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

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *KLUYVEROMYCES* PRODUTORAS DE INULINASE VISANDO A OBTENÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA E OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO

Yemiko Makino Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Makino, Yemiko

M289s	Seleção de linhagens de Kluyveromyces produtoras de
	inulinase visando a obtenção de frutooligossacarídeos:
	caracterização na enzima e otimização das etapas de
	produção e purificação / Yemiko Makino Campinas, SP:
	[s.n.], 2004.

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

1. Inulinase. 2. *Kluyveromyces*. 3. Planejamento experimental. 4.Purificação. 5.Oligossacarideos. I.Rodrigues, Maria Isabel. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

ckn

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues Orientadora – DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Susana Juliano Kalil DQM/FURG

Prof. Dr. Everson Alves Miranda FEQ/UNICAMP

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato DCA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Maria da Graça S. Andrietta CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. César Costapinto Santana FEQ/UNICAMP

Dedico com muito carinho ao Delson, que esteve sempre presente em todos os momentos, e aos meus queridos filhos, Kleyton, Dyemi e Edylson.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria I sabel, que como orientadora, confiou e incentivou no desenvolvimento deste trabalho, e como amiga, as suas palavras de incentivo foram muito importantes nos momentos de difíceis.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri pelas sugestões e discussões valiosas que contribuíram para a realização do trabalho.

Aos meus pais Fumiko e Kenkichi (in memoriam), pelo exemplo de luta e per sever ança.

Aos meus ir mãos que sempre me apoiar am.

Às minhas amigas Amélia, Dina e Lucy minhas ir mãs de cor ação.

À Lia e Susana pelas discussões e sugestões que me instigaram para o desenvolvimento destetrabalho.

Às alunas de Iniciação Científica, Helena e Patrícia, que contribuíram com parte dos resultados de caracterização.

Às sempre companheiras Fifa e Eliana, pela ajuda e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório: Bernardo, Carlos, Daniel, Eduardo, Fernanda, Helen, Luciano, Olga, Rafael, Saartje, Tihany, André e Janaína, Keli, Marcio, pelos momentos de descontração, amizade e carinho.

Agradeço a todos do departameto que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

vii

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Enzimas	
2.2 Inulinase	6
2.2.2. Caracterização da inulinase	
2.3 Inulina	
2.4 Frutooligossacarídeos e oligossacarídeos	
2.5 Purificação de enzimas de caldo fermentado	
2.5.1 Cromatografia de troca iônica 2.5.2 Tipos de trocadores iônicos	
2.6 Adsorção em coluna de leito expandido	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Seleção do microrganismo	
3.1.1 Microrganismos	
3.1.2. Preparo do inóculo	
3.1.3 Fermentação	
3.2 Estudo da otimização do meio de fermentação em frascos agitados	
3.2.1 Otimização do meio de cultivo para a fermentação da linhagem <i>K. marxianus</i> NO	CYC 587
e produção de inulinase.	
3.2.2 Otimização do meio de cultivo para a fermentação da linhagem K. marxianus NF	KLY-
2.2.2. Comproveção de estudo de etimização	
5.2.5 Comprovação do estudo de otimização	
3.3 Caracterização parcial da inulinase	
3.3.1 Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade da inulinase	
3.3.2 Estudo do pH de estabilidade da enzima	
3.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m e V_{máx}$ da inulinase	
3.3.4 Estudo da estabilidade térmica da inulinase	
3.3.4 Imobilização da inulinase com alginato de sódio	

3.4 Adsorção da inulinase pela resina Streamline DEAE	39
3.4.1 Teste de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE em diferentes valores o	le pH
-	
3.4.2 Determinação do tempo de equilíbrio na adsorção da inulinase na resina Streamlin	ie
DEAE	40
3.4.3 Isotermas de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE	41
3.5 Purificação da inulinase através de cromatografia de troca iônica	42
3.5.1 Purificação da inulinase em leito fixo	42
3.5.2 Testes de purificação da inulinase em leito expandido	42
3.5.3 Preparo da Coluna Streamline 25	43
3.5.4 Procedimento para regeneração da resina Streamline	44
3.5.5 Sistema para a eluição da inulinase com gradiente salino linear e crescente	44
3.6 Estudo de otimização da purificação da inulinase produzida pelo microrganismo	K.
marxianus NRRL V-7571 em leito expandido	
3.6.1 Otimização da etapa de adsorcão da inulinase	48
3 6 1 1 Curva de ruptura completa	49
3 6 2 Otimização da etapa de dessorção da inulinase	49
eroiz o timização da capa de dessorção da manhasementamentamentamentamentamentamentament	
3.7 Métodos analíticos	51
3.7.1 Determinação da Atividade Enzimática (invertase e inulinase)	51
3.7.2 Determinação da Atividade Enzimática da inulinase imobilizada	51
3.7.3 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) pelo Método de DNS	51
3.7.4 Determinação de proteína	51
	E2
4. RESULTADOS E DISCUSSAO	ວວ
4.1 Seleção de microrganismos	53
4.2 Otimização do meio industrial para a produção de inulinase por <i>Kluyveromyces</i>	
marxianus	55
4.2.1 Resultados do estudo da otimização do meio de produção de inulinase pela linhago	em <i>K</i> .
marxianus NCYC 587	55
4.2.2 Resultados do estudo da otimização do meio de produção de inulinase pela linhago	em <i>K</i> .
marxianus NRRL Y-7571	60
4.2.3 Comprovação do estudo de otimização	63
4.2.3.1 Fermentação da linhagem K. marxianus NRRL Y-7571 em frascos agitados, e	em
meio otimizado.	63
4.2.3.2 Fermentação em fermentador de bancada tipo Bioflo	63
4.2 Constante a consist de instituere de liste sons V annu NDDI V 7771	
4.5 Caracterização parcial da inulinase da linhagem A. marxianus NKRL Y-7571	
4.5.1 Determinação de temperatura ouma e pH otimo de atividade da inulinase bruta do	caido
4.2.2 Determinação do pU de estabilidade de invilinços brate de estade formente de	00
4.5.2 Determinação do pri de estabilidade da indinase bruta do caído termentado	

4.3.3 Determinação de K_m e $V_{máx}$ da inulinase bruta	71
4.3.4 Determinação de K_m e $V_{máx}$ da inulinase purificada	
4.3.5 Estabilidade térmica	74
4.3.5.1 Estudo de estabilidade térmica da inulinase bruta	75
4.3.5.2 – Estudo da estabilidade térmica da inulinase bruta imobilizada	77
4.3.5.3- Resultado da estabilidade térmica da inulinase purificada	
4.3.5.4-Resultado para estabilidade térmica da inulinase purificada imobilizada	81
4.3.5.5 Comparação dos dados de kd estimado e meia vida da inulinase	83
4.4 Estudo de adsorcão da inulinase na resina aniônica Streamline DEAE	
4.4.1 Teste de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE equilibrada com tamp	vão
fosfato 0,05 M	
4.4.2 Teste de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE equilibrada com tamp	oão tris-
HCl 0,05 M	
4.4.3 Cinética de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE	
4.4.3.1 Cinética de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE em tampão for	sfato de
sódio 0,05M e pH 6,0	
4.4.3.2 Cinética de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE equilibrada en	1 tampão
tris-HCl 0,05 M e pH 7,5	
4.4.4 - Isoterma de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE	
4.4.4.1 – Isoterma de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada	em
tampão Fosfato 0,05 M e pH 6,0	
4.4.4.2 Isoterma de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada e	m
tampão tris-HCl 0,05M e pH 7,5	
4.5 - Purificação da inulinase em resina Streamline DEAE em leito fixo	
4.6 Ensaios preliminares no estudo de purificação da inulinase em resina Streamlino	e DEAE
em leito expandido	
4.7 Estudo de otimização da purificação da inulinase	111
4.7.1 Resultado do estudo de otimização da adsorção de inulinase em leito expandido	oor
planejamento experimental	112
5. CONCLUSÕES	127
6. SUGESTOES DE TRABALHOS FUTUROS	129
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXU A	141
ANEXO B	149

ANEXO C	159
ANEXO D	165

RESUMO

A utilização de frutooligossacarídeos como alimentos funcionais é proposta desde 1.980, e a sua importância reside no estímulo da produção de bifidobactérias na flora intestinal, que são responsáveis por vários efeitos benéficos à saúde. Devido às suas características físico-químicas e bioquímicas, estes compostos têm encontrado aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e produtos para diabéticos.

Os frutooligossacarídeos são os principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos.

A inulinase pode ser utilizada na obtenção de frutooligossacarídeos por síntese enzimática (a partir da sacarose) ou através da hidrólise de inulina.

Neste trabalho foram estudadas dez linhagens de *Kluyveromyces* para a produção de inulinase, sendo que a linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 foi selecionada como melhor produtora de inulinase. O meio de cultivo industrial para produção de inulinase por esta linhagem, composto por 90 g/L de melaço de cana, 45 g/L de água de maceração de milho e 4 g/L de extrato de levedura, foi otimizado pela metodologia do planejamento experimental e análise de superfície de resposta como ferramenta, atingindo uma produção em atividade enzimática em torno de 800 U/mL.

As etapas de purificação da inulinase (adsorção e eluição) em coluna de leito expandido utilizando resina aniônica Streamline DEAE, também foram otimizadas através do planejamento experimental e análise de superfície para a melhor adsorção, e obtenção do maior fator de purificação e recuperação. A melhor condição de adsorção foi com o tampão fosfato 0,02 M, pH 6,5 e fator de expansão 2,0. A capacidade de adsorção obtida de 22.627 U/mL em coluna de leito expandido é muito superior à capacidade máxima de adsorção (Qm) de 1.428 U/mL, obtido em testes de batelada. Na dessorção da enzima, foram otimizados os valores de pH e o volume necessário para o gradiente salino de NaCl passar de 0 para 1 M durante a eluição. Através do planejamento experimental definiu-se pH na faixa de 5,0 a 5,5 e o volume do gradiente salino na faixa de 650 a 1.000 mL, resultando uma recuperação de praticamente 100% da enzima alimentada na coluna e um fator de purificação de 24 vezes.

ABSTRACT

The use of fructooligosaccharides as functional foods have been proposed since 1980, whose importance comes from its role as a stimulating factor of the intestinal reproduction of bifidobacterium, which are responsible for some beneficial health effect. Due its physical, chemical and biochemical characteristics, these compounds have been used in food industries, cosmetics, druggists and diabetic products.

Inulinase can be used in the production of fructooligosaccharides by enzymatic synthesis (from sucrose) or through hydrolysis of inulin. The fructooligosaccharides are the main oligosaccharides among the bifidogenic class.

In these work ten different strains of *Kluyveromyces* species have been studied. Among them, the strain NRRL Y-7571 was selected as the best producer of inulinase. The composition of the production or industrial medium was optimized as 90 g/L of sugar cane molasses, 45 g/L of corn steep liquor and 4 g/L of yeast extract, using the methodology of experimental design and of response surface analysis, leading to an enzymatic activity production as high as 800 U/mL.

The purification stages of inulinase (adsorption and elution) in an expanded bed column of the anionic resin Streamline DEAE, was also optimized through the experimental design and of response surface analysis for the best adsorption, attaining the best purification factor and recovery.

The best adsorption condition was obtained with phosphate buffer 0.02 M, pH 6.5 and factor of expansion 2. The adsorption capacity as high as 22,627 U/mL was obtained against 1,428 U/mL obtained in batch tests.

The values of pH and the volume for the saline gradient of NaCl (from 0 M to 1 M) were optimized for the enzyme elution through the experimental design, and they were defined as pH ranging from 5.0 to 5.5 and volume of the saline gradient ranging of 650 to 1,000 mL. Such conditions enabled a practical recovery of 100% of the injected enzyme and a purification factor as high as 24 times.

1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia refere-se a um conjunto de tecnologias que possuem em comum o uso de células e moléculas biológicas para aplicações na produção de bens e serviços em áreas como saúde humana e animal, agricultura e manejo do meio ambiente. Atualmente, é crescente o ritmo de desenvolvimento do setor, mantendo, inclusive, uma acentuada relação de interação com diversos outros setores da ciência e tecnologia tais como: biologia molecular, fisiologia, microbiologia, engenharia química, engenharia ambiental, etc.

Muitas destas tecnologias envolveram mudanças controladas do DNA em organismos, que foram rapidamente aplicadas na engenharia de proteínas e na produção de medicamentos. Nas décadas de 80 e 90 passadas, novas tecnologias foram adicionadas, como o sequenciamento automatizado de genes e as técnicas de amplificação de DNA. A chamada "Indústria de Biotecnologia" é a aplicação em escala industrial e empresarial destas tecnologias, acrescidas de diversas outras, como fermentação e purificação em escala industrial de proteínas para a geração de produtos diversos (farmacêuticos, alimentos, enzimas). Os números da Ernst & Young (empresa de renome internacional de Consultoria e Auditoria) confirmam a expansão do mercado de biotecnologia, que passou de US\$ 8 bilhões/ano em 93, para US\$ 20 bilhões em 1999 e para US\$ 47 bilhões em 2001, ou seja, aproximadamente 0,15% do PIB mundial, de US\$ 30 trilhões (ANONIMO 1).

Uma das áreas que vêm crescendo ano a ano refere-se ao grupo de alimentos funcionais onde o Brasil apresenta grande potencial de desenvolvimento. Os frutooligossacarídeos se enquadram nesse grupo, e representam uma das principais classes de oligossacarídeos bifidogênicos, importantes no processo digestivo humano.

Os frutooligossacarídeos são normalmente produzidos por dois processos distintos, mas que não apresentam diferenças significativas no produto final. No primeiro processo a sacarose é utilizada como substrato, obtendo 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 (SANTOS, 1998). O segundo processo constituise na hidrólise enzimática da inulina, produzindo frutooligossacarídeos de cadeia longa (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996). Na obtenção de produtos por processos fermentativos, a escolha adequada do método de purificação é importante para se obter um produto viável comercialmente.

No planejamento da estratégia de purificação deverão ser considerados:

1- As necessidades regulamentadoras: especificações determinadas pela farmacopéia de referência, Ministério da Saúde e órgãos reguladores.

2- Aplicação final do produto: humano, veterinário ou diagnóstico.

3- Escala de manufatura para atender à demanda do produto.

4- Viabilidade econômica.

5- Existência de facilidades de produção ou não, devendo ser considerada, inclusive, a terceirização da produção, etc.

Um processo de purificação que vem recebendo atenção é a adsorção de proteínas na presença de biomassa através de leito expandido. A adsorção em leito expandido envolve etapas de clarificação, concentração e purificação em uma única operação. O uso de adsorvente com densidade controlada permite obter um leito estável, com cada partícula mantendo uma posição discreta no leito com um pequeno movimento circular. Deste modo, este processo, comparado com o leito fluidizado, apresenta uma maior capacidade de adsorção, se comportando como um reator tubular durante a alimentação (SNOW, 1994).

Assim, este trabalho foi elaborado com a intenção de contribuir com a indústria de biotecnologia através dos estudos de produção da enzima inulinase e a sua purificação em leito expandido. O interesse pela inulinase é a sua utilização na síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose dando continuidade a estudos realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (FEA-UNICAMP). A escolha da sacarose como matéria-prima vêm em função do seu baixo custo e da grande disponibilidade deste produto no país.

Kalil (1999) estudou a otimização da produção da enzima inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, sendo que a atividade inicial de 9 U/ml atingiu 120 U/ml de atividade sobre sacarose após a otimização. As condições de máxima produção da enzima em frascos agitados foram: sacarose 14 g/L, extrato de levedura 10

2

g/L, peptona 20 g/L, K_2 HPO₄ 1 g/L e pH 3,5 a uma temperatura de 30°C e agitação de 150 rotações por minuto (rpm).

Com a produção otimizada a partir de *Kluyveromyces marxianus var. bulgarius*, a inulinase foi estudada paralelamente no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (LEB-FEA), para a produção de frutooligossacarídeos utilizando a sacarose como substrato (SANTOS, 1998 e 2002).

O uso das leveduras do gênero *Kluyveromyces* é interessante comercialmente, pois são consideradas GRAS ("Generally Recognized as Safe" – Geralmente Reconhecido como Seguro), sendo aceitas pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos EUA para a produção de compostos farmacêuticos e alimentícios (HENSING et al., 1994). No entanto, sabe-se que a inulinase pode ser produzida por outras espécies do gênero *Kluyveromyces*.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento das seguintes etapas:

 i) o estudo da otimização das espécies do gênero *Kluyveromyces* para a obtenção da inulinase em meios industriais (melaço e água de maceração de milho);

ii) caracterização parcial da inulinase para obtenção do pH ótimo, temperatura ótima, parâmetros cinéticos ($K_m e V_{máx}$) e estabilidade térmica para a enzima obtida da linhagem selecionada como a melhor produtora; e

iii) otimização das etapas de purificação da inulinase em leito expandido usando planejamento experimental sendo que para a etapa de adsorção foram estudadas as influências das variáveis pH, concentração do tampão e fator de expansão, e para a etapa de dessorção o pH e o volume do tampão com gradiente salino (NaCl) de 0 a 1 M.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

As enzimas são moléculas de proteínas complexas que agem como catalisadoras em reações bioquímicas. Elas são formadas dentro das células de todos os seres vivos, plantas, fungos, bactérias, e organismos microscópicos unicelulares. São as enzimas que controlam várias funções vitais incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de acelerar a reação dos processos bioquímicos, tornando-os mais eficientes.

As enzimas são extremamente eficientes e muito específicas nas suas funções, o que evita resultados indesejáveis. Fatores como altas temperaturas e pressões, ácidos ou álcalis fortes, e produtos químicos perigosos ou tóxicos, necessários a muitos processos industriais significam perigo potencial ao meio ambiente, assim como ao meio de trabalho. As enzimas protegem o meio ambiente, reduzindo a presença de produtos residuais e a necessidade do uso de ácidos ou álcalis fortes. O caminho para novas aplicações de enzimas está aberto nos mais variados tipos de indústrias.

A principal fonte de obtenção de enzimas são os microrganismos, embora muitas enzimas de aplicação industrial tenham sua origem em tecidos animais ou vegetais como por exemplo: renina, obtida do estômago de bezerros e papaína, obtida do mamão (ANÔNIMO 2).

O mercado industrial de enzimas no Brasil é expressivo e dinâmico, mas muito aquém do mercado mundial de enzimas, que movimenta US\$ 1,8 bilhão, centralizados na Europa e Estados Unidos. No Brasil, a comercialização totaliza US\$ 45 milhões, dos quais US\$ 35 milhões em importação. O Brasil é um país dependente em biocatalizadores, apesar de ter cerca de 500 pesquisadores na área (GANDRA, 2004).

Nos Estados Unidos, atualmente, as enzimas são regulamentadas por "US Food & Drug Administration" (FDA) sob a Lei de Alimentos, Drogas e Cosméticos ("Food, Drug & Cosmetic Act"). Os critérios adotados pela FDA para a utilização da enzima incluem análises de segurança de: enzima utilizada; microrganismo; processo de fermentação e preparação enzimática. As enzimas podem ser regulamentadas de duas formas: como um aditivo secundário direto ou como um ingrediente GRAS.

