima livre, a máxima YFOSs obtida foi de 13,5%, nas seguintes condições: temperatura de 45°C, 4,0U/mL de enzima, relação solvente/tampão de 25/75(%), pH 5,7 e 55% de sacarose.

Utilizando o sistema aquoso enzima livre, a máxima YFOSs obtida foi de 11,9%, nas seguintes condições: temperatura de 45°C, pH 6,5, 45% de sacarose e 4,0 U/mL de enzima.

Utilizando o sistema orgânico enzima imobilizada, a máxima YFOSs obtida foi de 18,7% nas seguintes condições: temperatura de 40°C, pH 4,0, 50% de sacarose, 4,0 U/mL de enzima e relação solvente/tampão de 75/25(%).

Utilizando o sistema aquoso enzima imobilizada, a máxima YFOSs obtida foi de 15,3% nas seguintes condições: temperatura de 40°C, pH 5,5, 90% de sacarose e 3,3 U/mL de enzima.

A partir da cepa 7571:

Utilizando o sistema orgânico enzima livre, a máxima YFOSs obtida foi de 16,7% nas seguintes condições: temperatura de 40°C, pH 6,0, 55% de sacarose, 4,0 U/mL de enzima e relação solvente/tampão de 25/75(%).

Utilizando o sistema aquoso enzima livre, a máxima YFOSs obtida foi de 15,2% nas seguintes condições: temperatura de 40°C, pH 5,0, 65% de sacarose e 4,0 U/mL de enzima.

Utilizando o sistema orgânico enzima imobilizada, a máxima YFOSs obtida foi de 18,2% nas seguintes condições: temperatura de 40°C, pH 5,0, 60% de sacarose, relação solvente/tampão de 25/75(%) e 5,5U/mL de enzima.

Utilizando o sistema aquoso enzima imobilizada, a máxima YFOSs obtida foi de 16,8% nas seguintes condições: temperatura de 40°C, pH 5,0, 60% de sacarose e 4,0U/mL de enzima.

Comparando-se as duas cepas, ATCC 16045 e NRRL Y-7571, foi possível observar que, em relação ao sistema orgânico com enzima imobilizada, ambas apresentaram praticamente a mesma produção.

Enquanto que para o sistema utilizando a enzima na forma livre a cepa NRRL Y-7571 apresentou maior conversão da sacarose em frutooligossacarídeos tanto em meio orgânico quanto em aquoso, ou seja a sua atividade de transferência foi maior que a da cepa ATCC 16045.

As condições otimizadas em relação aos parâmetros estudados para a síntese de YFOSs nos 4 processos estudados podem ser resumidos nas tabelas abaixo:

Tabela 6.3: Condições Otimizadas para YFOSs a partir da Cepa ATCC 16045.

Processo	YFOSs (%)	T (°C)	Enzima (U/mL)	Solvente/tampão (%)	pH	Sacarose (%)
Orgânico livre	13,5	45	4,0	25/75	5,7	55
Aquoso livre	11,9	45	4,0	0/100	6,5	45
Orgânico imob.*	18,7	40	4,0	75/25	4,0	50
Aquoso imob.*	15,3	40	3,3	0/100	5,5	90

Sendo imob.* = imobilizada

Tabela 6.4: Condições Otimizadas para YFOSs a partir da Cepa NRRL Y-7571.

Processo	YFOSs (%)	T (°C)	Enzima (U/mL)	Solvente/tampão (%)	pH	Sacarose (%)
Orgânico livre	16,7	40	4,0	25/75	6,0	55
Aquoso livre	15,2	40	4,0	0/100	5,0	65
Orgânico imob.*	18,2	40	5,5	25/75	5,0	60
Aquoso imob.*	16,8	40	4,0	0/100	5,0	60

Sendo imob.* = imobilizada

7. Sugestões para trabalhos futuros

Utilizar a metodologia desenvolvida neste trabalho no estudo da produção de frutooligossacarídeos utilizando-se outros microrganismos que foram isolados recentemente no Laboratório de Bioprocessos (LEB) que apresentaram uma maior atividade de transferência.

8. Referências Bibliográficas

- BAILEY, J.F.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2ª edição. Mc Graw-Hill Inc. N. York, 1986.
- BARRANCO-FLORIDO, E.; GARCÍA-GARIBAY, M.; GÓMEZ-RUIZ, L.; AZAOLA, A.; Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 37, p.513-519, 2001.
- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H.; Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.72, No. 6, p.491-494, 1991.
- BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J. **Applied Biocatalysis**. Harwood Academic Publishers. Chur, Switzerland, 1994.
- BLANDINO, A.; MACÍAS,M.; CANTERO,D. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.319-324, 2000.
- BOON, M.; JANSSEN, E.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.271-281, 2000.
- BRINK, L.E.; TRAMPER, J.; LUYBEN, K.; RIET, K. Biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.736-742, 1988.
- CABRAL, F. A ., Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio, **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP, 1989.
- CARVALHO, P.R. **Cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à análise de alimentos**. ITAL Instituto de Tecnologia de Alimentos Manual Técnico número: 11. Campinas-SP , p. 22-31, 1993.

- CHEETHAM, P. S.; HACKING, A.; VLITOS, MV.; Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p.212-219, 1989.
- CHENG, C.; DUAN, K.; SHEU, D.; LIN, C.; LI, S.; Production of fructooligosaccharides by immobilized mycelium of *Aspergillus japonicus*. **J. Chem. Tech. Biotechnology**, v. 66, p.135-138, 1996.
- CHIEN, C.; LEE, W.; LIN, T.; Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.252-257, 2001.
- CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC**. São Paulo-SP: Editora Edgard Blücher Ltda, p. 28-34; 81-97, 1998.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos** 6 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, p. 11-27,1995.
- CONTADO, J.L. Produção e caracterização de β -frutofuranosidase de linhagem mutante de *Aspergillus niger* e sua aplicação na produção de fructooligossacarídeos. Campinas, 93p. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,1998.
- CONTIERO, J. Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas. **Tese de Doutorado** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,1992.
- COSTA, F.A.A. Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1986.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v.32 p.353-361, 1996.

- CRUZ, R.; VINÍCIUS; CRUZ, D.; BELINI, M.; BELOTE, J.; VIEIRA, C. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v. 65, p.139-143, 1998.
- DORDICK, J. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p.194-209, 1989.
- ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C.; Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, No. 7 p.596-601, 2001.
- FUTAGAWA, M. Estudo da Imobilização da Enzima Inulinase, **Relatório Científico**, Fapesp, 2002.
- GARIBAY, G.; RAMIREZ, Q.; MUNGUÍA, L. **Biotecnología Alimentaria**. México: Editora Limusa, 1993.
- GENNARO, S.; BIRCH, G.; PARKE, S.; STANCHER, B. Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. **Food Chemistry**, v.68, p.179- 183, 2000.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, No. 4, p.412-420, 1994.
- HANG, Y.; WOODAMS, E.; Optimization of enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Lebensm.-Wiss u-Technol.**, v. 29, p. 578-580, 1996.
- HAYASHI, S.; IMADA, K.; KUSHIMA, Y.; UENO, H. Observation of the Chemical Structure of Fructooligosaccharide Produced by an Enzyme from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Current Microbiology**, v.19, p.175-177, 1989.
- HAYASHI, S.; KINOSHITA, J.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K.; Continuous production of 1-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass. **Biotechnology Letters**, v. 13, No.6, p.395-398, 1991.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; A Fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, No.5, p.1181-1187, 1988.

- HIRAYAMA, M.; SUMI,N.; HIDAKA, H.; Purification and properties of a fructooligosaccharides-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, No.3, p.667-673, 1989.
- HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G. Bifidobacteria: Their Potencial for use in American Dairy Products. **Food Technology**, p.74-80, 1991.
- ILLANES, A.; BARBERIS, S. **Catalisis Enzimatica en Fase Organica**. Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
- JUNG, K. H.; YUN, J.; KANG, K.; LIM, J.; Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p.491-494, 1989.
- KABKE, K.C.P. Otimização da Produção de Inulinase em Meio Industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, Campinas. 77p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,2002.
- KALIL, S.J. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. Campinas. 141p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,2000.
- KALIL, S.J.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M.I. "Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* Using Factorial Design". **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 94, No.3, 257-264, 2001.
- KANG, S.; CHANG, Y.; OH, S.; KIM, S.; Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Letters**, v. 20, No.10, p.983-986, 1998.
- KATO, K.; ARAKI, T.; KITAMURA, T.; MORITA, N.; MOORI, M.; SUZUKI, Y.; Purification and properties of a thermostable inulinase (beta-d-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP 1289. **Starch-Starke**, v.51, No. 7 p.253-258, 1999.

- KAUR, N.; KAUR,M.; GUPTA, AK.; SINGH, R.; Properties of beta-fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium-Oxysporum* grown on an aqueous extract of cichorium-intybus roots. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.53, No.3, p.279-284, 1992.
- KAUR, I; CHOPRA, K; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15 , p.1-9, 2002.
- KIM, B.; CHOI, J.; YUN, J.; Selective production of GF₄- fructooligosaccharides from sucrose by a new transfructosylating enzyme. **Biotechnology Letters**, v. 20, No.11, p.1031-1034, 1998.
- KUSHI, R.T.; HOJO, O.; TREVISAN, H.C.; MONTI, R.; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, São Carlos. **Anais XI SINAFERM**, p. 309,1996.
- KUSHI, R .; MONTI, R.; CONTIERO, J.; Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.25, No. 2 p.63-69, 2000.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering** , v.30, p.81-87, 1987.
- LEE, Y. Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.720, p.137-149, 1996.
- L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S.; Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v.81, p.73-84, 2000.
- LORENÇO, C. Estudo do processo de obtenção de glicose e frutose a partir da sacarose Campinas. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,2004.