A legislação em vigor no Brasil (Lei de Biosegurança, 8.974/95, alterada e atualizada pela MP 2.191-9) atribui a CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biosegurança, composta por 36 membros indicados pelas sociedades representativas da comunidade científica brasileira, pelos Ministérios setoriais (Saúde, Agricultura, Abastecimento e Pecuária, Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia, Educação e Relações Exteriores), por entidades representativas dos consumidores, da saúde do trabalhador e do segmento empresarial da biotecnologia, a competência de estabelecer normas e regulamentos relativos às atividades e projetos que contemplem a construção, cultivo, manipulação, uso, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte dos OGMs (organismos geneticamente modificados) e seus derivados (ANÔNIMO 3).

2.2 Inulinase

As inulinases são classificadas como 2,1- β -D-frutanohidrolase (EC 3.2.1.7), e a diferença com invertase (β -fructofuranosidase, E.C. 3.2.1.26) não é clara para enzima microbiana. As inulinases atuam sobre o substrato sacarose, mas a invertase apresenta uma fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose. A diferença entre as duas enzimas pode ser observada pela relação S/I, que corresponde à razão das atividades relativa da enzima sobre a sacarose e inulina. Para altos valores de S/I a enzima é caracterizada como invertase, e para S/I menores que 50 é caracterizada como inulinase (VANDAMME & DERYCKE, 1985)

As inulinases podem ser utilizadas em processos de hidrólise da inulina para obtenção de xarope de frutose e de frutooligossacarídeos, e também na síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose.

2.2.1 Produção de inulinase

As inulinases são obtidas a partir de tubérculos e raízes de plantas que contém inulina ou através de microrganismos como fungos, bactérias e leveduras (SCHNEIDER,

1996). Vários autores trabalharam com a produção de inulinase a partir de diversos microrganismos como *Aspergillus niger* (AZHARI et al., 1989; ONGEN-BAYSAL, 1994), *Aspergillus ficuum* (ETTALIBI & BARATTI, 1987), *Fusarium oxysporum* (GUPTA et al., 1990, 1992), *Flavobacterium multivorum* (ALLAIS et al., 1986), *Penicillium trzebinskii* (ONODERA, 1992), *Streptomyces sp.*(GILL, 2002) e *Pseudomonas sp* (KIM et al., 1997)

Dentre esses microrganismos, as leveduras têm sido muito estudadas para a produção de inulinase, pois oferecem vantagens sobre os fungos no processo de fermentação por sua natureza unicelular, facilitando as operações de separação. As leveduras do gênero *Kluyveromyces* foram as que apresentaram melhor produção de inulinase como podem ser verificados nas citações abaixo.

Grootwassink & Fleming (1980) produziram inulinase a partir *Kluyveromyces fragilis* ATCC 12424, utilizando meio complexo, contendo uma fonte de carbono a inulina ou sacarose, e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, vitaminas e nutrientes inorgânicos. Na fermentação em batelada, a 30°C, a síntese de inulinase atingiu um máximo de aproximadamente 40.000 μ g/(min.mL) de hexose (222 μ mol/(min.mL)) após 17 horas. O meio de cultivo consistiu de 2% de inulina e 1% de extrato de levedura, com uma aeração de 2 vvm e 500 rotações por minuto (rpm), e o pH se manteve em valores favoráveis de 5,5 a 6,5. A utilização de sacarose reduziu a produção de inulinase em 80%.

No estudo de produção de inulinase por *Kluyveromyces fragilis* (NCIM 3217), foi obtido máximo de rendimento (7 U/mL) ao utilizar o extrato da raiz de chicória contendo 1% de frutano como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio (GUPTA, 1994).

A produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* UCD (FST) 55-82 utilizando várias fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose e inulina), foi estudada por Parekh & Margaritis (1986), e também foi obtido uma máxima atividade de inulinase (212 U/mL) ao utilizar o meio contendo inulina como substrato.

Rouwenhorst et al. (1988) utilizaram *K. marxianus* var. *marxianus* CBS 6556 para obtenção de inulinase. Os cultivos foram realizados a 40°C, com 50 a 70% de ar saturado e pH foi mantido em 4,5 por adição de KOH 1 M ou H_2SO_4 0,5 M. Em culturas contínuas, os maiores rendimentos de inulinase foram obtidos utilizando-se sacarose ou inulina como

substrato limitante. Os níveis de inulinase em culturas no quimiostato com sacarose como substrato, foram altamente dependentes da taxa de diluição. Os valores decresceram de um máximo de 52 U/mg massa seca na taxa de diluição de $0,1h^1$, para 2 U/mg massa seca na taxa de diluição de $0,8 h^{-1}$.

Hensing (1994) trabalhando com a mesma linhagem de *Kluyveromyces*, estudou a produção extracelular de inulinase em batelada alimentada a 30 e 40°C e nas duas temperaturas a produção final de biomassa excedeu 100 g/L e mais que 2 g/L de enzima. A 40°C a fermentação foi de apenas 33 horas quando comparado com 42 horas a 30°C.

Schneider (1996) estudou a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e a faixa de temperatura entre 32-37°C foi a que proporcionou melhor crescimento celular e atividade enzimática total. O controle de pH do meio em 4,5 foi favorável à produção de inulinase em relação ao meio sem controle. A influência da concentração inicial de substrato foi estudada entre 10 e 60 g/L. Os resultados mostraram que concentrações de inulina acima de 20 g/L não são favoráveis à produção de enzima. A utilização de bacto peptona não foi imprescindível à formação de enzima, no entanto, a presença de extrato de levedura foi fundamental para o crescimento e formação da enzima. Concentrações crescentes de uréia ou sulfato de amônio ocasionaram uma diminuição na formação de células e na síntese de inulinase. Valores crescentes do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (21 a 89 h⁻¹) foram favoráveis à formação de biomassa e à síntese de inulinase.

A metodologia da análise de superfície de resposta foi utilizada por Wei (1998), para estudar a produção de inulinase por *Kluyveromyces sp.* Y-85. Efetuando a fermentação em equipamento de 15 litros de capacidade, foi obtida a atividade máxima de 59,5 U/mL com fermentação de 24 horas a 30°C, em meio composto por extrato de alcachofra de Jerusalém, uréia, extrato de carne, água de maceração de milho com concentrações de 8,0%, 2,0%, 0,2% e 4,0% respectivamente. Repetindo-se o estudo em fermentador de capacidade de 1.000 litros, a produção de inulinase no aumento de escala subiu para 68,9 U/mL. Os trabalhos citados a seguir mostram a evolução da pesquisa sobre a inulinase no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp (LEB-FEA-UNICAMP).

Inicialmente, Costa (1986) estudou a produção de invertase por *Kluyveromyces marxianus*. Posteriormente, Santos (1998) verificou que a enzima também atuava sobre a inulina com valores de S/I baixos e que poderia ser denominada inulinase. O meio composto por 30 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 5,0 g/L de K₂HPO₄, sendo o pH inicial de 3,5, levou a uma produção em atividade de 7,54 U/mL e boa reprodutibilidade quando comparado ao meio que continha água de maceração de milho e melaço, apesar deste último em algumas fermentações atingir maiores atividades. As fermentações foram realizadas a 30°C, aeração de 0,2-0,3 vvm, com agitação moderada e tempo de fermentação de 18 horas.

Kalil (1999) otimizou a produção de inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* (ATCC 16045), utilizando o planejamento fatorial e análise de superfície de resposta. A condição ótima do meio para a produção da enzima (atividade de 120 U/mL) em frascos agitados foi: sacarose 14 g/L, extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, pH 3,5 a 30°C.

Silva-Santisteban (2001) estudou o efeito da aeração e agitação na produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, e obteve melhor produção atingindo 176 U/mL, utilizando agitador de pás inclinadas ("pitched blade up") com 450 rpm e 1,0 vvm.

Treichel (2001) reduziu o custo de produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, ao alterar o meio sintético otimizado por Kalil (1999) para o meio industrial, e realizar estudos de otimização utilizando a técnica do planejamento experimental e análise de superfície de resposta obtendo atividade de 138 U/mL com o meio composto por melaço 90 g/L, água de maceração de milho 45 g/L e extrato de levedura 4 g/L. Com o meio industrial o custo de produção foi aproximadamente 50 vezes menor quando comparado com o meio sintético.

Kabke (2002) utilizando cepas selecionadas por Makino et al. (2002), realizou os estudos de otimização com as linhagens *K. marxianus* NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NCYC 587 e NRRL Y-7571, e obteve atividades máximas de 91,05; 84,98; 1500 e 2660 U/mL respectivamente.

2.2.2. Caracterização da inulinase

Alguns autores determinaram a temperatura ótima, pH ótimo, os parâmetros cinéticos ($K_m e V_{max}$), massa molecular e estabilidade térmica da inulinase obtida para diferentes microrganismos. A enzima apresentou ser estável em valores de pH baixo e a altas temperaturas, condições muito atrativas para a indústria, pois diminuem o risco de contaminação microbiana.

Gupta et al. (1994) estimaram a massa molecular da inulinase de *Kluyveromyces fragilis* (NCIM 3217) em 250 +/- 10 kDa. A enzima na forma bruta e purificada não liberou sacarose ou oligossacarídeo, indicando ser uma enzima com atividade exo-inulinase. A atividade máxima da inulinase na forma bruta, purificada e imobilizada foi observada a 55°C. Os tempos de meia vida para a forma bruta, imobilizada e purificada foram 34, 26 e 10-12 horas, respectivamente para a temperatura de 50°C e 17, 5 e 3-4 minutos para 60°C.

A inulinase de *K. marxianus* CDBB-L-278 foi estudada por Cruz-Guerrero et al. (1995), apresenta maior afinidade para inulina do que para sacarose. Os perfis de temperatura e pH foram diferentes para os dois substratos. A enzima mostrou-se estável a altas temperaturas com o tempo de meia vida de 180 minutos para temperatura de 50°C.

Kushi et al. (1996) caracterizaram a enzima obtida de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046 e verificaram um valor de 30,1 KDa para a massa molecular e um pH ótimo de 4,6 para hidrólise da sacarose.

Schneider (1996) caracterizou a inulinase produzida por *K. marxianus* ATCC 36907, que apresentou uma atividade ótima sobre a inulina na faixa de temperatura de 50 a 60°C e pH ótimo na faixa de 4,5 a 6,0. Quanto à estabilidade, a enzima extracelular foi estável em temperaturas inferiores a 55°C e na faixa de pH entre 3,0 e 7,0, enquanto a enzima periplasmática mostrou-se mais sensível à influência da temperatura, começando a perder atividade acima de 45°C.

Santos (1998) verificou que a enzima tem um pH ótimo ao redor de 5,0 e temperatura ótima na faixa de 50 a 60°C. A enzima perdeu rapidamente a atividade acima de 60°C, sendo que na faixa de pH entre 4,0 e 8,0 conservou 95% da atividade após 6 horas de incubação.

2.3 Inulina

A inulina é um carboidrato cuja cadeia é composta predominantemente por unidades de frutose (frutano), com uma unidade de glicose terminal, sendo a ligação entre as moléculas de frutose do tipo $\beta(2>1)$, ou seja, uma molécula de sacarose associada a n moléculas de frutose (n = 30-50) como ilustra a Figura 2.1.



Figura 2.1 - Estrutura química da inulina.

A inulina (inulo-oligofrutose) e os frutooligossacarídeos são considerados como alimentos, ingredientes alimentares ou fibras em diferentes países. Eles têm recebido muita atenção, por causa do seu efeito sobre a flora intestinal. A inulina contém em média 30 unidades de frutose, enquanto que os frutooligossacarídeos (também denominados oligofrutose) contêm 2 a 9 unidades de frutose que são ligadas a uma unidade de glicose terminal.

No Brasil estão sendo realizados estudos de produção da inulina a partir da raiz da chicória por pesquisadores da Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP (LEITE,

2001 e NOGUEIRA, 2002). As raízes da chicória foram trituradas e colocadas em água quente para retirar por difusão a inulina. O extrato foi filtrado e levado a um evaporador para se obter um extrato concentrado que passou pelo processo de secagem por atomização e obtendo-se um produto mais fino que o açúcar.

Em países como os Estados Unidos, Canadá e integrantes da União Européia, a inulina é utilizada pelas indústrias alimentícia e farmacêutica como substituto do açúcar e da gordura, com uma vantagem adicional: tem baixíssima caloria.

A inulina pode ser hidrolisada pela inulinase levando a formação frutooligossacarídeos e xarope de frutose..

Zittan (1981) estudou a hidrólise enzimática da inulina para a produção de xarope de frutose. Foram utilizados inulinases de *Kluyveromyces fragilis* e *Aspergillus*, que hidrolisou 93% de inulina (solução 20%) em 72 horas a uma temperatura de reação de 55°C com 6 unidades de enzima por grama de inulina; outro estudo com a inulinase fúngica hidrolisou 99% de inulina em 48 horas a 60 °C com apenas 2 unidades por grama.

Workman & Day (1984) obtiveram 96% de hidrólise da inulina, obtida de tubérculos de dália, com inulinase de *Kluyveromyces fragilis* em 10,5 horas. O extrato de alcachofra de *Jerusalém* com 16,8% de polifrutanos foi completamente hidrolisado em 3,5 horas.

Nakamura et al. (1995) imobilizou a enzima, obtida por *Aspergillus niger* Mutant 817, com derivado de celulose. A enzima imobilizada (8mL) foi empacotada em um reator em coluna de leito fixo, onde a solução de inulina pura, de tubérculos de dália, foi completamente hidrolisada ao ser injetado na coluna com um fluxo de 1mL/min a 40°C, a coluna ficou em operação contínua por 45 dias, a produtividade reator foi de 410 grama de açúcar redutor/L.h. O produto da reação foi uma mistura de 97% de frutose e 3% de glicose.

A frutose pode ser obtida por hidrólise da inulina é mais desejável comparado ao processo convencional no qual a frutose é produzida por amido. Frutose formada por inulinase é uma reação enzimática simples, na qual forma produtos com 95% de frutose. Por outro lado, a produção convencional de frutose precisa de três etapas enzimáticas

incluindo a ação da α -amilase, amiloglucosidase e glicose isomerase, produzindo apenas 45% de solução de frutose no melhor caso, pois o equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose é próximo de 50% de glicose e 50% de frutose (KIM & RHEE, 1989).

As principais vantagens apresentadas pela frutose são as seguintes: é um açúcar obtido de fontes naturais e sem contra indicações, tem poder adoçante aproximadamente 50% maior que o açúcar comum (sacarose), é metabolisado normalmente pelo fígado independente da insulina, apresenta um grau de solubilidade maior que o açúcar comum, ela não apresenta o gosto residual amargo como a maioria dos adoçantes artificiais, realça os sabores e aromas naturais dos alimentos e é absorvido lentamente, portanto não provoca picos de altos e baixos no teor de açúcar no sangue. (ANÔNIMO 5)

2.4 Frutooligossacarídeos e oligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos são os principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, açúcares formados de 1 a 3 moléculas de frutose ligadas a uma molécula de sacarose na posição β -(2 \rightarrow 1) e as estruturas químicas estão apresentadas na figura 2.2. Apresentam propriedades físicas e fisiológicas que os tornam compostos de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São açúcares não digeridos pelo organismo humano, passam através do intestino delgado sem serem absorvidos e vão direto para o intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microflora intestinal (MITSOUKA, 1990).

Os frutooligossacarídeos são obtidos pela atuação de enzimas de origem microbianas como a β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosideo frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26), β -frutosiltransferase (β -D-frutofuranosideo frutosiltransferase, E.C. 2.4.1.9) e inulinase 2,1- β -D-frutanohidrolase (EC 3.2.1.7). Um dos primeiros trabalhos que se tem conhecimento sobre uma enzima que apresentava ação de transferência de frutose (transfrutosilação) de *Aspergillus niger*, foi publicado em 1952 por Pazur.

A β -frutofuranosidase (invertase) é uma enzima que catalisa a transfrutosilação (ação de transferência de frutose) a partir da sacarose, além de possuir uma ação hidrolítica.

A especificidade do aceptor para a transfrutosilação e as estruturas dos produtos transfrutosilados variam dependendo da fonte da enzima (DUAN et al., 1994).



Figura 2.2 Estrutura química dos frutooligossacarídeos sendo G, glicose, F, frutose, n ou m indica o número de frutoses ligadas nas moléculas (ROBERFROID, 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 1mol de glicose e 1mol de kestose são formados simultaneamente a partir de 2 moles de sacarose. Reações similares foram obtidas com outros substratos como kestose (GF₂) e nistose (GF₃) formando nistose e 1-frutosilnistose (JUNG et al., 1989).

As enzimas β -frutofuranosidase possuem tanto ação de transfrutosilação (U_t) quanto à ação hidrolítica (U_h). A habilidade de transferência difere em função da linhagem microbiana. A proporção U_t/U_h indica a eficácia relativa da atividade de transfrutosilação de cada linhagem, onde a ação de transferência é característica de cada linhagem produtora. Para se obter uma produção eficiente de frutooligossacarídeos é importante que o microrganismo apresente uma alta proporção U_t/U_h e alta produtividade enzimática. O *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* são linhagens que apresentaram enzimas eficientes para a produção de frutooligossacarídeos (JUNG et al., 1989, HIRAYAMA et al., 1989, HIDAKA et al. 1988, LEE et al. 1991; PARK & ALMEIDA, 1991).

Hidaka et al. (1987) estudaram a transferência de resíduos de frutosil para sacarose catalisada pela enzima β -frutofuranosidase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 20611. Essa linhagem apresentou alta produtividade enzimática e a sua atividade de transferência foi muito maior que a sua atividade hidrolítica. Verificaram que a concentração de sacarose a 50%, causa um aumento na formação de GF₂ e GF₃, sendo que nessa concentração ocorreu uma rápida conversão de sacarose em frutooligossacarídeos chegando a 60% do total de carboidratos com 24 horas de incubação. Após esse período, ocorreu declínio no consumo de sacarose havendo uma diminuição gradual de GF₂ e um aumento de GF₃ e GF₄ mas, em baixas concentrações de sacarose, houve um aumento dos produtos de hidrólise.

Park & Almeida (1991) isolaram, a partir da cana-de-açúcar, uma linhagem de *Aspergillus niger* produtora de transfrutosidase extracelular. Os autores observaram que a rafinose e a sacarose estimulam a produção de enzima que apresentou um pH ótimo de 5,5, o pH de estabilidade de 6,5 e temperatura ótima de 55°C. A enzima hidrolisou rapidamente a sacarose e, simultaneamente, formou frutooligossacarídeos pela transfrutosilação.

Santos (1998) estudando a síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose com inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, observou que a enzima apresentava tanto atividade hidrolítica, como atividade de transferência sendo que a atividade hidrolítica desta enzima é mais acentuada do que a de transfrutosilação, observada por uma baixa proporção de U_t/U_h. Obteve uma produção máxima de frutooligossacarídeos com 5 horas a um pH 6,0 e temperatura de 50°C.

Vários outros autores estudaram a produção de frutooligossacarídeos como: Hayashi et al. (1991), Jong et al. (1994), Barthomeuf & Pourrat (1995), Yun (1996) e Oliveira (1997).

A hidrolise enzimática da inulina (inulo-oligofrutose) é um outro método utilizado para produção de frutooligossacarídeos. A mistura de frutooligossacarídeos formado por este processo é bastante similar na produção por transfrutosilação. Entretanto, nem todas as unidades frutosil se ligam com glicose no final. Inicialmente a mistura de oligossacarídeos obtida a partir da hidrólise da inulina contém uma cadeia longa de fruto-oligomeros, comumente chamados de inulo-oligossacarídeos. Comercialmente, estes inulooligofrutoses são produzidos pela companhia belga ORAFTI, a partir da inulina extraída de chicória, como o nome comercial Raftilose, como mistura ou puro na forma de pó ou xarope.

A Meiji Seika é o maior produtor de frutooligossacarídeos por transfrutosilação. A tabela 2.1 contem uma lista das companhias produtoras e os respectivos produtos de frutooligossacarídeos obtidos por transfrutosilação. A companhia belga Orafti produz os frutooligossacarídeos pelo controle enzimático da hidrólise da inulina extraída da chicória com formação de oligossacarídeos com 2 a 9 monossacarídeos com tamanho médio de 4 monômeros. Tabela 2.2 lista os produtos da companhia Orafti. (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996).

Companhia	Nome do produto	Descrição do produto
Meiji Seika Kaisha	Meioligo P	Pó, 95% de oligossacarídeo
(Japão)	Meioligo G	Xarope, 75% de solidos (p/v)
		Oligossacarídeos 55% de sólidos
Beghin-Meiji Industries	Actilight P	Pó, 95% de oligossacarídeos
(França)	Actilight G	Xarope, 75% de sólido (p/v)
		Oligossacarídeos 55% de sólidos
Golden Technologies Co. (EUA)	NutraFlora	Pó, 95% de Oligossacarídeos
Cheil Foods and Chemicals	Oligo-sugar (xarope)	Xarope,70% de sólidos (p/v)
(Coréia)	Oligo-sugar (pó)	Oligossacarídeos 60% de sólidos
		Pó, 23% de oligossacarídeos
		(ração animal)

Tabela 2.1- Produtores de frutooligossacarídeos por transfrutosilação e seus respectivos produtos e descrição do produto (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996).

Companhia	produto	Descrição do produto
Orafti	Raftilose L30	Xarope contendo 75% (p/v) de sólidos
Bélgica		Oligossacarídeos > 30% de sólidos
	Raftilose L60	Xarope contendo 75% (p/v) de sólidos
		Oligossacarídeos > 60% de sólidos
	Raftilose L85	Xarope contendo 75% (p/v) de sólidos
		Oligossacarídeos > 85% de sólidos
	Raftilose L95	Xarope contendo 75% (p/v) de sólidos
		Oligossacarídeos > 95% de sólidos
	Raftilose P95	Pó > 95% de Oligossacarídeos

Tabela 2.2- Produtos obtidos pela hidrólise da inulina produzidos por Orafti (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996).

Os oligossacarídeos são utilizados como novos ingredientes funcionais dos alimentos apresentando grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos. Oligossacarídeos de vários tipos são encontrados como componentes naturais de frutas, vegetais, leite e mel. Muitos destes compostos têm propriedades bifidogênicos. Os oligossacarídeos produzidos são malto-, xilo-, gentio-, e soja-oligossacarídeos, lactosacarose, glicosil sacarose, ciclodextrinas e palatinose. A tabela 2.3 é uma lista da produção mundial de oligossacarídeos em 1995 foi estimada em mais de 85.000 toneladas (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996).

Devido as suas características físico-químicas e bioquímicas, os oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para alimentação humana (bebidas, adoçantes, leite em pó infantil) e animal (ração) assim como aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996). Sua utilização como alimentos funcionais é proposta desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias, em função disso são denominados prebióticos.

Tipo de Oligossacarídeos	toneladas	
Galacto-Oligossacarídeos	15.000	
Lactulose	20.000	
Lactosacarose	1.600	
Frutooligossacarídeos	12.000	
Palatinose-Oligossacarídeos	5.000	
Glicosil sacarose	4.000	
Malto-Oligossacarídeo	10.000	
Isomalto-Oligossacarídeo	11.000	
Ciclodextrinas	4.000	
Gentio-Oligossacarídeos	400	
Soja-Oligossacarídeos	2.000	
Xilo-Oligossacarídeo	300	
Total	85.300	

Tabela 2.3- Produção mundial de oligossacarídeos em 1995 (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996).

Normalmente os oligossacarídeos de grau alimentar não são produtos puros, mas misturas contendo oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização, com os polissacarídeos ou dissacarídeos e monômeros de açúcares, podendo ser produzidos quimicamente ou pelo uso de enzimas pela reação de transferência ou pelo controle de degradação enzimática de polissacarídeos de origem vegetal.

Algumas propriedades dos oligossacarídeos são: baixo poder adoçante (0,3 a 0,6 vezes em relação à sacarose), oligossacarídeos de alta massa molecular fornece aumento na viscosidade, levando a melhorias no paladar e textura dos alimentos, altera a temperatura de congelamento, e controla o nível de escurecimento ocasionado pela reação de Maillard em alimentos que são processados a altas temperaturas, retenção da umidade, controlando a secagem excessiva, baixa atividade de água o que favorece o controle microbiológico. Os oligossacarídeos de grau alimentar disponíveis não são utilizados pela microflora bucal para produção de ácidos e poliglucanos, e são utilizados como substitutos do açúcar devido a sua baixa cariogenicidade. Muitos dos oligossacarídeos não são degradados pelas enzimas digestivas humanas, o que os tornam desejáveis como adoçantes, alimentos de baixa caloria podendo ser consumidos por diabéticos (PLAYNE & CRITTENDEN, 1996).

Os oligossacarídeos podem ser obtidos por fontes de origem vegetal, como chicória, alcachofra de Jerusalém, dália, cebola, alho, alho poró e trigo, ou por processos enzimáticos. As características mais importantes destes açúcares alternativos são: não metabolisáveis pelo organismo humano, atuarem como fibras solúveis, utilizáveis pelas bifidobactérias, inibindo a produção de substâncias putrefativas e possuírem poder adoçante reduzido (SCHIWECK et al., 1995).

2.5 Purificação de enzimas de caldo fermentado

Os caldos de fermentação são misturas aquosas complexas de células, produtos extracelulares solúveis, produtos intracelulares, substratos e componentes não convertidos. A separação de um determinado produto depende não apenas da sua localização (extracelular ou intracelular), tamanho, carga, e solubilidade do produto, mas também do processo e o seu valor no mercado. Como exemplo, várias formas de cromatografias são utilizadas para a purificação de produtos de alto valor farmacêutico como os hormônios, anticorpos, e enzimas, mas são caras e difíceis de aumentar a escala. A necessidade de cada separação depende das características iniciais do caldo fermentado (viscosidade, concentração do produto, impurezas e partículas indesejáveis, etc), da concentração final e da morfologia necessária (produto cristalizado, liquido como um resíduo seco do caldo fermentado.

A purificação tem o objetivo não só de aumentar a pureza mas também da afinidade biológica da proteína, eliminando-se as proteínas inativas e elevando o rendimento desta proteína ao máximo. A cromatografia de troca iônica é um dos métodos mais utilizados para purificação de enzimas. Nesse processo a solução contendo o composto desejado passa através de uma coluna de troca iônica, cuja proteína ficará ligada à resina através de forças eletrostáticas. A coluna é então lavada com um tampão de maior força iônica, liberando primeiro as proteínas fracamente ligadas, seguido da liberação das moléculas firmemente ligadas, o que permite separá-las. As frações obtidas por lavagem são então coletadas em pequenas frações sob diferentes condições (BAILEY & OLLIS, 1986).

2.5.1 Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada sendo que solutos com cargas opostas a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subseqüentemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (COLLINS, 1995).

Separação é obtida a partir de diferentes substâncias que têm diferentes níveis de interações com o trocador iônico devido diferenças em suas cargas, densidade de cargas e distribuição de cargas na superfície. Estas interações podem ser controladas por variações nas condições como a força iônica e pH. As diferenças nas propriedades de cargas entre os compostos biológicos são sensíveis para a cromatografia de troca iônica, que é capaz de separar espécies com pequenas diferenças entre si, como duas proteínas diferenciadas por apenas uma carga do aminoácido. A cromatografia de troca iônica pode ser escolhida para adsorver substâncias de interesse e permitir a passagem de contaminantes através da coluna, ou adsorver o contaminante e permitir a passagem de substâncias de interesse. Geralmente o primeiro método é o mais utilizado permitindo um amplo nível de fracionamento e concentração de substâncias de interesse.

A separação na cromatografia de troca iônica depende da adsorção reversível das moléculas carregadas do soluto e dos grupos de troca de íons imobilizados de carga oposta. Na maioria dos experimentos em colunas de troca iônica são realizados em cinco principais estágios. Esses estágios estão ilustrados esquematicamente na figura 2.3.


Figura 2.3 - Princípio de cromatografia de troca iônica (eluição com gradiente salino) (adaptada da Amersham Pharmacia biotech 1).

O primeiro estágio é o equilíbrio na qual o íon de troca está na condição inicial, em termos de pH e força iônica, e que permite a adsorção das moléculas do soluto desejado.

O segundo estágio é a alimentação e adsorção da amostra, no qual as moléculas do soluto carregadas com cargas deslocam os íons e se ligam reversivelmente a matriz. As sustâncias que não estão adsorvidas a matriz podem ser lavadas fora do leito utilizando o tampão de partida.

No terceiro estágio, as substâncias são removidas da coluna por troca nas condições não favoráveis para a ligação das moléculas no soluto. Isto normalmente envolve o aumento da força iônica do tampão de eluição, ou alterar o valor do pH. Na figura 2.3 a dessorção é ativada introduzindo o aumento do gradiente na concentração salina e as moléculas do soluto são removidas da coluna na ordem de suas forças de ligação, sendo que as substâncias ligadas fracamente são eluídas primeiro.

Um quarto e um quinto estágio são necessários para remoção de substâncias não eluídas sob as condições experimentais prévias e o re-equilíbrio na condição inicial para a próxima purificação.

2.5.2 Tipos de trocadores iônicos

É possível ter trocador com cargas positivas e negativas (figura 2.4). O trocador de carga positiva adsorve íons de carga negativa (aniônica), e o trocador de carga negativa adsorve íons de carga positiva (catiônica).



Figura 2.4- Tipos de trocador iônico (adaptada daAmersham Pharmacia biotech 1).

A matriz pode ser um composto inorgânico, resina sintética ou polissacarídeos. As características da matriz determinam as propriedades cromatográficas como a eficiência na recuperação assim como a estabilidade química, resistência mecânica, e propriedades de fluxo. A natureza da matriz também afeta o comportamento da substância biológica e a manutenção da atividade biológica.

A presença de grupos com carga é uma propriedade fundamental de um trocador de íons. O tipo de grupo determina o tipo e força do trocador iônico. Existem vários grupos que podem ser escolhidos para serem utilizados como trocador iônico; alguns estão listados na Tabela 2.4.

As condições experimentais que afetam a capacidade de purificação em cromatografia de troca iônica são: pH, força iônica do tampão, a natureza do íon-oposto, a taxa de fluxo e a temperatura (Amersham Pharmacia biotech 1).

Trocador aniônico	Grupo funcional
Dietilaminoetil (DEAE)	-O-CH 2 -CH 2 -N + H(CH 2 CH 3) 2
Amioetil quaternária (QAE)	-O-CH 2 -CH 2 -N + (C 2 H 5) 2 -CH 2 -CHOH-CH 3
Amônio quaternário (Q)	-O-CH 2 -CHOH-CH 2 -O-CH 2 -CHOH-CH 2 -N + (CH 3) 3
Trocador catiônico	Grupo funcional
Carboximetil (CM)	-O-CH 2-COO
Sulfopropil (SP)	-O-CH 2 -CHOH-CH 2 -O-CH 2 -CH 2 -CH 2 SO 3
Metil sulfonato (S)	-O-CH 2 -CHOH-CH 2 -O-CH 2 -CHOH-CH 2 SO 3

Tabela 2.4- Grupos funcionais usados como trocadores de íons.

2.6 Adsorção em coluna de leito expandido

Como citado anteriormente, o esquema de purificação contém múltiplas operações unitárias, incluindo um número de passos cromatográficos para garantir uma remoção eficiente de impurezas e contaminantes. O tipo e a finalidade de uso do produto determinam a extensão da purificação necessária. Quanto maior o número de etapas de recuperação, maior será o custo do produto final, com diminuição no rendimento e produtividade, tornando-o muitas vezes economicamente inviável. Assim, cuidados na seleção e combinação de operações unitárias suficientes durante a fase do planejamento podem reduzir o número de passos necessários para tornar o processo mais econômico.

Tradicionalmente a purificação inicial é realizada por cromatografia de adsorção em leito empacotado convencional, necessitando de clarificação do caldo bruto antes da aplicação na coluna cromatográfica.

As técnicas mais utilizadas para clarificação têm sido centrifugação e microfiltração. A eficiência da centrifugação depende do tamanho da partícula, diferença de densidade entre as partículas e o sobrenadante e da viscosidade da fase líquida. A capacidade de separação durante a centrifugação é reduzida com presença de partículas pequenas, sendo necessária uma combinação com microfiltração para obter sobrenadante livre de partículas. Porém, existem desvantagens no uso da microfiltração, como redução drástica do fluxo de líquido pela unidade de área da membrana durante a filtração pelo

entupimento da membrana de microfiltração. O uso combinado da centrifugação e filtração freqüentemente resulta em processos longos ou de uso de grandes unidades levando ao aumento de custo fixo e operacional, resultando também na perda significativa do produto por degradação. Por isso a adsorção direta em leito expandido do caldo bruto oferece uma redução significativa no tempo e custo comparado com o processo tradicional.

As diferenças do processo tradicional e do leito expandido podem ser observadas no esquema da Figura 2.5.

Em geral, as proteínas de interesse estão presentes em fluídos naturais como plasma sanguíneo, fluídos de cultura de células de mamífero, de cultura de microorganismos, extratos de tecidos ou de células de microorganismos rompidas. Recentemente, avanços têm sido alcançados no sentido de simplificar o processo de recuperação. Um deles é diminuir o número de etapas iniciais de clarificação das amostras para posterior adsorção em resinas cromatográficas.



Figura 2.5 Comparação do processo tradicional de purificação com o processo utilizando o leito expandido.

As etapas do processo de recuperação (clarificação, concentração e purificação inicial) podem ser combinadas em uma única operação permitindo aumentar a economia do

processo pela redução de etapas, aumentando rendimento e diminuindo o tempo do processo e o custo de mão-de-obra.

Draeger & Chase (1990) foram capazes de criar um leito fluidizado estável, com características cromatográficas similares ao do leito fixo, usando adsorvente (resina) cromatográfico convencional baseado em agarose. A aplicação da mistura de proteína e células neste leito expandido mostrou um potencial da técnica de recuperação de proteínas diretamente do caldo contendo partículas. A capacidade de ruptura no leito expandido com fator de dois, foi muito similar à do leito fixo. Foi aplicado um fluxo baixo para evitar uma expansão muito elevada, resultando em produtividade muito baixa. Através dos experimentos de Draeger & Chase (1990), verificou-se que há necessidade de partículas com uma alta velocidade de sedimentação para explorar completamente os aspectos tecnológicos do leito expandido.

Em 1993, a Pharmacia Biotech introduziu novos tipos de resinas cromatográficos e colunas chamadas Streamline, produtos especialmente projetados para a adsorção em leito expandido. Resina e coluna Streamline permitem a formação de leito fluidizado estável e operação a alta velocidade. Inicialmente foram desenvolvidos dois trocadores de íons o Streamline DEAE e Streamline SP, ambos com base da matriz em agarose com inclusão de quartzo cristalino inerte no núcleo para obter uma densidade adequada. Nas Tabelas 2.5 e 2.6 podem ser observados as características das resinas Streamline DEAE e Streamline SP respectivamente (Amersham Pharmacia Biotech 2).

Produto	Descrição
Tipo de troca	fracamente aniônica
Grupo funcional	$-O-CH_2CH_2-N^+(C_2H_5)_2H$
Capacidade iônica	0,13 -0,21 mmol Cl ⁻ /ml de adsorvente
Porosidade	4 x 10 ⁶ daltons (proteínas globulares)
Matriz	macroporosa, ligação cruzada agarose,
	6%, contendo quartzo cristalino central.
Forma da partícula	esférica, 100-300 μm
Tamanho médio da partícula	200 μm
Densidade média da partícula	aproximadamente 1,2 g/mL
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3
PH de estabilidade	
Faixa de trabalho	2-13
Faixa de limpeza	2-14
Estabilidade química	Todos tampões aquosos normalmente
	utilizados
	-NaOH 1 M
	-etanol 70%
	-solventes orgânicos
	Evitar
	-agentes oxidantes
Estabilidade física	a geração de finos em operação normal
	do leito expandido é negligenciável.
	Evitar operações cisalhantes de
	drenagem, escoamento.
Capacidade de adsorção**	no mínimo 40 mg BSA/mL adsorvente*
Estocagem	etanol 20%

Tabela 2.5 Características da resina Streamline DEAE.

*BSA-Albumina bovina

**capacidade de ruptura; 15 cm de altura de leito sedimentado, 300 cm/h, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Fonte: Pharmacia Biotech

Produto	Descrição		
Tipo de troca	fortemente catiônica		
Grupo funcional	-O-CH ₂ CHOHCH ₂ O-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃₋		
Capacidade iônica	0,17 -0,24 mmol H ⁺ /ml de adsorvente		
Porosidade	4 x 10 ⁶ daltons (proteínas globulares)		
Matriz	macroporosa, ligação cruzada agarose,		
	6%, contendo quartzo cristalino central.		
Forma da partícula	esférica, 100-300 μm		
Tamanho médio da partícula	200 µm		
Densidade média da partícula	aproximadamente 1,2 g/mL		
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3		
PH de estabilidade			
Faixa de trabalho	3-13		
Faixa de limpeza	3-14		
Estabilidade química	Todos tampões aquosos normalmente		
	utilizados		
	-NaOH 1 M		
	-etanol 70%		
	-solventes orgânicos		
	Evitar		
	-agentes oxidantes		
	-exposição longa (1 semana, 20°C) a		
	pH<4		
Estabilidade física	a geração de finos em operação normal		
	do leito expandido é negligenciável.		
	Evitar operações cisalhantes de		
	drenagem, escoamento.		
Capacidade de adsorção*	no mínimo 60 mg lisozima/mL		
	adsorvente		
Estocagem	acetato de sódio 0,2 M em etanol 20%		

Tabela 2.6 Características da resina Streamline SP.

*capacidade de ruptura; 15 cm de altura de leito sedimentado, 300 cm/h , 50 mM fosfato de sódio, pH 7,5.

Fonte: Pharmacia Biotech

Conforme Thömmes (1997), as interações proteína-ligante devem ser independentes do espaço intersticial do leito adsorvente. Assim, a capacidade de equilíbrio de um adsorvente não será influenciada pela configuração experimental, como tanque agitado ou aplicação frontal para leito fixo ou fluidizado. A maior diferença provém do meio do qual a proteína é isolada. Os parâmetros operacionais que influenciam o equilíbrio de adsorção no leito fluidizado são a concentração de proteína, a condutividade, o pH e a presença de partículas, como as células.

Pessoa et al. (1996) estudaram a purificação de inulinase, obtida pela fermentação de *Cândida kefyr*, em leito expandido. A faixa de pH entre 6,5 e 7,0, foi favorável para a adsorção da enzima usando uma resina fracamente aniônica (Streamline DEAE). Para a resina fortemente catiônica (Streamline SP), o pH apropriado foi 4,0. Obtiveram uma recuperação de 93% e um fator de purificação de 5,8. A capacidade dinâmica foi 62% do valor da máxima capacidade de adsorção.

Kalil et al. (2004) estudaram a purificação da inulinase diretamente do caldo bruto obtido por *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045, em leito expandido utilizando a resina Streamline SP e obteve uma recuperação de 74% e um fator de purificação de 10,4 vezes; resultados obtidos operando-se com fator de expansão de 2,0, alimentação a pH 3,5, lavagem a pH 4,1 e para a eluição tipo degrau, com velocidade de 100 cm/h e pH de 4,1.

A maioria dos trabalhos realizados sobre adsorção em leito expandido, são estudos específicos de parâmetros operacionais, modelagem e simulação, como por exemplo os trabalhos realizados por Thelen & Ramirez (1997), Owen & Chase (1999), Fernández-Lahore et al. (2000), Palsson et al. (2001), Tong et al. (2003), Yun et al. (2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento dos estudos de produção e purificação de inulinase. Para melhor visualização, o trabalho foi subdividido em seis etapas, cuja seqüência está representada no fluxograma da figura 3.1.

3.1 Seleção do microrganismo

Foi realizada uma pré-seleção dos microrganismos através de fermentações em meios com diferentes valores de pH, e após selecionar as linhagens com melhores produções de enzima, estas foram fermentadas em meio industrial (meio composto por melaço e água de maceração de milho) e dois microrganismos *K. marxianus* NCYC 587 e *K. marxianus* NRRL Y-7571 se destacaram como boas produtoras da enzima, apresentando uma produção muito superior quando comparado com fermentações em meio sintético (composto por sacarose, peptona e extrato de levedura). Posteriormente foram realizados estudos de otimização do meio de produção com os dois microrganismos selecionados.

3.1.1 Microrganismos

Foram utilizadas 10 linhagens de *Kluyveromyces* para a seleção do melhor produtor de inulinase, sendo *K. lactis* CBS 2103 da coleção do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB-FEA-UNICAMP), *K. marxianus* NCYC 587, *K. drosophilarum* NCYC 575 e *K. lodderi* gentilmente cedidos pela professora Hélia Sato do Laboratório de Bioquímica (FEA-UNICAMP), *K. marxianus* NRRL Y-610, *K. marxianus* NRRL Y-1196, *K. marxianus* NRRL Y-1550, *K. marxianus* NRRL Y-610, *K. lactis* NRRL Y-8279 e *K. lodderi* NRRL Y-8280, foram doados pela Northen Regional Research Laboratory (NRRL) dos Estados Unidos.



AMM= água de maceração de milho; EL=extrato de levedura; M=concentração molar do tampão e FE= fator de expansão

Figura 3.1 Fluxograma das etapas realizadas.

3.1.2. Preparo do inóculo

Os microrganismos do gênero *Kluyveromyces* foram mantidos em agar inclinado de extrato de levedura e malte (YM), e repicados para tubo de ensaio contendo 10 mL de meio YM líquido. Os meios foram incubados por 24 horas a 30°C, onde cada tubo de ensaio foi utilizado como pré-inóculo, e adicionado a 100 mL de meio para obtenção do inóculo. A composição final está descrita na Tabela 3.1.

Componente	Quantidade (g/L)
Sacarose	20
Extrato de levedura	5
K ₂ HPO ₄	5
NH ₄ Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65

Tabela 3.1: Composição do meio de inóculo

O meio de inóculo foi ajustado para pH 6,8. Alíquotas de 100mL foram adicionadas em frascos Erlenmeyers aletados de 500 mL, e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Foram então adicionados a cada frasco 10 mL de pré-inóculo, e incubados por 24 horas a 30°C e 150 rpm em shaker Psycrotherm (New Brunswick Scientific, N.J. EUA).

3.1.3 Fermentação

As fermentações para a pré-seleção foram realizadas em meio sintético composto por: sacarose 14 g/L, peptona 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L e K₂HPO₄ 1g/L (KALIL, 1999) em diferentes valores de pH (3,5; 6,0 e 6,5).

As linhagens NCYC 587, NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NRRL Y-7571, NRRL Y-8279 e NRRL Y-8280 apresentaram maiores atividades de inulinase foram selecionadas através da fermentação em meio industrial composto por: melaço 90 g/L, água de maceração de milho 45 g/L e extrato de levedura 4 g/L (TREICHEL, 2001). A produção da enzima foi acompanhada em 24, 48 e 72 horas de fermentação. As linhagens NCYC 587 e NRRL Y-7571 apresentaram as melhores atividades de inulinase e foram utilizadas nos estudos de otimização. As fermentações foram realizadas em frasco Erlenmeyers aletados, incubadas a 30°C e agitados a 150 rpm em shaker.

3.2 Estudo da otimização do meio de fermentação em frascos agitados

A metodologia para o estudo da otimização do meio de produção foi realizada com o planejamento experimental e análise de superfície de resposta; metodologia utilizada com sucesso em outros trabalhos realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (FEA-UNICAMP), como os trabalhos de Costa (2000), Kalil (2000), TreicheL (2001), Kabke (2002) e Burket (2003).

A análise dos dados dos planejamentos fatoriais, foram realizadas utilizando o programa STATISTICA versão 5.0.

3.2.1 Otimização do meio de cultivo para a fermentação da linhagem *K. marxianus* NCYC 587 e produção de inulinase.

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental fracionário 2⁵⁻¹ para o microrganismo *K. marxianus* NCYC 587 (Tabela 3.2), tendo como variáveis as concentrações do melaço, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), temperatura (T) e pH, sendo definidas as variáveis significativas. A Tabela 3.3 apresenta as faixas de valores estudados para cada variável no planejamento experimental fracionário.

Ensaios	Melaço	AMM	EL	Т	pН
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Tabela 3.2 - Valores utilizados no planejamento fracionário 2^{5-1} para a otimização do meio de cultivo da linhagem *K. marxianus* NCYC 587.

Melaço= melaço de cana-de-açúcar, AMM= água de maceração de milho, EL= extrato de levedura, T= temperatura

Tabela 3.3 - Valores utilizados no planejamento fracionário 2^{5-1} para a otimização do meio de cultivo da linhagem *K. marxianus* NCYC 587.

Variáveis	Níveis			
	-1	0	+1	
Melaço (g/L)	60	85	110	
AMM (g/L)	36	48	60	
EL (g/L)	2	3,5	5,0	
T (°C)	24	27	30	
рН	3,0	3,5	4,0	

Em seguida foi realizado um planejamento completo com as variáveis melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura para determinar as condições otimizadas para a produção da enzima pelo microrganismo selecionado (Tabelas 3.4 e 3.5).

Ensaios	Melaço	AMM	EL
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Tabela 3.4 – Planejamento fatorial completo para a otimização do meio de cultivo da linhagem *K. marxianus* NCYC 587.

Tabela 3.5 - Valores reais para os valores codificados na tabela 3.4.

	níveis				
variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço (g/L)	56,4	70,0	90,0	110,0	123,6
AMM (g/L)	19,8	30,0	45,0	60,0	70,2
EL(g/L)	3,32	3,0	4,0	5,0	5,68

3.2.2 Otimização do meio de cultivo para a fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 e produção de inulinase.

Para otimizar o meio de cultivo *K. marxianus* NRRL Y-7571 e produção de inulinase, foi realizado um planejamento experimental fracionário 2⁴⁻¹, tendo como variáveis as concentrações do melaço, da água de maceração de milho (AMM), do extrato de levedura (EL) e pH, sendo definidas as variáveis significativas(Tabela 3.6). As faixas de valores das variáveis estão apresentadas na Tabela 3.7.

Ensaios	Melaço	AMM	EL	pН
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

Tabela 3.6 - Valores codificados para o planejamento fracionário 2^{4-1} para a otimização do meio de cultivo da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Tabela 3.7- Valores utilizados no planejamento fracionário 2⁴⁻¹ para a otimização do meio de cultivo da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Níveis	-1	0	+1
Melaço (g/L)	70	90	110
AMM (g/L)	30	45	60
EL (g/L)	3	4	5
рН	3,5	4,5	5,5

Em seguida foi realizado planejamento completo (Tabela 3.8) com as variáveis extrato de levedura e pH para determinar as condições ótimas de produção de inulinase pelo *K. marxianus* NRRL Y-7571. A faixa dos valores do planejamento completo está listada na Tabela 3.9.

Ensaios	Extrato de	pН
	Levedura	
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0

Tabela 3.8 - Valores codificados para o planejamento fatorial completo para a otimização do meio de cultivo da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Tabela 3.9 – Valores reais para os valores codificados da tabela 3.8.

	níveis				
variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de	2,6	3,0	4,0	5,0	5,4
levedura (g/L)					
pH	4,5	4,8	5,5	6,2	6,5

3.2.3 Comprovação do estudo de otimização

Foram realizadas fermentações em frascos agitados (150 rpm) e em fermentador de bancada Bioflo III (New Brunswick Scientific- Edison N.J. EUA), volume útil de 5 litros, a agitação de 300 rpm e aeração de 1vvm foram baseadas no trabalho realizado por Silva-Santisteban (2001). Através do acompanhamento cinético da produção de enzima, comprovou-se os resultados obtidos nos estudos de otimização do meio de cultivo realizados para o microrganismo *K. marxianus* NRRL Y-7571. Nos testes de validação foram analisadas as atuações da enzima tanto sobre a sacarose, como sobre a inulina.

3.3 Caracterização parcial da inulinase

No estudo da caracterização da inulinase a atividade de hidrólise da enzima foi medida utilizando a sacarose como substrato, por questões de custo devido ao grande número de ensaios necessários nesta etapa do trabalho, exceto na determinação de temperatura e pH ótimos, os quais foram determinados usando-se o substrato inulina para verificar sua atuação como invertase ou inulinase. Determinou-se a faixa de pH de estabilidade da inulinase, determinação dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten ($K_m e V_{max}$) para o substrato sacarose, e realizada a comparação dos efeitos da temperatura na enzima bruta, enzima purificada, enzima bruta imobilizada e enzima purificada.

3.3.1 Determinação da temperatura e pH ótimo de atividade da inulinase.

Na determinação dos valores ótimos de pH e temperatura (T) de atividade sobre a sacarose e inulina, foi realizado um planejamento experimental mais 2 pontos axiais para cada fator e 1 ponto central com 3 repetições totalizando 11 ensaios (Tabela 3.10). A faixa estudada teve como base resultados de literatura e estão relacionados na Tabela 3.11.

Ensaios	pН	Τ
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 3.10 : Planejamento experimental para determinação de temperatura (T) e pH ótimo de atividade da inulinase.

	Níveis				
variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
рН	4,5	4,64	5	5,36	5,5
T (°C)	40	44	55	66	70

Tabela 3.11 – Valores utilizados no planejamento fatorial completo para determinação da temperatura (T) e pH ótimo de atividade da inulinase.

3.3.2 Estudo do pH de estabilidade da enzima

A enzima foi incubada por 2 horas, a 50°C, nos seguintes valores de pH 3,6; 4,0; 4,5 e 5,0 em tampão acetato 0,1M e em pH 5,5; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5 em tampão fosfato 0,1M e determinada a sua atividade enzimática.

3.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{máx} da inulinase.

O modelo cinético de Michaelis e Menten (equação 3.1) é ainda um dos mais aceitos para explicar a influência da concentração do substrato na cinética de uma reação enzimática. A velocidade da reação é uma função crescente da concentração do substrato até um determinado valor dessa concentração, mantendo-se praticamente constante para valores superiores a esse.

$$V = V_{máx}(S_1/(K_m + S))$$
(Equação 3.1)

Onde V=velocidade da reação; V_{max} = velocidade máxima da reação; S_1 = substrato e K_m = constante de Michaelis e Menten.

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foram determinados medindo-se a atividade enzimática em diferentes concentrações de sacarose.

3.3.4 Estudo da estabilidade térmica da inulinase

A taxa de desativação da enzima é muito dependente da temperatura, e esta dependência é geralmente descrita utilizando a equação de Arrhenius conforme a Equação 3.2.

$$kd = A * e^{-Ed/_{RT}}$$
 (Equação 3.2)

Sendo que: kd=constante de desativação da enzima; A=constante de proporcionalidade; Ed = energia de desativação enzimática (cal/gmol); R = constante dos gases ideais (1,98cal/gmol K) e 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: $C/C_0 = 0.5$.

O tempo de meia vida $(t_{1/2})$ pode ser calculado relacionando a constante de desativação kd, através da Equação 3.3:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{kd}$$
 (Equação 3.3)

As soluções enzimáticas, diluídas em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,6, foram incubadas em diferentes temperaturas, tendo-se coletado amostras em intervalos de tempo determinados, para as medidas de atividade.

Com os dados de atividade em função do tempo de incubação para cada temperatura, plotou-se ln (C/C_o) x tempo (horas), sendo C_o a atividade inicial e C a atividade referente aos tempos de retirada da amostra. Desse gráfico, obteve o valor de kd (constante de desativação da enzima) para cada temperatura. Posteriormente, para a determinação da energia de desativação da enzima Ed, plotou-se ln kd vs 1/T(K), obtendo uma reta correspondente à Equação 3.4.

$$\ln kd = \ln A - \frac{Ed}{RT}$$
 (Equação 3.4)

3.3.4 Imobilização da inulinase com alginato de sódio

O método de imobilização realizada neste estudo foi o mesmo utilizado por Santos (2002) para imobilizar a inulinase obtida por *K. marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045.

A enzima foi imobilizada com 3,5% de alginato de cálcio.

3.4 Adsorção da inulinase pela resina Streamline DEAE

Para realizar o estudo da purificação em colunas, foi necessário conhecer a capacidade de adsorção da inulinase pela resina Streamline DEAE da Pharmacia. Foram

realizados testes para definir o tipo de tampão (o pH e a concentração do tampão), o tempo de equilíbrio, a capacidade máxima de adsorção pela resina (Q_m) e a constante de dissociação (Kd) pela construção de isotermas.

3.4.1 Teste de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE em diferentes valores de pH

Foram preparadas soluções de tampão fosfato 0,05 M em diferentes valores de pH na faixa de 5,2 a 8,0; para o tampão tris-HCl 0,05 M na faixa de 6,0 a 8,0. A diferença entre a atividade inicial (Co) e atividade final na solução, é a quantidade da enzima adsorvida na resina (C). Testou-se o tampão fosfato neste estudo, pois Santos (1998), utilizando a resina Q-Sepharose, obteve melhores resultados na purificação da inulinase em uma coluna de leito fixo utilizando tampão fosfato, em relação aos outros. O tampão tris-HCl foi favorável para a adsorção da inulinase pela resina Streamline DEAE (PESSOA et al. 1996).

Em cada frasco foram adicionados 9 mL de tampão, 1 mL resina Streamline DEAE e 1mL de solução enzimática, sendo o frasco agitado durante 10 minutos antes da determinação da atividade final.

3.4.2 Determinação do tempo de equilíbrio na adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE

Em um reator encamisado mantido a 25°C foi adicionado 45 mL de solução de inulinase diluída em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e 5 mL de suspensão de resina Streamline DEAE em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 na proporção 1:3 (v:v). Foram realizados 2 ensaios utilizando-se caldos com atividade inicial de 111 U/mL e 50 U/mL. As amostras foram retiradas em intervalos pré determinados ao longo do tempo de aproximadamente 2 horas, verificando-se a atividade final sobre a inicial (C/Co) em função do tempo. O mesmo procedimento foi utilizado para o tampão tris-HCl 0,05M e pH 7,5, e foram realizados 3 ensaios utilizando-se caldos com atividade inicial de 45, 108 e 200 U/mL.

3.4.3 Isotermas de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de enzima diluídas em tampão fosfato e tris-HCl sendo determinadas as atividades iniciais de cada solução.

Em diferentes frascos distribuiu-se 1 mL da solução tampão–resina na proporção de 1:3 e 9 mL da solução enzimática. Os frascos foram selados e mantidos sob agitação a 25°C até atingir o tempo necessário para o equilíbrio.

Após o equilíbrio foi medida a absorbância e atividade da fase solúvel para cada tubo. A quantidade de enzima adsorvida foi encontrada através do balanço de massa.

Com os valores de da atividade enzimática no equilíbrio, tanto para fase solúvel como para a fase sólida, pôde-se determinar a isoterma que melhor descreveu o processo e conseqüentemente suas constantes.

Considerando-se uma isoterma do tipo Langmuir (Equação 3.5):

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{Kd + C^*}$$
(Equação 3.5)

Onde C é a atividade da enzima adsorvida em solução; Q é a atividade da enzima na fase sólida; Q_m é a capacidade máxima de adsorção e Kd é a constante de dissociação (k_2/k_1), os valores de k1 e k2 foram calculados pelo método numérico Hooke-Jeeves e quasi-Newton utilizando o programa STATISTICA versão 5.5. O símbolo (*) representa o valor das variáveis no equilíbrio.

Linearizando a equação acima, obtém-se:

$$\frac{1}{Q^*} = \frac{1}{Q_m} + \left(\frac{Kd}{Q_m}\right) \left(\frac{1}{C^*}\right)$$
(Equação 3.6)

Com os dados experimentais obtidos de $C^* e Q^*$, traça-se a curva $(1/Q^*)$ versus $1/C^*$, sendo obtidos os valores dos coeficientes angular e linear, onde: o coeficiente angular fornece o valor de Kd/Q_m, e o coeficiente linear representa $(1/Q_m)$, a partir dos quais determina-se Q_m e a constante de dissociação Kd.

3.5 Purificação da inulinase através de cromatografia de troca iônica

Foram realizadas testes preliminares em leito fixo utilizando uma coluna modelo XL 16 da Pharmacia onde foi utilizado 20ml de resina Streamline DEAE. Nas purificações de leito fixo foi possível definir o tampão mais eficiente para a separação da inulinase e determinar a concentração de NaCl em que ocorre a eluição da enzima.

As purificações em leito expandido foram realizadas em coluna Streamline 25 da Pharmacia, com 50 mL de resina Streamline DEAE. Foram realizadas testes preliminares para fixar algumas condições iniciais para a purificação em leito expandido. Foram também realizados experimentos para a otimização de processo, nas etapas de adsorção e eluição, que foi o principal objetivo do presente trabalho de pesquisa.

3.5.1 Purificação da inulinase em leito fixo

A coluna utilizada foi o modelo XK 16 da Pharmacia (Suécia) com 20 mL de resina, acoplado ao sistema FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") também da Pharmacia.

A coluna de leito fixo foi equilibrada com os tampões em estudo (fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0 e tris-HCl 0,05 M pH 7,5) antes da passagem do caldo, e o pH do caldo foi ajustado para o pH de equilíbrio da coluna. O caldo utilizado foi o meio de fermentação centrifugado.

A recuperação da enzima foi realizada com gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl. A eluição das proteínas foi acompanhada pela medida de absorbância das frações a 280 nm. As atividades enzimáticas foram determinadas nas frações que apresentaram proteínas.

3.5.2 Testes de purificação da inulinase em leito expandido

Os testes preliminares foram realizados utilizando a coluna Streamline 25 da Pharmacia (Suécia), nas condições de pH e eluição pré-estabelecidas no leito fixo. Os testes foram realizados segundo os princípios descritos no Anexo A.

Nos primeiros experimentos em leito expandido, as condições de operação (vazão e fator de expansão) se basearam nos valores estabelecidos por Kalil (2000) para a resina catiônica Streamline SP, alterando-se somente o tipo de tampão e pH, para com isso

estabelecer quais as condições mais apropriadas para estudar a purificação com a resina aniônica Streamline DEAE.

3.5.3 Preparo da Coluna Streamline 25

Os procedimentos para a montagem e uso da coluna utilizados neste trabalho foram estabelecidos por Kalil (2000).

-A resina foi lavada em filtro a vácuo com água para retirar a solução de etanol 20% (solução em que a resina é estocada).

- Adicionou-se água na coluna até aproximadamente 5 cm de altura, e em seguida,

50 mL de resina previamente medida.

- Esperou-se a sedimentação da resina.

-O êmbolo foi colocado 10 cm acima da altura de expansão da resina.

- Passou-se solução tampão de estudo nas mangueiras para a retirada de ar.

- A mangueira foi conectada a coluna e a bomba foi ligada a uma vazão de 8,2 mL/min.

- O pH do meio fermentado foi ajustado para o pH do tampão em estudo, com NaOH.

 - A coluna foi lavada com a solução tampão em estudo por 20 minutos na vazão de 8,2 mL/min.

- Iniciou-se a alimentação.

- Terminada a alimentação, iniciou-se a etapa de lavagem da coluna passando-se solução tampão até obter uma solução translúcida. As amostras da lavagem foram coletadas periodicamente para determinação da absorbância a 280 nm.

- Com medida de absorbância nula, a bomba foi desligada.

 Aguardou-se a sedimentação da resina e o êmbolo transferido para a marca de 10,5 cm.

- O fluxo foi invertido e iniciou-se a eluição com a passagem de uma solução salina, com uma vazão de 4,2 mL/min. As amostras eluídas foram recolhidas para posterior análise da atividade de inulinase sobre o substrato sacarose ou inulina.

3.5.4 Procedimento para regeneração da resina Streamline

Após cada purificação, foi realizada a regeneração da resina conforme o procedimento citado por Kalil (2000).

- O êmbolo foi posicionado em altura aproximadamente três vezes a da resina.

- Durante 4 horas a coluna foi lavada com solução de NaOH 0,5 M com NaCl 1 M na vazão de 2,5 mL/min.

- Em seguida, a coluna foi lavada com aproximadamente 225 mL de água destilada na vazão de 8 mL/min.

- Isopropanol 30% foi injetado com uma vazão de 8 mL/min., em quantidade três vezes superior ao volume do sedimentado. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se ácido acético 25%.

- O pH da suspensão de resina foi ajustado lavando-se a coluna com a solução tampão de equilíbrio.

3.5.5 Sistema para a eluição da inulinase com gradiente salino linear e crescente

Para eluir a inulinase com gradiente linear crescente de sal, foi montado um sistema conforme mostrado na Figura 3.2. A solução tampão com NaCl (C1) é bombeada continuamente para outro frasco, contendo inicialmente tampão puro (C2). Este segundo frasco era mantido sob agitação e dele era retirada a solução para a coluna. A vazão do primeiro frasco (F1) era mantida sempre a metade da vazão do segundo frasco (F2). A partir do balanço de massa do sistema é possível determinar a concentração salina que está sendo aplicada no leito expandido. O primeiro frasco é mantido em banho termostatizado e o segundo frasco consiste de um reator encamisado de modo a se controlar a temperatura no valor desejado.



1 – Frasco com solução tampão com NaCl
 2 – Frasco com solução tampão de concentração salina variável
 Figura 3.2 – Sistema montado para eluição da inulinase com gradiente salino.
 (KALIL,2000)

Através de um balanço de massa no reator 2, obtém-se a concentração de NaCl (C_2) na solução que chega a coluna, utilizando a Equação 3.7.

$$d(V_2C_2) / dt = F_1C_1 - F_2C_2$$

F1 = F2 / 2
$$C_2 = C_1 / 2 * (1 - (V_1 / (V_1 - F_1 * t)))^{-2}$$
 (Equação 3.7)

Este procedimento foi utilizado nos primeiros ensaios realizados na coluna de leito expandido. Após alguns testes, a coluna foi acoplada ao sistema FPLC, onde o gradiente salino foi realizado automaticamente, simplificando a etapa de eluição.

3.6 Estudo de otimização da purificação da inulinase produzida pelo microrganismo *K. marxianus* NRRL Y-7571 em leito expandido

No estudo da otimização da etapa de purificação da inulinase não foi possível realizar os ensaios com o meio industrial otimizado.

Ao realizar os primeiros ensaios na coluna de leito expandido verificou-se a inviabilidade do uso deste meio devido às aglomerações formadas, entupimento e colapso do sistema.

Verificou-se assim a necessidade de um estudo de pré-tratamento tanto do melaço como da água de maceração de milho, para preparo do meio de cultivo. Este trabalho foi parte de tema de tese de outro aluno de doutorado. Assim, para realizar a otimização da purificação da enzima em leito expandido, utilizou-se o caldo bruto de um meio sintético (KALIL, 2000 e SANTOS, 2002) que produzia atividade enzimática na mesma ordem de grandeza do meio industrial obtido neste trabalho. A composição do meio de cultivo utilizada foi: sacarose 30 g/L, extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, obtendo-se cerca de 600 U/mL de atividade enzimática.

Os estudos de otimização da purificação foram realizados alimentando-se a coluna de leito expandido com caldo bruto obtido pela fermentação em meio sintético e divididos em duas etapas:

1- Etapa de adsorção: foram analisadas as variáveis que podem influenciar na adsorção da enzima durante a alimentação da coluna. O esquema de trabalho pode ser visualizado na Figura 3.3, onde o meio de alimentação foi mantido em um reator encamisado para manter a temperatura em 15°C; a coluna foi alimentada com uma bomba peristáltica sendo coletadas alíquotas de 100 mL.



Figura 3.3 - Alimentação da coluna com o caldo bruto obtido pela fermentação em meio sintético.

2- Etapa de dessorção: a coluna foi alimentada e lavada como foi definido no item anterior, sendo a coluna acoplada ao equipamento de FPLC (figura 3.4), onde foi possível

programar o gradiente salino com diferentes volumes e realizar a coleta automática das frações (figura 3.5).

A alimentação automática da coluna não foi realizada através do sistema do FPLC, por recomendação dos técnicos da Pharmacia, devido à presença de células e impurezas no caldo da fermentação que poderiam causar entupimentos nas conexões delicadas do sistema, assim como no leitor de UV. Esse sistema facilitou a operação da coluna, e assim foi possível realizar vários ensaios para a otimização de processo.



Figura 3.4- Sistema de FPLC idêntico ao utilizado.(ANÔNIMO 6)



Figura 3.5 - Coluna de leito expandido acoplado ao equipamento de FPLC.

3.6.1 Otimização da etapa de adsorção da inulinase

As condições de cada ensaio foram definidas com o planejamento experimental completo de 1^ª ordem mais 1 ponto central com 4 repetições (Tabela 3.12), sendo estudado a influência de pH, molaridade do tampão e o fator de expansão. Os valores reais estudados nos ensaios realizados estão apresentados na Tabela 3.13. Para cada ensaio foi realizada uma fermentação para obter o caldo utilizado na alimentação da coluna.

Ensaios	рН	Concentração do Tampão (M)	Fator de expansão
1(2)	-1	-1	-1
2(5)	+1	-1	-1
3(11)	-1	+1	-1
4(7)	+1	+1	-1
5(4)	-1	-1	+1
6(8)	+1	-1	+1
7(10)	-1	+1	+1
8(3)	+1	+1	+1
9(1)	0	0	0
10(9)	0	0	0
11(6)	0	0	0
12(12)	0	0	0

Tabela 3.12 – Estudo do pH, concentração de tampão e fator de expansão para a etapa de adsorção da inulinase utilizando-se um planejamento completo de 1^{a} ordem.

*Os números entre parênteses correspondem a

ordem (aleatória) em que os ensaios foram realizados.

Tabela 3.13- Valores das variáveis estudadas no planejamento para otimização da adsorção da inulinase.

vaniávais		níveis	
variaveis	-1	0	+1
pН	5,5	6,0	6,5
Concentração do	0,02	0,05	0,08
Tampão (M)			
Fator de Expansão	2,0	2,5	3,0

Como não foi possível estabelecer a quantidade de caldo necessário para alimentar a coluna e construir uma curva de ruptura até a completa saturação, fixou-se o volume de aproximadamente 2500 mL. O caldo fermentado foi diluído para padronizar a concentração da enzima em torno de 200 U/mL. A resposta foi dada em porcentagem de enzima adsorvida na resina em relação à quantidade de enzima total injetada na coluna.

3.6.1.1 Curva de ruptura completa

Após estabelecer a condição ótima de pH, concentração molar do tampão e o fator de expansão, foi construída uma curva de ruptura completa. Aplicou-se 10 litros de caldo retirando-se amostras de 100 mL para a medida de atividade de inulinase.

3.6.2 Otimização da etapa de dessorção da inulinase

Definidas as condições de adsorção a enzima foi aplicada na coluna conforme a condição otimizada no item 3.6.1. Nesta etapa a coluna foi alimentada com 1500 mL de caldo com atividade de inulinase em torno de 200 U/mL, e na eluição foram coletadas frações de 15 mL utilizando o FPLC. As variáveis estudadas para a dessorção foram o pH e o volume do gradiente salino, isto é o volume necessário para que a concentração de NaCl na eluição passasse de 0 M para 1 M. Foi realizado um planejamento completo de 2^a ordem com 2 pontos axiais (para cada fator) e 1 ponto central com 3 repetições resultando 11 ensaios, conforme a Tabela 3.14.

Os valores das variáveis pH e volume do gradiente salino estão apresentados na Tabela 3.15.

Tabela 3.14- Estudo do pH e volume do gradiente salino na etapa de dessorção da inulinase utilizando-se um planejamento completo de 2^{a} ordem.

Ensaios	pН	volume
1 (1)	-1	-1
2 (8)	+1	-1
3 (7)	-1	+1
4 (3)	+1	+1
5 (5)	-1,41	0
6 (9)	+1,41	0
7 (11)	0	-1,41
8 (10)	0	+1,41
9 (2)	0	0
10 (4)	0	0
11 (6)	0	0

* Os números entre parênteses correspondem a ordem (aleatória) em que os ensaios foram realizados

Tabela 3.15– Valores das variáveis estudadas no planejamento do estudo do pH e volume do gradiente salino na etapa de dessorção da inulinase.

	níveis					
variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41	
pН	5,2	5,5	6,25	7,0	7,3	
Volume (mL)	300	400	650	900	1000	

Nesta etapa do trabalho os ensaios foram realizados utilizando a resina regenerada (1 vez) após os ensaios do item 3.6.1. Para manter a homogeneidade da resina regenerada, a resina utilizada em cada ensaio foi misturada em um único frasco, garantindo-se assim que em todos os ensaios desta etapa, a resina tem as mesmas condições de adsorção e dessorção, e avaliar o efeito do pH e volume do gradiente salino na dessorção da enzima.

As variáveis utilizadas no estudo de otimização são as que apresentaram maior influência no resultado em estudos preliminares de purificação, tanto no leito fixo como no leito expandido. Outras variáveis podem ser estudadas para otimizar o processo de purificação, como temperatura e quantidade de resina na coluna. Neste trabalho, foram escolhidas poucas variáveis, devido à restrição de material e também por ser um processo complexo.

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Determinação da Atividade Enzimática (invertase e inulinase)

A atividade enzimática foi determinada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. O método consiste na utilização de frascos incubados em banho termostatizado a 50°C com agitação. Nos frascos adicionam-se 9 ml de solução de sacarose ou inulina a 2% (preparada em solução tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,6) e 1,0 mL da amostra convenientemente diluída. São retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos de tempo 1, 3, 5, 7, e 9 minutos e determina-se a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS. Uma unidade por mL de solução enzimática (U/ml) foi definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar 1 μ mol/(min.mL) de sacarose, ou formar 1 μ mol/(min.mL) de frutose.

3.7.2 Determinação da Atividade Enzimática da inulinase imobilizada

Para a determinação de atividade enzimática da inulinase imobilizada, foram adicionados ao reator 9 mL de solução de sacarose 2% em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,6 e 1 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1 mL de água). Foram retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos 5, 10, 15, 20 e 25 minutos e determinou-se concentração de açúcar pelo método DNS.

3.7.3 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) pelo Método de DNS

A análise de ART foi realizada pelo método de DNS (MILLER, 1959), modificado por COSTA (1986).

3.7.4 Determinação de proteína

Foi utilizado o método de LOWRY (1951).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de microrganismos.

Como descrito na metodologia, foram estudadas 10 linhagens do gênero *Kluyveromyces* para a escolha do microrganismo para otimização da produção da inulinase. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2, podendo-se visualizar a atividade de inulinase em função do tempo. A Figura 4.1 ilustra a produção de inulinase pelas linhagens de *Kluyveromyces* em meio de cultivo sintético otimizado por Kalil (1999). Usando esse meio de cultivo otimizado, o autor obteve aumento da produção de inulinase de 9 U/mL para 120 U/mL.

A Figura 4.2 apresenta a produção de inulinase em meio sintético otimizado com pH inicial de 6,0 para os microrganismos NCYC 587, NCYC 575 e *Kluyveromyces lodderi* e pH 6,5 para os demais microrganismos.

Verifica-se que para as 10 linhagens testadas há uma variação muito grande na produção de enzima. Algumas praticamente não apresentaram produção (NCYC 575 e *K. lodderi*), enquanto outras atingiram ao redor de 20 U/mL (CBS 2103, NRRL Y-1550, NRRL Y-8280 e NRRL Y-610) e outros de 40 a 100 U/mL (NCYC 587, NRRL Y-7571, NRRL Y-1196 e NRRL Y-8279) conforme o pH inicial do meio, após cerca de 48 horas de fermentação.

Assim, dentre os 10 microrganismos testados foram selecionados seis (NCYC 587, NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NRRL Y-7571, NRRL Y-8279 e NRRL Y-8380) para realização dos ensaios com meio industrial composto por melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura, desenvolvido por Treichel (2001). Este meio industrial otimizado para o microrganismo *Kluyveromyces marxianus var.bugaricus* ATCC 16045, resultou em produção de inulinase próxima a produção obtida em meio sintético, representando uma economia de mais de 50 vezes no custo por litro de meio preparado.



Figura 4.1 – Produção de inulinase em meio sintéticos sendo o pH inicial do meio 3,5.



Figura 4.2 – Produção de inulinase em meio sintéticos sendo o pH inicial do meio 6,0 para os microrganismos NCYC 587, NCYC 575 e *Kluyveromyces lodderi*, e 6,5 para os microrganismos CBS 2103,. NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NRRL Y-1550, NRRL Y-7571, NRRL Y-8279 e NRRL Y-8380.

O comportamento da produção de inulinase em meio industrial para vários mirorganismos pode ser visualizado na Figura 4.3. Dois microrganismos se destacaram como bons produtores da enzima em meio industrial, a linhagem NCYC 587 que atingiu 236 U/mL de atividade de inulinase sobre a sacarose e a NRRL Y-7571 que atingiu 296 U/mL. Assim, as duas linhagens foram selecionadas para prosseguir o estudo da otimização do meio de produção da enzima.



Figura 4.3 - Evolução da produção de inulinase em meio industrial para os microrganismos NCYC 587, NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NRRL Y-7571, NRRL Y-8279 e NRRL Y-8380.

4.2 Otimização do meio industrial para a produção de inulinase por *Kluyveromyces* marxianus

4.2.1 Resultados do estudo da otimização do meio de produção de inulinase pela linhagem *K. marxianus* NCYC 587

Os resultados do planejamento fracionário 2⁵⁻¹, tendo como variáveis as concentrações de melaço, água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), temperatura (T) e pH e, como resposta, a atividade enzimática em 24 e 48 horas de fermentação estão apresentados na Tabela 4.1.

Nota-se que conforme a composição do meio de cultivo e as condições de pH e temperatura as atividades de inulinase variaram de 6 a 440 U/mL. Neste estudo de otimização dos componentes do meio de cultivo, pH e temperatura foi obtida atividade de inulinase de 440 U/mL no ensaio 18, o que representa mais que o dobro da atividade obtida na fermentação da linhagem *K. marxianus* NCYC 587 em meio sintético composto por sacarose, extrato de levedura, peptona e sais (KALIL, 1999).

Tabela 4.1- Ensaios do planejamento fracionário 2^{5-1} para otimização dos componentes do meio de cultivo, pH e temperatura para a fermentação da linhagem *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e resultados da atividade de inulinase sobre a sacarose.

Ensaio	Melaço	AMM	EL	Т		Atividade U/mL	
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(°C)	pН	24 h	48 h
1	60	36	2	24	4	39	60
2	110	36	2	24	3	31	13
3	60	60	2	24	3	26	20
4	110	60	2	24	4	72	216
5	60	36	5	24	3	53	16
6	110	36	5	24	4	87	216
7	60	60	5	24	4	68	115
8	110	60	5	24	3	49	37
9	60	36	2	30	3	-	1,4
10	110	36	2	30	4	159	242
11	60	60	2	30	4	112	111
12	110	60	2	30	3	-	0,6
13	60	36	5	30	4	114	129
14	110	36	5	30	3	-	1,6
15	60	60	5	30	3	-	6
16	110	60	5	30	4	237	388
17	85	48	3,5	27	3,5	282	411
18	85	48	3,5	27	3,5	281	440
19	85	48	3.5	27	3.5	293	419

Melaço= melaço de cana-de-açúcar, AMM= água de maceração de milho, EL= extrato de levedura, T= temperatura

Na Tabela 4.2 estão listados os valores dos efeitos de cada variável, bem como o desvio padrão, o valor de t e o nível de significância p. Observa-se que, o pH apresenta um efeito significativo quando passa de 3,0 para 4,0. Na Tabela 4.1 pode-se verificar que todos os ensaios realizados a pH 3,0 as atividades foram baixas e que em pH 3,5 (ponto central) a condição é ainda melhor que o pH 4,0. Assim, nos ensaios nos ensaios que seguiram, o pH da fermentação foi fixado em 3,5. Este resultado também foi obtido por Kalil (2000) para o microrganismo *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045. A temperatura não apresentou efeito significância, ela tem um efeito positivo. Portanto, decidiu-se mantê-la em 30°C nos próximos planejamentos.
Variáveis	efeito	Desvio	t(3)	р
Média	149	3,52	42,53	0,0005
Melaço	82	7,66	10,69	0,0086
AMM	27	7,66	3,50	0,072
EL	30	7,66	3,98	0,057
Temperatura	23	7,66	3,07	0,091
pН	173	7,66	22,54	0,0019

Tabela 4.2 - Efeitos das variáveis no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para otimização do meio de cultivo para fermentação da linhagem *K. marxianus* NCYC 587 e produção de inulinase.

Dando continuidade ao estudo da otimização do meio de produção foi realizado um planejamento completo, tendo como variáveis: concentração de melaço (M), água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura (EL).

Os resultados de atividade em 48 e 72 horas, para o planejamento completo estão listados na tabela 4.3. A análise do planejamento fatorial foi realizada com valores de atividade enzimática de 72 horas de fermentação, sendo que esses resultados variaram de 60 a 765 U/mL.

Tabela 4.3 – Ensaios do planejamento completo para a otimização dos componentes do meio de cultivo para fermentação da linhagem *K. marxianus* NCYC 587 e resultados da atividade de inulinase sobre a sacarose.

Ensaios	Melaço	AMM	EL	Ativida	de U/mL
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	48h	72 h
1	70	30	3	309	334
2	110	30	3	95	128
3	70	60	3	397	394
4	110	60	3	74	90
5	70	30	5	344	386
6	110	30	5	135	213
7	70	60	5	360	397
8	110	60	5	43	71
9	56,4	45	4	257	295
10	123,6	45	4	159	302
11	90	19,8	4	336	394
12	90	70,2	4	483	657
13	90	45	2,32	27	60
14	90	45	5,68	501	631
15	90	45	4	541	765
16	90	45	4	548	717
17	90	45	4	526	717
18	90	45	4	509	646

A Equação 4.1 representa o modelo codificado para a atividade de inulinase em U/mL sobre a sacarose em função do melaço (M), água de maceração de milho (A) e extrato de levedura (E).

Atividade=717-73*[M]-172*[M]²-91*[A]²+79*[E]-155*[E]² (Equação 4.1)

Pela análise de variância (ANOVA) na tabela 4.4 o F calculado é 2,43 vezes maior que o F tabelado (3,11), e o coeficiente de correlação igual a 0,87. Segundo Haaland (1989), este resultado não é um excelente ajuste dos dados experimentais do modelo, mas é o suficiente para avaliar os efeitos das variáveis estudadas na atividade enzimática, através da superfície de resposta e curvas de contorno, definindo-se assim a composição do meio de cultivo que leva à maior atividade enzimática.

Tabela 4.4 – ANOVA para planejamento fatorial con	mpleto.
--	---------

Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	*F _{calc}
Regressão	735298	5	147059	7,56
**Resíduo	233496	12	19458	
Falta de ajuste	226259	9	25140	
Erro puro	7237	3		
Total	968794	17		
R = 0,87				

F_{0,05;5;12}=3,11

 $*F_{calc} = F$ calculado

**Resíduo= falta de ajuste + erro puro

As superfícies e as curvas de contorno apresentadas na Figura 4.4, mostram que as concentrações do melaço, AMM e extrato de levedura estão otimizados, e apresentam atividades enzimáticas máximas nas condições centrais: 90 g/L de melaço, 45 g/L de água de maceração de milho e 4 g/L de extrato de levedura.



Figura 4.4 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase produzida pelo microrganismo *K. marxianus* NCYC 587, em função da concentração de AMM e extrato de levedura (a) e (b), em função da concentração de melaço e extrato de levedura (c) e (d), em função da concentração do extrato de levedura e água de maceração de milho (e) e (f).

4.2.2 Resultados do estudo da otimização do meio de produção de inulinase pela linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571

Para estudo da otimização do meio de produção da inulinase pela linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571, realizou-se inicialmente um planejamento fracionário 2^{4-1} e os resultados de atividade da inulinase sobre a sacarose em 48 e 72 horas estão listados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Ensaios do planejamento fracionário 2^{4-1} para otimização dos componentes do meio de cultivo e pH para fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 e resultados da atividade de inulinase sobre a sacarose.

Ensaios	Melaço	AMM	EL	pН	Ativida	de U/mL
	(g/L)	(g/L)	(g/L)		48h	72 h
1	70	30	3	3,5	21	30
2	110	30	3	5,5	635	662
3	70	60	3	5,5	362	350
4	110	60	3	3,5	15	12
5	70	30	5	5,5	489	439
6	110	30	5	3,5	15	66
7	70	60	5	3,5	429	413
8	110	60	5	5,5	710	677
9	90	45	4	4,5	471	623
10	90	45	4	4,5	519	676
11	90	45	4	4,5	598	812
12	90	45	4	4,5	548	764

Existe uma variação na atividade enzimática de 12 (ensaio 4) até 812 U/mL (ensaio 11) com 72 horas de fermentação, conforme a condição do meio de cultivo. A partir destes resultados foram calculados os efeitos das variáveis apresentados na Tabela 4.6. O aumento na concentração do extrato de levedura (de 3 a 5 g/L) e do valor de pH (de 3,5 a 5,5) apresentou um aumento significativo (10% de significância) na atividade enzimática, no entanto as concentrações de melaço e AMM não foram estatisticamente significativas na faixa estudada.

Variáveis	Efeito	desvio	t(3)	р
Média	461*	24,38	18,89*	0,0003*
Concentração de Melaço	46	59,72	0,78	0,4922
Concentração de AMM	64	59,72	1,07	0,3635
Concentração de EL	135	59,72	2,25	0,1094
рН	402*	59,72	6,73*	0,0067*

Tabela 4.6 - Efeitos das variáveis no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} no tempo de 72 horas de fermentação.

*Efeitos estatisticamente significativos (p≤0,10)

Assim, foi realizado um planejamento fatorial completo, com a concentração de melaço fixada em 90 g/L, AMM em 45g/L e temperatura de 30°C, tendo como variáveis a concentração de extrato de levedura (EL) e o pH; na Tabela 4.7 estão listados os valores reais para os níveis codificados.

Tabela 4.7 – Ensaios do planejamento fatorial completo para estudo do efeito do extrato de levedura e pH, e resultados da atividade de inulinase sobre a sacarose após 26, 51 e 72 horas de fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571.

			Ativ	vidade (U/	mL)
Ensaio	EL (g/L)	pН	26h	51h	72h
1	3	4,8	235	555	558
2	5	4,8	263	556	557
3	3	6,2	190	453	359
4	5	6,2	233	241	147
5	2,6	5,5	219	488	477
6	5,4	5,5	211	517	473
7	4	4,5	260	535	554
8	4	6,5	192	503	321
9	4	5,5	222	622	761
10	4	5,5	175	601	661

Foram retiradas amostras em 26 horas, 51 horas e 72 horas e analisadas a atividade da inulinase sobre a sacarose. Pela análise dos resultados da Tabela 4.7, observa-se que as maiores atividades foram apresentadas nos ensaios correspondentes aos pontos centrais em 72 horas de fermentação.

A equação 4.2 abaixo representa o modelo codificado para a atividade da inulinase sobre a sacarose em função do extrato de levedura e do pH.

Atividade = $712 - 131^{*}[EL]^{2} - 117^{*}pH - 150^{*}pH^{2}$ (equação 4.2)

A validade desse modelo é verificada pela análise de variância (ANOVA) da Tabela 4.8 onde F calculado foi de 11,27 sendo 2,35 vezes maior que o F tabelado igual a 4,79 para 5% de significância.

Tabela 4.8 – ANOVA para planejamento fatorial completo.							
Fontes de variação	Soma de	Grau de	Quadrados	*F _{calc}			
	quadrados	liberdade	médios				
Regressão	237603	3	79201	11,27			
**Resíduo	42166	6	7028				
Falta de ajuste	37143	5					
Erro puro	5023	1					
Total	279769	9					
R = 0.92							

F_{0,05;3;6}=4,79

 $*F_{calc} = F$ calculado

**Resíduo= falta de ajuste + erro puro



Figura 4.5– Superfície de resposta e curva de contorno para atividade de inulinase em função do extrato de levedura e pH, para *K. marxianus* NRRL Y-7571.

A metodologia do planejamento experimental e análise de superfície de resposta, visualizado na Figura 4.5, permitiu otimizar o meio de fermentação atingindo atividade de inulinase de aproximadamente 700 U/mL para os dois microrganismos selecionados nos testes preliminares. O meio otimizado para os dois microrganismos foi composto por:

melaço 90 g/L, água de maceração de milho 45 g/L e extrato de levedura 4 g/L, diferenciando apenas no valor do pH inicial, sendo pH 3,5 para a linhagem *K. marxianus* NCYC 587 e pH 5,5 para a linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Para a continuidade do projeto foi selecionado o *K. marxianus* NRRL Y-7571, embora a linhagem NCYC 587 também apresente um potencial grande, merecendo atenção especial em trabalhos futuros.

4.2.3 Comprovação do estudo de otimização

4.2.3.1 Fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em frascos agitados, em meio otimizado.

Os resultados da fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em frascos agitados contendo o meio otimizado (melaço 90 g/L, AMM 45 g/L, extrato de levedura 4 g/L, pH 5,0, 150 rpm e 36°C (KABKE, 2002)), estão apresentados na Tabela 4.9 e na Figura 4.6. A produção celular ocorre até as 24 horas e a concentração celular permanece praticamente constante até as 120 horas. A produção de enzima está de acordo com os resultados encontrados na otimização sendo que a produção máxima ocorreu em 78 horas e após esse tempo houve uma queda abrupta na produção da enzima. A atividade sobre a inulina não foi analisada em todas as amostras.

4.2.3.2 Fermentação em fermentador de bancada tipo Bioflo

A composição do meio de cultivo, pH e temperatura foram as mesmas descritas no item anterior. A cinética de produção de inulinase pela linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentador de bancada tipo Bioflo utilizando o meio de cultivo otimizado foi realizado como descrito no item 3.

Foi realizado o acompanhamento cinético, cujos os dados estão listados na Tabela 4.10 e representado pela Figura 4.7.

A cinética de fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentador de bancada foi similar à realizada em frascos agitados, mas a produção da enzima inulinase diminuiu pela metade, sendo necessários estudos de otimização da produção de inulinase em fermentador de bancada.

			Atividade		Atividade	
Tempo		massa seca	(sacarose)	ART	(inulina)	S/I
(horas)	pН	(g/L)	(U/mL)	(g/L)	(U/mL)	
0	4,87	5,5	0	52,1	0	
0,5	4,91	6,2	6,5	47,6	-	
1	4,88	7,4	8,1	48,7	-	
1,5	4,83	6,3	8,8	54,0	-	
2	4,79	5,1	7,7	47,1	-	
2,5	4,76	5,1	7,4	47,6	-	
3	4,72	6,1	9,9	45,5	3,1	3,2
3,5	4,64	7,3	10,1	42,2	-	
4	4,53	8,0	10,8	36,8	-	
5	4,34	11,1	10,9	28,6	-	
6	4,70	11,3	11,9	3,6	1,7	7
7	5,51	11,3	13,1	1,9	-	
8	5,76	11,5	14,1	4,6	-	
12	6,34	16,0	43,4	4,5	5,2	8,3
24	6,24	23,4	371,1	4,4	22,4	16,6
26	6,77	21,6	518,1	2,0	27,2	19,2
30	7,03	21,7	521,4	1,6	-	
48	7,00	20,7	603,5	2,0	41,6	14,5
54	6,94	19,8	544,8	1,6	-	
72	6,93	20,8	697,0	1,9	48,5	14,4
78	7,80	21,3	755,2	1,8	-	
88	8,34	21,3	361,0	-	-	
97	8,45	19,9	110,2	-	6,8	16,2
102	8,48	19,4	56,5	-	-	
120	8,49	20,7	15,8	-	3,7	4,3

Tabela 4.9- Cinética da fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em frascos agitados utilizando-se o meio de cultivo otimizado.

ART=açúcares redutores totais e S/I=atividade relativa da enzima sobre a sacarose e inulina



Figura 4.6- Resultados de pH, massa seca (MS), atividade sobre a inulina, açúcares redutores totais (ART) e atividade sobre a sacarose do acompanhamento cinético da fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em frascos agitados utilizando-se o meio de cultivo otimizado.

			A 41-11 J = J =		A 41-11 J = J =	
_			Atividade		Atividade	-
Тетро		massa seca	(sacarose)	ART	(inulina)	S/I
(horas)	pН	(g/L)	(U/mL)	(g/L)	(U/mL)	
0	4,88			53,0	0	
1	4,83	6,9	9,9	39,7	2,2	4,5
2	4,78	6,8	9,9	35,8	1,6	6,2
3	4,69	7,8	8,7	38,6	2,3	3,4
4	4,56	8,6	9,4	30,6	1,0	9,4
5	4,52	10,0	10,2	7,2	1,3	7,8
6	4,70	10,5	11,3	0,6	0,9	12,6
7	5,01	10,6	10,6	0,2	1,4	7,6
8	5,27	11,2	12,3	1,5	1,2	10,2
9	5,33	12,9	13,5	0,2	1,3	10,4
21	6,39	14,3	68,8	0,3	3,5	19,6
24	6,59	15,4	89,1	1,2	7,7	11,6
31,5	6,95	16,1	172,4	0,3	11,5	15,0
38,5	6,92	19,1	280,3	0,3	18,2	15,4
48	7,23	16,9	363,5	0,2	24,4	14,9
56	7,28	18,5	375,4	0,2	25,2	14,9
60	7,29	17,1	381,6	-	19,9	19,2
72	7,23	16,7	405,4	-	20,8	19,5

Tabela 4.10 Cinética da fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentador de bancada (Bioflo), utilizando-se meio de cultivo otimizado.

ART=açúcares redutores totais e S/I=atividade relativa da enzima sobre a sacarose e inulina



Figura 4.7 - Resultados de pH, massa seca (MS), atividade sobre a inulina, açúcares redutores totais (ART) e atividade sobre a sacarose do acompanhamento cinético da fermentação da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-7571 em fermentador de bancada (Bioflo) utilizando-se o meio de cultivo otimizado.

4.3 Caracterização parcial da inulinase da linhagem K. marxianus NRRL Y-7571

A partir da enzima inulinase obtida pela fermentação do microrganismo *K. marxianus* NRRL Y-7571 em meio industrial otimizado, foram determinados para a caracterização da enzima o pH e temperatura ótimos, pH de estabilidade e os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$.

Para as preparações de inulinase bruta, inulinase bruta imobilizada, inulinase purificada e inulinase purificada imobilizada, foram determinadas as estabilidades térmicas calculando-se o tempo de meia vida. Resultados que podem ser úteis para os trabalhos futuros em processo de produção de frutose e frutooligossacarídeos utilizando esta enzima.

4.3.1 Determinação de temperatura ótima e pH ótimo de atividade da inulinase bruta do caldo fermentado

A determinação da atividade da enzima sobre a sacarose e sobre a inulina, bem como a relação entre (S/I) foi realizada segundo um planejamento fatorial completo tendo como variáveis de estudo o pH e a temperatura (T), sendo apresentados na Tabela 4.11. O uso do planejamento fatorial onde as várias combinações estatísticas são realizadas é muito útil, para mostrar que a combinação dos parâmetros pH e temperatura induzem a uma atuação diferenciada da enzima sobre a sacarose e a inulina. As altas temperaturas como 65,6°C (ensaios 3 e 4) e 70°C (ensaio 8) favoreceram a atividade sobre a sacarose, mas inibiu a atividade sobre a inulina, obtendo valores de S/I acima que 50 caracterizando a enzima como invertase nessas temperaturas.

Ensaios	рН	Τ	Atividade (sacarose)	Atividade (inulina)	S/I
1	4,64	44,4	525	13	40
2	5,36	44,4	385	25	15
3	4,64	65,6	869	6	145
4	5,36	65,6	587	3	196
5	4,5	55	875	46	19
6	5,5	55	696	52	13
7	5	40	290	18	16
8	5	70	247	3	82
9	5	55	855	50	17
10	5	55	791	45	18
11	5	55	763	56	13

Tabela 4.11– Planejamento fatorial completo para estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da inulinase sobre sacarose e sobre inulina.

T= temperatura e S/I=atividade relativa da enzima sobre a sacarose e inulina

As Equações 4.3 e 4.4 seguintes representam os modelos codificados para estimar a atividade sobre a sacarose e inulina conforme a variação dos valores de pH e temperatura(T).

Atividade
$$_{sacarose} = 810 - 84 * pH - 254 * T^2$$
 (Equação 4.3)

Atividade _{inulina} =
$$50 - 5*pH^2 - 6*T - 25*T^2$$
 (Equação 4.4)

A validade dos modelos obtidos através do planejamento experimental pode ser observada pela análise de variância (ANOVA) nas Tabelas 4.12 e 4.13. O modelo obtido para a atividade sobre a sacarose foi validado para 5% de significância, onde o F calculado de 18, 57 foi 4,16 vezes maior que o F tabelado. Para o modelo da atividade sobre a inulina também foi validado a 5% de significância, com F calculado de 10,39 sendo 2,39 vezes maior que o F tabelado. Com os modelos validados foram geradas as superfícies de resposta da Figura 4.8.

Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	*F _{calc}
Regressão	452920	2	226460	18,57
**Resíduo	97552	8	12194	
Falta de ajuste	93122	6		
Erro puro	4430	2		
Total	550472	10		
R = 0.95				

 Tabela 4.12
 Tabela ANOVA da atividade sobre a sacarose.

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

 $*F_{calc} = F$ calculado

**Resíduo= falta de ajuste + erro puro

Fontes de variação	Soma de	Grau de	Quadrados	*F _{calc}
	quadrados	liberdade	médios	
Regressão	3724,08	3	1241,36	10,39
**Resíduo	836,29	7	119,47	
Falta de ajuste	769,16	5		
Erro puro	67,13	2		
Total	4560,37	10		
R = 0.95				

Tabela 4.13– Tabela ANOVA da atividade sobre a inulina

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

 $*F_{calc} = F$ calculado

**Resíduo= falta de ajuste + erro puro

Analisando-se as superfícies de resposta da Figura 4.8 e os dados da Tabela 4.11, verifica-se que a atividade sobre a inulina é favorecida em pH 5,0 a uma temperatura de 55°C, enquanto que, para a atividade sobre a sacarose, os valores ótimos de pH e temperatura são 4,5 e 55°C respectivamente.

Para os valores da relação S/I, não foi possível definir um modelo para analisar os resultados obtidos, uma vez que não se observou uma relação entre as duas atividades, como pode ser verificado pela figura 4.9. Este resultado é muito importante e deve ser explorado futuramente, pois mostra que a enzima atua diferentemente para substratos diversos, quando varia o pH e a temperatura.









Figura 4.8 – Superfícies geradas pelo planejamento fatorial, sendo (a) e (b) para a atividade sobre a sacarose, (c) e (d) para atividade sobre a inulina.



Figura 4.9 – Comparação da atividade de hidrólise da sacarose em função da atividade de hidrólise da inulina.

4.3.2 Determinação do pH de estabilidade da inulinase bruta do caldo fermentado.

A Tabela 4.14 e Figura 4.10 ilustram a faixa de pH de estabilidade da inulinase bruta após 2 horas de incubação a 50°C.

pН	% atividade	tampão
	residual	
3,0	55,95	
4,0	75,74	Acetato
4,5	72,12	0,05 M
5,0	73,4	
5,5	84,41	
6,0	74,22	
6,5	32,66	Fosfato
7,0	1,09	0,05 M
7,5	0,77	
8,0	0,52	
8,5	0,41	

Tabela 4.14 – pH de estabilidade da inulinase bruta.



Figura 4.10- pH de estabilidade da inulinase bruta.

Analisando-se o comportamento da atividade residual da inuliase em relação às soluções de tampão acetato e tampão fosfato, da Figura 4.10, pode-se definir uma região de

estabilidade entre pH 4,0 e 6,0. A partir do pH 7,0, a enzima perde completamente a sua atividade.

4.3.3 Determinação de K_m e V_{máx} da inulinase bruta

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten (K_m e $V_{máx}$), foi utilizada uma faixa de concentração de 1 a 40 g/L de sacarose e medida a atividade enzimática. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 4.15 e na Figura 4.11.

Para a determinação dos parâmetros, utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a Equação 4.5 a seguir:

$$V = \frac{Vm\acute{a}x^*[s]}{Km + [s]}$$
(Equação 4.5)

Através da linearização da Equação 4.5 temos:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{S} * \frac{Km}{Vm\acute{a}x} + \frac{1}{Vm\acute{a}x}$$
(Equação 4.6)

Então, grafica-se 1/[s] x 1/V, conforme a Figura 4.12.

Tabela 4.15 – Valores experimentais para determinação dos parâmetros cinéticos da inulinase bruta.

sacarose	Sacarose	Atividade
(g/L)	(µmol/mL)	(µmol /mL.min)
1	2,92	96,03
2	5,84	171,48
3	8,76	241,60
4	11,68	283,51
5	14,61	329,74
6	17,53	331,27
7	20,45	343,72
8	23,40	356,17
9	26,30	449,65
10	29,21	477,10
15	43,82	595,47
20	58,43	606,14
25	73,03	644,25
30	87,64	651,87
35	102,25	612,75
40	116,86	594,46



Figura 4.11 –Efeito da concentração do substrato sacarose na atividade da inulinase bruta.



Figura 4.12– Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos $K_m \, e \, V_{\text{máx}}$

Pela equação do gráfico linearizado, obteve-se os valores de K_m e $V_{máx}$, que foram 20,4 µmol/ml e 769,2 µmol/min.mL, respectivamente, para o substrato sacarose.

4.3.4 Determinação de K_m e $V_{máx}$ da inulinase purificada

Analogamente ao item anterior, foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da inulinase purificada, foi utilizada uma faixa de concentração de 1 a 35 g/L de

sacarose e medida a atividade enzimática. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.16 e na Figura 4.13.

Sacarose	Sacarose	Atividade
(g/L)	(µmol/mL)	(µmol/min.mL)
1	2,92	108,85
2	5,84	180,17
3	8,76	238,98
4	11,68	292,15
5	14,61	285,27
6	17,53	331,57
7	20,45	339,07
8	23,4	347,83
9	26,3	359,09
10	29,21	354,09
20	58,43	452,94
25	73,03	444,18
30	87,64	484,22
35	102,25	426,66

Tabela 4.16 – Valores experimentais para determinação dos parâmetros cinéticos da inulinase purificada.



Figura 4.13 – Efeito da concentração de substrato sacarose na atividade da inulinase purificada.

Foi construído o gráfico 1/[s] x 1/V, representado na Figura 4.14.



Figura 4.14- Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da inulinase purificada.

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da inulinase purificada para o substrato sacarose, foram 11,1 µmol/mL e 526,3 µmol/mL.min respectivamente.

A enzima purificada apresentou uma velocidade de reação menor que a enzima bruta como pode ser observado na Tabela 4.17; mas em relação a K_m , que é inversamente proporcional a afinidade química da enzima com o substrato, a enzima apresenta maior afinidade quando purificada.

Enzima	K_m (µmol/mL)	V _{máx} µmol/mL.min)
Inulinase bruta (Caldo fermentado)	20,384	769,23
Inulinase purificada	11,05	526,31

Tabela 4.17 - Resultados de K_m e V_{máx} para inulinase bruta (caldo fermentado).

4.3.5 Estabilidade térmica

O estudo da estabilidade térmica foi realizado com inulinase bruta, inulinase bruta imobilizada, inulinase purificada e inulinase purificada imobilizada.

4.3.5.1 Estudo de estabilidade térmica da inulinase bruta

O estudo da estabilidade térmica da inulinase bruta foi realizado através do decaimento da atividade enzimática com o tempo para diferentes temperaturas, cujos resultados estão listados nas Tabelas B1 a B8 no anexo B.

A partir dos dados obtidos experimentalmente foram graficados ln (C/Co) vs tempo e, desses gráficos, obteve-se os valores de Kd (coeficiente de desativação enzimática) para cada temperatura, listados na Tabela 4.18. Com esses valores, construiu-se o gráfico de ln Kd em função de 1/T da Figura 4.15.

Temp. (°C) 1/T (1/K) Kd Ln Kd 56 0,00304 0,004 5,547 58 0,00302 0,009 4,668 60 0.00300 0,027 3,612 62 0,00298 0,083 2,483 64 0,00297 0,169 1,777 0,00295 1,756 66 0,173 0,00293 0,667 68 0,513 70 0.00291 0.908 0.097

Tabela 4.18 – Valores de Kd em função da temperatura para inulinase bruta.



Figura 4.15 – Gráfico linearizado para a equação de Arhenius da inulinase bruta.

A partir da equação de Arhenius linearizada (Equação 4.7), obtida pelo gráfico, sendo R igual a 1,98 cal/gmol K, obtêm-se o valor de Ed (energia de desativação enzimática):

$$\ln Kd = \ln K - \frac{Ed}{RT}$$

y = 126,16 - 43246/T (Equação 4.7)
$$\frac{Ed}{R} = 43246$$

Ed = 43246 * R = 43246 * 1,98
Ed = 85627*cal* / gmol

Para obter a equação final, calcula-se o valor de K a partir de ln K = 126,16, ou seja K igual 6,17 x 10^{54} . Dessa forma a expressão para determinar os valores de Kd assume a forma:

$$Kd=6,17*10E54*exp(-43246/T)$$
 (Equação 4.8)

Foram calculados os tempos de meia vida de acordo com a Equação 4.8 para as temperaturas estudadas (Tabela 4.19), onde se observa maior estabilidade para baixas temperaturas.

Tabela 4.19 – Tempos de meia vida estimados a partir da equação obtida experimentalmente para a inulinase bruta.

Temperatura	Temperatura		½ vida est.		½ vida
(°C)	(K)	Kd est	(min)	Kd exp	exp. (min)
56	329	0,005	137,14	0,004	177,73
58	331	0,011	61,98	0,009	73,74
60	333	0,024	28,28	0,027	25,67
62	335	0,053	13,02	0,083	8,30
64	337	0,114	6,05	0,169	4,10
66	339	0,244	2,84	0,173	4,01
68	341	0,516	1,34	0,513	1,35
70	343	1,081	0,64	0,908	0,76

est= estimado e exp= experimental

Comparando-se os valores experimentais com os valores estimados para o tempo de meia vida, Figura 4.16, observa-se um bom ajuste das curvas, permitindo estimar o tempo de meia vida para outras temperaturas, dentro da faixa estudada.



Figura 4.16 –Comparação dos tempos de meia vida experimental com o estimado para a inulinase bruta.

4.3.5.2 – Estudo da estabilidade térmica da inulinase bruta imobilizada.

A cinética de inativação da inulinase em diferentes temperaturas pode ser verificada nas Tabelas B9 a B14 do anexo B

Foram determinados os valores de kd experimentais listados na Tabela 4.20 e seguindo o mesmo procedimento do item anterior foram determinadas a energia de desativação Ed e a constante de proporcionalidade K pelo gráfico da Figura 4.17.

Tabela 4.20 – Valores de Kd em função da temperatura para inulinase bruta imobilizada.

Temp (°C)	1/T (1/K)	-Kd	-lnKd
50	0,00309	0,0005	7,601
56	0,00304	0,0122	4,406
57,5	0,00302	0,0357	3,333
60	0,00300	0,0782	2,548
62,5	0,00298	0,3736	0,984
65	0,00296	0,5383	0,619



Figura 4.17 - Gráfico linearizado para a equação de Arhenius da inulinase bruta imobilizada

$\ln Kd = \ln K - \frac{Ed}{RT}$		
y = 155,29 - 52514	4/T (Equação 4.9)	1
$\frac{Ed}{R} = 52514$		
<i>Ed</i> = 52514 * 1,98		
Ed = 104031	K = 2,76E67	
Sendo: Kd= 2,76E	67*exp(-52514/T)	(Equação 4.10)

Os valores de Kd e tempo de meia vida estimados pela expressão acima estão listados na Tabela 4.20 e plotados na Figura 4.18, onde valores estimados pela equação estão coerentes com os resultados experimentais.

Tabela 4.21 – Tempo de meia vida para o Kd estimado e para o Kd real da inulinase bruta imobilizada.

			½ vida		½ vida
temp (K)	Temp.(°C)	Kd est	est. (min)	Kd exp	exp (min)
323	50	0,001	1110,55	0,0005	1386,29
329	56	0,012	57,49	0,0122	56,81
330,5	57,5	0,025	27,89	0,0357	19,42
333	60	0,082	8,47	0,0782	8,86
335,5	62,5	0,264	2,62	0,3736	1,85
338	65	0,840	0,82	0,5383	1,29



Figura 4.18 - Comparação dos tempos de meia vida experimental com o estimado da inulina bruta imobilizada.

4.3.5.3- Resultado da estabilidade térmica da inulinase purificada.

Como complementação do trabalho, a fração obtida na purificação em leito expandido nos testes preliminares (ensaio 6) utilizando-se tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, foi escolhida para realizar a caracterização parcial por apresentar um fator de purificação alto de 14,34 e recuperação de 63,4%.

Os resultados obtidos com as incubações em diferentes temperaturas estão listados nas tabelas B15 a B20 do anexo B.

Os valores de Kd estão listados na tabela 4.22, de onde obteve-se o gráfico ln Kd versus 1/T (Figura 4.19).

Tabela 4.22 - Valores de Kd em função da temperatura da inulinase purificada.

Temp. (°C)	1/T (1/K)	-Kd	-ln Kd
50	3,09E-03	0,001	7,013
55	3,05E-03	0,017	4,098
57,5	3,02E-03	0,049	3,024
60	3,00E-03	0,097	2,334
62,5	2,98E-03	0,190	1,658
65	2,96E-03	0,619	0,480



Figura 4.19 – Gráfico linearizado para a equação de Arhenius da inulinase purificada.

A partir da equação de Arhenius, retirado do gráfico, e com R igual a 1,98 cal/gmol K, obteve-se o valor de Ed (energia de inativação enzimática):

$$\ln Kd = \ln K - \frac{Ed}{RT}$$

y = 134,15 - 45467/T (Equação 4.11)
$$\frac{Ed}{R} = 45467$$

Ed = 45467 * 1,98
Ed = 90024 K = 1,82E58
Sendo: Kd=1,82 E 58 * exp (-45467/T) (Equação 4.12)

Foram calculados os valores de Kd para o intervalo de temperatura de 50°C a 65°C e através da equação $t_{1/2} = -\ln(0,5)$ /Kd, determinaram-se os valores de meia vida da inulinase purificada, citados na Tabela 4.22.

	Temp		½ vida		½ vida exp
Temp (°C)	(K)	Kd est	est. (min)	Kd exp	(min)
50	323	0,001	517,71	0,001	770,16
55	328	0,011	60,56	0,012	41,75
57,5	330,5	0,033	21,22	0,049	14,26
60	333	0,092	7,55	0,097	7,15
62,5	335,5	0,254	2,73	0,190	3,64
65	338	0,691	1,00	0,619	1,12

Tabela 4.23 - Tempos de meia vida da inulinase purificada, estimados a partir da equação obtida experimentalmente.

Através da análise da tabela acima, verifica-se que conforme a temperatura aumenta, menor é a estabilidade da enzima, podendo, assim, concluir que a enzima é mais estável em temperaturas próximas a 50°C.

Analisando-se os tempos de meia vida experimental e estimado, observa-se um bom ajuste das curvas para temperaturas acima de 55°C, permitindo estimar o tempo de meia vida para outras temperaturas, dentro da faixa estudada (Figura 4.20).



Figura 4.20 - Comparação dos tempos de meia vida real com o estimado, da inulinase purificada.

4.3.5.4-Resultado para estabilidade térmica da inulinase purificada imobilizada

A cinética de inativação pode ser acompanhada pelas tabelas B21 a B25 (anexo B).

Os valores de Kd estão listados na tabela 4.23 e a figura 4.21 representa o gráfico ln Kd versus 1/T.

temp	1/T (1/K)	-kd	-lnKd
55	0,00305	0,048	3,04
57,5	0,00303	0,109	2,22
60	0,00300	0,401	0,91
62,5	0,00298	0,992	0,01
65	0,00296	1,234	-0,21

 Tabela 4.24 - Valores de Kd em função da temperatura



Figura 4.21 Gráfico linearizado para a equação de Arhenius da inulinase purificada imobilizada.

$$\ln Kd = \ln K - \frac{Ed}{RT}$$

y = 115,32 - 38793/T (Equação 4.13)
$$\frac{Ed}{R} = 38793$$

Ed = 38793*1,98
Ed = 76810 K = 1,21E50
Sendo: Kd=1,21E50exp(-38793/T) (Equação 4.14)

Tabela 4.25 Tempos de meia vida da inulinase purificada imobilizada, estimados a partir da equação obtida experimentalmente.

Temp			¹ ⁄ ₂ vida		½ vida exp
(K)	Temp (°C)	Kd est	est. (min)	Kd exp	(min)
328	55	0,0521	13,29	0,0478	14,50
330,5	57,5	0,1272	5,45	0,1086	6,38
333	60	0,3064	2,26	0,401	1,72
335,5	62,5	0,7283	0,95	0,9921	0,69
338	65	1,7091	0,40	1,2336	0,56



Figura 4.22 Comparação dos tempos de meia vida real com o estimado, da inulinase purificada imobilizada.

Assim como para a inulinase bruta e inulinase bruta imobilizada, também foi obtido um bom ajuste dos valores estimados para a inulinase purificada imobilizada em relação aos valores experimentais. Em seguida foram comparados os resultados obtidos para diferentes preparações de inulinase.

4.3.5.5 Comparação dos dados de kd estimado e meia vida da inulinase

Nos experimentos de estabilidade térmica foi determinada a energia de inativação e a constante de desativação térmica das diferentes preparações de inulinase (Tabela 4.26): inulinase bruta (IB), inulinase bruta imobilizada (IBI), inulinase purificada (IP) e inulinase purificada imobilizada (IPI). Desta forma pode-se obter uma equação e estimar o Kd em temperaturas diferentes das que foram medidas experimentalmente, e calcular o tempo de meia vida em qualquer temperatura dentro da faixa em que foi realizado o estudo.

enzimas	Ed	K	Kd estimado
 IB	85627	6,17E54	Kd=6,17E54*exp(-43246/T)
IBI	104031	2,76E67	Kd=2,76E67*exp(-52514/T)
IP	90024	1,82 E58	Kd=1,82E58*exp (-45467/T)
IPI	76610	1,21E50	Kd=1,21E50*exp(-38793/T)

Tabela 4.26 Energia de desativação (Ed), constante de proporcionalidade e equação para estimar o Kd para as diferentes preparações da inulinase.

A tabela 4.27 ilustra o Kd para a faixa de temperatura de 50 a 70°C, para as diferentes preparações de inulinase

Através do gráfico da figura 4.23, observa-se que a enzima imobilizada apresenta Kd maiores que a enzima livre, tanto para a bruta como para a purificada.

Tabela 4.27 Estimativa de Kd para diferentes temperaturas para a inulinase bruta, inulinase bruta imobilizada, inulinase purificada e inulinase purificada imobilizada.

temp (C)	temp (K)	Kd IB	Kd IBI	Kd IP	Kd IPI
50	323	-	0,0007	0,0013	-
52	325	-	0,0018	0,0032	-
54	327	-	0,0050	0,0075	-
56	329	0,0051	0,0132	0,0174	0,0749
58	331	0,0112	0,0346	0,0402	0,1527
60	333	0,0245	0,0897	0,0917	0,3086
62	335	0,0532	0,2300	0,2073	0,6187
64	337	0,1145	0,5831	0,4639	1,2301
66	339	0,2441	1,4621	1,0282	2,4260
68	341	0,5159	3,6271	2,2580	4,7465
70	343	1,0808	8,9030	4,9132	9,2142



Figura 4.23 Comparação dos valores de Kd para diferentes preparações da inulinase.

Com os valores de Kd da tabela 4.26 foi estimado o tempo de meia vida para cada temperatura para as diferentes preparações de inulinase (tabela 4.27). Verifica-se que a enzima bruta é mais estável que as outras, e que a purificação diminui essa estabilidade, e ao ser imobilizada a enzima se torna menos estável que a enzima livre. Apesar da enzima imobilizada com alginato de cálcio mostrar baixa estabilidade térmica, existem estudos que utilizaram outros suportes para imobilização para aumentar a meia vida da enzima. Um estudo desenvolvido por Futagawa (2002) conseguiu melhorar essa estabilidade introduzindo carvão e gluteraldeído ao alginato de cálcio. Trabalhar com a enzima imobilizada em processos industriais traz algumas vatagens, pois possibilita a recuperação da enzima, e também torna possível trabalhar em processo contínuo onde a enzima imobilizada é empacotada em colunas de leito fixo.

temp (C)	temp (K)	1/2vida IB	1/2vida IBI	1/2vida IP	1/2vida IPI
50	323	-	1019,53	517,71	-
52	325	-	374,88	217,71	-
54	327	-	139,54	92,53	-
56	329	137,14	52,57	39,74	9,26
58	331	61,98	20,04	17,24	4,54
60	333	28,28	7,73	7,56	2,25
62	335	13,02	3,01	3,34	1,12
64	337	6,05	1,19	1,49	0,56
66	339	2,84	0,47	0,67	0,29
68	341	1,34	0,19	0,31	0,15
70	343	0,64	0,08	0,14	0,08

Tabela 4.28 Tempos de meia vida em minutos para as diferentes preparações da inulinase em função da temperatura.



Figura 4.24 Comparação das curvas de tempo de meia vida para as diferentes preparações de inulinase.

4.4 Estudo de adsorção da inulinase na resina aniônica Streamline DEAE

4.4.1 Teste de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE equilibrada com tampão fosfato 0,05 M

Os ensaios de adsorção foram realizados na faixa de pH 5,2 a 8,0 como descrito no item 3.4.1. O caldo fermentado utilizado para o teste de adsorção apresentou atividade inicial de 574 U/mL, e verificou-se que para todos os valores de pH analisados a adsorção foi praticamente total.

4.4.2 Teste de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M

Foram realizados testes de adsorção para os valores de pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 como descrito no item 3.4.1. Para todos os valores de pH, assim como no caso precedente, a atividade enzimática final foi nula indicando, desta maneira, que toda a enzima presente no caldo foi adsorvida pela resina.

4.4.3 Cinética de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE

A cinética de adsorção foi realizada com o objetivo de verificar o tempo de equilíbrio, quando a resina está com a capacidade máxima de adsorção. Foi estudada a adsorção em solução tampão fosfato de sódio e solução tampão tris-HCl, pois nos testes de adsorção os dois tampões favoreceram a adsorção da enzima pela resina em estudo.

4.4.3.1 Cinética de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE em tampão fosfato de sódio 0,05M e pH 6,0

Para esse ensaio, utilizaram-se caldos de fermentação com atividade inicial de 111 U/mL (ensaio A) e 50 U/mL (ensaio B) e pela Figura 4.25 pode se observar a cinética de adsorção para cada concentração inicial de inulinase. Verifica-se que após 50 minutos, atingiu-se o equilíbrio de adsorção das amostras de diferentes concentrações de inulinase.



Figura 4.25: Curvas das cinéticas de adsorção da inulinase do caldo bruto clarificado diluído em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 e temperatura de 25°C em resina Streamline-DEAE.

4.4.3.2 Cinética de adsorção da inulinase na resina Streamline DEAE equilibrada em tampão tris-HCl 0,05 M e pH 7,5

A Figura 4.26 ilustra que a adsorção da inulinase utilizando-se caldos de fermentação com atividade inicial de 45 U/mL (ensaio A), 108 U/mL (ensaio B) e 200U/mL (ensaio C), atingindo o equilíbrio após um tempo de aproximadamente 50 minutos. O comportamento da cinética de adsorção foi semelhante quando foi utilizada a solução tampão fosfato de sódio.



Figura 4.26: Curvas cinéticas de adsorção da inulinase do caldo bruto clarificado diluído em tampão Tris-HCl, pH 7,5 e 0,05 M a 25°C, em resina Streamline DEAE.

4.4.4 - Isoterma de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE

4.4.4.1 – Isoterma de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada em tampão Fosfato 0,05 M e pH 6,0

Realizando os experimentos para obtenção das isotermas seguindo a metodologia descrita no item 3.3.3, obteve-se os valores de atividade inicial (C_o), de atividade em solução no equilíbrio (C^*) e atividade adsorvida por mL de resina (Q^*) conforme Tabela 4.29. Pela Figura 4.27, verifica-se que modelo de Langmuir se ajusta a isoterma de adsorção, construindo-se então a figura 1/ Q^* versus 1/ C^* (Figura 4.28), obtêm-se a capacidade máxima de adsorção (Qm) igual 1.428 U/mL de resina e a constante de dissociação (kd) de 2 U/mL, com coeficiente de correlação igual a 0,96.

Amostra	Со	C*(U/mL)	Q*(U/mL de resina)
1	50,46	7,85	1.131,52
2	50,46	6,4	1.174,48
3	45,41	7,31	1.012,07
4	45,41	5,69	1.058,95
5	40,37	4,44	959,32
6	40,37	4,47	958,45
7	35,32	2,79	870,99
8	35,32	3,5	850,45
9	30,28	1,71	766,44
10	30,28	1,79	764,12
11	25,23	1,3	642,23
12	25,23	1,31	641,94
13	20,18	1,11	511,65
14	20,18	1,21	508,75
15	15,14	0,74	386,55
16	14,14	0,74	386,55

 Tabela 4.29 - Adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE.



Figura 4.27: Adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE em tampão fosfato pH 6,0 e 0,05M.



Figura 4.28: Gráfico 1/Q* versus 1/C* para determinação da capacidade máxima de adsorção (Qm) e a constante de dissociação (kd)

4.4.4.2 Isoterma de adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada em tampão tris-HCl 0,05M e pH 7,5

Seguindo o mesmo procedimento do item 4.4.4.1, a partir dos valores de atividade inicial (C_o), de atividade em solução no equilíbrio (C^*) e atividade adsorvida por mL de resina (Q^*) listados na Tabela 4.30, foi obtida a isoterma de adsorção em tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,5 (Figura 4.29). Considerando que o modelo de Langmuir se ajusta a isoterma, construiu-se o gráfico 1/ Q^* versus 1/ C^* (Figura 4.30) e o valor de Qm obtido é igual a 5.000 U/mL de resina e kd 0,05 U/mL, com um coeficiente de correlação de 0,99.

Amostra	Co	C*(U/mL)	Q*(U/mL de resina)
1	186,84	19,26	4477,22
2	186,84	17,64	4524,11
3	174,71	9,59	4430,22
4	174,71	8,84	4451,92
5	168,1	2,7	4451,92
6	168,1	2,29	4463,37
7	154,57	0,92	4138,43
8	154,57	0,92	4138,43
9	137,51	0,21	3699,28
10	137,51	0,09	3702,75
11	103,34	0,08	2782,29

Tabela 4.30 - Adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada em tampão tris-HCl 0,05 M e pH 7,5.



Figura 4.29: Adsorção de inulinase pela resina Streamline DEAE em tampão Tris-HCl.



Figura 4.30: Linearização dos dados 1/Q* e 1/C* para determinação da capacidade máxima de adsorção (Qm) e constante de dissociação (kd).

Os valores de Qm obtidos pela resina Streamline DEAE foram superiores aos valores obtido por Kalil (2000), Qm igual a 1.254 U/mL, para uma resina catiônica Streamline SP e tampão acetato pH 3,5 0,02M.

Foram calculados os valores de k1 e k2 pelo método numérico Hooke-Jeeves e quasi-Newton utilizando o programa STATISTICA versão 5.5. Esses parâmetros estão listados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31 – 1	Valores dos parâr	netros cinétic	os de adsorçã	o da inulinase	em resina
Streamline DEAE equ	ilibrada em tampã	ão fosfato de	sódio e tampã	ío Tris-HCl, e	em resina
Streamline SP em tam	pão acetato de sód	lio.			

Tampão	Kd	k1	k2	Qm
	U/mL			(U/mL)
Fosfato	2	1.10^{-6}	2.10^{-6}	1428
Tris-HCl	0,05	5.10^{-6}	3.10^{-6}	5000
Acetato*	0,32	6.10^{-3}	2.10^{-3}	1254

*Dado obtido por KALIL (2000) para a resina Streamline SP e a enzima em solução tampão Acetato de sódio

4.5 - Purificação da inulinase em resina Streamline DEAE em leito fixo

As purificações da inulinase em leito fixo com resina Streamline DEAE foram realizadas no sistema FPLC (da Pharmacia), utilizando-se uma coluna XK 16 com 20 mL de resina Streamline DEAE. Nesta etapa do trabalho procurou-se conhecer a real capacidade de adsorção e eluição utilizando os dois tipos de tampão em estudo. Nas Tabelas 4.32 e 4.33 estão listados as condições e resultados das purificações que serão discutidos sepaadamente. Nos ensaios 3, 4 e 5 foi utilizado o tampão tris-HCl para equilibrar a coluna e eluir a enzima com gradiente salino. Foram testados diferentes valores de pH e concentração molar do tampão, mas não se obteve recuperação e fator de purificação (FP) satisfatórios, resultado diferente do esperado, uma vez que em tampão tris-HCL, apresentou uma capacidade de adsorção muito maior que em solução tampão de fosfato de sódio.

Tabela 4.32– Condições de purificação da inulinase em resina Streamline DEAE em leito fixo.

ensaio	tampão	pН	Μ	Volume	% rec.		
				Injetado			
1	Fosfato	6,0	0,05	30mL	24,6		
2	Fosfato	6,0	0,05	10mL	79		
3	Tris-HCl	7,5	0,02	10mL	28		
4	Tris-HCl	7,5	0,05	15mL	22		
5	Tris-HCl	6,5	0,02	10mL	38		
		atividade	atividade	Proteína	Atividade		
--------	-----------	-----------	-----------	----------	-------------	-------	--------
ensaio	Fração	(U/mL)	total (U)	(mg/mL)	esp. (U/mg)	FP	% rec.
2	Caldo	510	5102	10,01	50,97	1	
	Fração 23	406	4056	0,7	579,43	11,37	79
3	Caldo	570	5700	10,7	53,24	1	
	Fração 20	108	1082	0,77	140,73	2,64	19
4	Caldo	370	5555	8,49	127,35	1	
	Fração 18	110	1102	1,75	17,5	1,44	20
5	Caldo	549	5488	11,3	48,56	1	
	Fração 21	132	1317	7,7	171,10	3,52	24

Tabela 4.33 –Purificação da inulinase em resina Streamline DEAE através dos ensaios 2 a 5.

A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 0,05 M. Considerando a capacidade de adsorção da resina (~28.000 U), foi injetado na coluna 30 mL de caldo bruto e clarificado com 510 U/mL totalizando 15.300 U.

Apesar de ter sido injetado uma quantidade de enzima bem abaixo da capacidade de adsorção da resina, muita enzima foi eliminada na etapa de lavagem (frações 3 e 4) e pouca enzima foi recuperada (aproximadamente 25%) na eluição com o gradiente salino.

Ensaio 2

Foram utilizadas as mesmas condições do ensaio 1, sendo injetado 10 mL de caldo bruto clarificado com 510 U/mL totalizando 5.100 U. A perda da enzima na etapa de lavagem foi bem menor que no experimento anterior como pode ser observado no cromatograma da Figura 4.31. O fator de purificação (FP) foi calculado de acordo com a Tabela 4.33, onde a fração 23 corresponde a 79% de recuperação da enzima que foi introduzida na coluna, e com um fator de purificação de 11 vezes, sendo eluida com 0,4 M de NaCl.



Figura 4.31 – Cromatograma da purificação da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada com tampão fosfato pH 6,0 e 0,05M, em leito fixo.

A Figura 4.32 apresenta o cromatograma da purificação da inulinase em leito fixo, resina Streamline DEAE equilibrada em tampão tris-HCl (0,02M e pH 7,5), e os resultados de recuperação e fator de purificação pode ser observado na Tabela 4.33. A recuperação da enzima foi de 19% na fração 20 e fator de purificação foi de 2,6 vezes.



Figura 4.32 – Cromatograma da purificação da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada em tampão tris-HCl em coluna de leito fixo.

Purificação da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada em tampão tris-HCl (0,05M e pH 7,5), o volume de amostra foi de 15mL com 370 U/mL totalizando 5.555 U. A recuperação da enzima na eluição foi semelhante ao resultado anterior, e o fator de purificação foi menor. A recuperação foi 20% na fração 18 com um fator de purificação de 1,4 vezes.

Ensaio 5

Na purificação da inulinase em resina Streamline DEAE equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M e pH 6,5, a recuperação e o fator de purificação foi um pouco melhor em relação ao resultado do ensaio 4, mas inferior ao resultado obtido com o tampão fosfato de sódio. Nesta purificação a recuperação foi 24% na fração 21 com um fator de purificação de 3,5 vezes.

Após 5 purificações usando leito fixo, pôde-se considerar que a resina equilibrada em tampão fosfato nas condições do ensaio 2 proporcionou melhores resultados, com 79% de recuperação e um fator de purificação de 11 vezes. O baixo rendimeto para os ensaios com altos valores de pH pode ser devido à desnaturação da enzima pelo efeito Donnan, onde o pH nas vizinhanças de uma resina aniônica pode aumentar de aproximadamente 1 unidade, o que significa um pH real próximo de 8,5, valor este que pode ter sido prejudicial para a enzima (Scopes, 1988).

4.6 Ensaios preliminares no estudo de purificação da inulinase em resina Streamline DEAE em leito expandido

Antes de seguir com a purificação em leito expandido foram realizados estudos de comportamento hidrodinâmico, e também a determinação do expoente de Richardson-Zaki e velocidade terminal. Os procedimentos para determinação destes parâmetros foram realizados segundo a metodologia desenvolvida por Kalil (2000), cujos resultados estão sendo ilustrados na Figura 4.33. Pode-se observar que a expansão do leito com o meio industrial, mesmo a um fluxo baixo foi superior em relação às outras soluções testadas. O

meio sintético não apresentou expansão muito elevada quando comparada com a expansão ao passar tampões na coluna. A variação de temperatura de 5°C para 25°C praticamente não alterou a expansão do leito.



* dados obtidos por KALIL (2000)

Figura 4.33- Altura de expansão do leito em função da velocidade superficial no estudo da purificação de inulinase em leito expandido.

Construindo o gráfico (Figura 4.34) de ln U em função de ln ε , onde U é a velocidade superficial em cm/min e ε é a porosidade do leito, para a porosidade de 0,4 para o leito fixo, encontramos o coeficiente angular correspondendo ao expoente de Richardson-Zaki (n) e o coeficiente linear para a velocidade terminal.



Figura 4.34 – Gráfico de Ln U versus Ln da porosidade.

Os valores do expoente de Richardson-Zaki para a resina Streamline SP determinados por Kalil (2000), e para a resina Streamline DEAE estão listados na tabela 4.34, e pode se dizer que os valores obtidos para o tampão fosfato, tampão acetato e o meio sintético estão bem próximos. O meio industrial apresentou velocidade terminal bem abaixo comparando com os outros resultados. Esse fato pode ter ocorrido devido a presença de impurezas das soluções de melaço e água de maceração de milho, pois o meio sintético mesmo com a presença de células não apresentou queda na velocidade terminal.

Resina	U _t cm/min	Expoente de
		Richardson-Zaki
Streamline DEAE em tampão	15,80	4,56
fosfato 0,05M pH 6,0 a 25°C		
Streamline DEAE em tampão	16,44	4,99
fosfato 0,05M pH 6,0 a 5°C		
Streamline DEAE em meio	5,75	3,94
industrial a 25°C		
*Streamline SP em tampão	19,8	5,4
acetato 0,02M pH 3,5 a 25°C		
* Streamline SP em meio	17,6	5,3
sintético 25°C		

Tabela 4.34 – valores do expoente de Richardson-Zaki e velocidade terminal no estudo de purificação de inulinase em leito expandido.

* dados obtidos por Kalil (2000)

Nos ensaios preliminares, a coluna Streamline 25 da Pharmacia foi empacotada com 50 mL de resina Streamline DEAE, inicialmente sendo utilizadas as condições de fluxo estabelecidas por Kalil (2000) como descrito no item 3.5.3. Os testes apresentados neste item tiveram como principal objetivo verificar a capacidade da resina em adsorver a enzima e eluir, em frações concentradas de enzima, com fator de purificação dentro do valor esperado para uma cromatografia de troca iônica, isto é , resultados próximos aos obtidos por Kalil (2000).

Nos primeiros testes os resultados não foram satisfatórios. Verificou-se que os precipitados presentes (células e impurezas) no meio industrial prejudicaram a obtenção de

frações purificadas da enzima de interesse. Em conseqüência da dificuldade de operar a coluna injetando caldo fermentado com meio industrial, foram realizados outros experimentos clarificando o caldo por centrifugação antes da alimentação na coluna. Observou-se que utilizando o tampão fosfato em um dos testes obteve-se 63% de recuperação da enzima e fator de purificação de 14 vezes. O teste com o tampão tris-HCl (ensaio 4) não foi satisfatório, comprovando o resultado obtido em coluna de leito fixo.

Nos ensaios 6 a 9 procurou-se encontrar altenativas para a realização da purificação utilizando o meio bruto sem a necessidade de tratamentos prévios, pois a proposta de se utilizar o leito expandido foi exatamente para eliminar etapas no processo de obtenção da enzima pura. Foram realizados testes utilizando resina Streamline SP e testes com meio de cultivo sintético otimizado por Kalil (2000) para produção de inulinase.

Na Tabela 4.35 estão resumidas as condições em que foram realizados os ensaios preliminares de purificação da inulinase no leito expandido, que será discutido, isoladamente, a seguir.

ensaio	meio	Resina	Tipo de	Volume de	tampão	pН
			eluição	meio		
1	Industrial	Streamline	degrau	100 mL	Fosfato de	6,0
	com células	DEAE		sem diluição	sódio 0,05 M	
2	Industrial	Streamline	degrau	300 mL	Fosfato de	6,0
	com células	DEAE		diluição 1:3	sódio 0,05 M	
3	Industrial com	Streamline	gradiente	600 mL	Fosfato de	5,2
	células	DEAE		diluição 1:7,5	sódio 0,05 M	
4	Industrial	Streamline	gradiente	600 mL	Tris-HCl	7,5
	sem células	DEAE		diluição 1:6	0,05 M	
5	Industrial sem	Streamline	gradiente	600 mL	Fosfato de	6,0
	células	DEAE		diluição 1:6	sódio 0,05 M	
6	industrial	Streamline	degrau	100 mL	Fosfato de	6,0
	com células	SP		sem diluição	sódio 0,02 M	
7	sintético	Streamline	degrau	250 mL	Fosfato de	6,0
	Com células	DEAE		sem diluição	sódio 0,02 M	
8	Industrial	Streamline	Gradiente	300 mL	Fosfato de	6,0
	com células	DEAE	FPLC	sem diluição	sódio 0,02 M	
9	Industrial com	Streamline	Gradiente	300 mL	Fosfato de	6,0
	células	DEAE	FPLC	sem diluição	sódio 0,02 M	

 Tabela 4.35
 Condições em que foram realizados os ensaios de purificação de inulinase no leito expandido.

Na Tabela 4.36 estão apresentados os resultados de recuperação e fator de purificação da enzima.

ensaio	fração	Volume	Atividade	Proteína	U/mg	FP	Rec %
		(mL)	(U/mL)	(mg/mL)			
1	Caldo	100	591	-	-	-	-
	2	50	43	-	-	-	4
	3	50	64	-	-	-	5
2	Caldo	300	217	3,81	56,99	1	
	3	50	72	0,18	402,33	7,06	5,5
	4	50	82	0,38	215,53	3,78	6,3
3	Caldo	600	108	1,47	73,68	1	
	16	50	784	1,04	754,26	10,24	60,4
4	Caldo	600	162	2,79	58,23	1	
	17	50	882	1,51	584,13	10,03	45,2
	18	50	409	1,86	219,75	3,77	21,0
5	Caldo	600	72	1,84	39,25	1	
	14	50	549	0,98	560,58	14,28	63,4
6	Caldo	100	864	11,18	77,30	1	
	2	50	307	1,32	231,63	2,99	17,7
7	Caldo	250	396	9,96	39,77	1	
	3	50	908	4,33	209,8	5,27	46
8	Caldo	300	77	12,45	6,19	1	
	10	15	23	0,32	71,53	11,5	1,52
	11	15	49	2,63	18,60	3	3,17
9	Caldo	300	91	9,89	9,24	1	
	13	15	46	1,27	36,64	3,98	2,54

Tabela 4.36Resultados dos 9 ensaios preliminares de purificação da inulinaserealizados em leito expandido.

Ensaio 1

A coluna foi alimentada com 100 mL de caldo fermentado com células e com 591 U/mL de atividade, a coluna foi lavada com 600 mL de tampão, a eluição foi realizada na forma de degrau (0,1 M, 0,4 M e 0,5 M), e as condições de fluxo foram as mesmas definidas por Kalil (2000) utilizando a resina catiônica Streamline SP. Os resultados da purificação estão listados na Tabela 4.37.

-	Volume (mL)	Atividade	NaCl	Volume (mL)	Atividade	NaCl
_		(U/mL)	(M)		(U/mL)	(M)
	0	591	0	900	31	0,4
	100	100	0	950	6	0,4
	200	114	0	1000	2	0,4
	300	20	0	1050	1,5	0,5
	400	3	0	1100	1	0,5
	500	0	0	1150	0	0,5
	600	0	0	1200	0	0,5
	650	0	0,1	1250	0	0,5
	700	43	0,1	1300	0	0,5
	750	64	0,1	1400	0	0,5
	800	22	0,1	1450	0	0,5
	850	9	0,4			

Tabela 4.37 – Resultados do ensaio 1 de purificação da inulinase em leito expandido.

Após a alimentação as células não foram totalmente removidas durante o processo de lavagem da coluna com tampão, e parte da enzima não foi adsorvida na resina, sendo perdida 40 % da enzima alimentada e, na eluição com diferentes molaridades da solução salina foram recuperadas 15 % da enzima sendo 11% somente na concentração de 0,1 M de NaCl, o que difere do resultado obtido na coluna de leito fixo, onde a eluição ocorreu na concentração salina de 0,4 M.

Ensaio 2

Neste ensaio o caldo bruto de fermentação bruto foi diluído com tampão para diminuir a viscosidade do meio devido presença de impurezas. Segundo Santos (2001), uma concentração de 5% de células é suficiente para alterar a hidrodinâmica do leito prejudicando a purificação. Apesar