- MAKINO, Y. Produção e purificação de inulinase obtida a partir das espécies de *Kluyveromyces* para síntese dos frutooligossacarídeos. Campinas. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos em andamento)**-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- MAKINO, Y.; SCANAVINI, H.F.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Produção e caracterização da inulinase obtida pela levedura *Kluyveromyces*, **Anais do 4º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos-SLACA**, 12-15 novembro, 2001.
- MANZONI, M.; CAVAZZONI, V. Hidrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.54, p. 311-315, 1992.
- MARX, S.; WINKLER, S.; HARTMEIER, W. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.182, p. 163-169, 2000.
- MATTIASSEN, B.; ADLERCREUTZ, P. Tailoring the microenvironment of enzymes in water-poor systems. **Enzyme and Microbial Technology**, novembro, p.394-398, 1991.
- MAUGERI, F. **Apostila de Engenharia Bioquímica**. FEA – UNICAMP, 2002.
- MEDEIROS, J.; KALIL, S.J.; COSTA, F.; NAKASHIMA, E.B.; CABRAL, A.S.; ZAVICKIS, F.P.; SILVA, J.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Estudo da Influência da Concentração de Substrato, pH e Temperatura na Determinação da Atividade Enzimática da Inulinase, Florianópolis. **Anais ENPROMER**, p.350-351, 1999.
- MESSING, R.A. **Immobilized enzymes for industrial reactors**. New York: Academic Press Inc., Cap. 1, p.1-10, 1975.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-429, 1959.

- MODLER, H.W. Bifidogenic factors- sources metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v.4, p.383 - 407, 1994.
- MUNGUÍA, A.; RAMÍREZ, R. **Aplicaciones en alimentos y medicina**. Tecnología Enzimática. México: Dirección General de Publicaciones, 1987.
- NGUYEN, Q.; MATTES, F.; HOSCHKE, A.; REZESSY-SZABÓ, J.; BHAT, M.; Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.183-186, 1999.
- O'MAHONY, M. **Sensory Evaluation of Food Statistical Methods and Procedures**. Marcel Dekker, INC, New York, p. 487, 1986.
- ÖNGEN-BAYSEL, G., SUKAN, S.S., VASSILEV, N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*, **Biotechnology Letters**, v.16, No. 3, 275-280, 1994.
- REGULY, C.J. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas-RS: Editora Universitária - UFPel, S.A., 222p, 2000.
- ROUWENHORST, R.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.; DIJKEN, J.; Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, No.11, p.3337-3345, 1990.
- SANGEETHA, P.; RAMESH, M.; PRAPULLA, S.; Production of fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR202 and *Aureobasidium pullulans* CFR77. **Process Biochemistry**, IN PRESS, 2003.
- SANTOS, A.M.P. Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas, 91p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- SANTOS, A.M.P. Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. Campinas. **Tese de Doutorado** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

- SHIN, H.; YANG, J. Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. **Biotechnology Letters**, v.16, No.11, p.1157-1162, 1994.
- SHIOMI, N.; ONODERA, S.; CHATTERTON, N.; HARRISON, P. Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. **Agriculture Biol. Chemistry**, v.55, No.5, p.1427-1428, 1991.
- SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y. Efeito da agitação e da aeração na Produção de inulinase em Processo de Batelada simples por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. **Tese de Mestrado, FEA, UNICAMP**, 2001.
- SOMIARI, R.; BIELECKI, S.; Effect of fructose and glucose supplementation on invertase mediated synthesis of oligosaccharides from sucrose. **Biotechnology Letters**, v.17, No.5, p.519-524, 1995.
- SOMIARI, R.I.; BIELECKI, S. Oligosaccharide synthesis by invertase in organic media containing SDS. **Biotechnology Letters**, v.20, No.3, p.287-290, 1998.
- SPIEGEL, J.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V.; SCHMITT, D. Safety and Benefits os Fructooligosaccharides as Food Ingredients. **Food Technology**, p.85-89, 1994.
- TOMOMATSU, H. Health effects os oligosaccharides. **Food Technology**, v.48, No.10, p.61-65, 1994.
- TREICHEL, H. Estudo de meios alternativos para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.ATCC 16045 Campinas, 81p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,2001.
- TREICHEL, H. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima. Campinas. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos em andamento)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas,2004.

- TUOHY, K; PROBERT, H.; SMEJKAL, C; GIBSON, G. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Therapeutic focus, DDT**, v.8, No.15, p.692-700, 2003.
- URGELL, M.; ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, 65 Suppl., S43-S52, 2001.
- WHITEHURST, R.; LAW, B. **Enzymes in Food Technology**. Sheffield Academic Press, U.S.A, 2002.
- WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. University of Surrey, Guildford, Halsted Press a division of John Wiley & Sons, New York, 1987.
- YUN, J. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application.. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.
- YUN, J.; KIM, D.; YOON, H.; SONG, S.; Effect of inulin concentration on the production of inulo-oligosaccharides by soluble and immobilized endoinulinase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, No. 4, p. 365-368, 1997.
- ZITTAN, L.; BAGSVAERD.; Enzymatic hydrolysis of inulin - An alternative way to fructose production. **Starch Stärke**, v.33, No. 11, p.373-377, 1981.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE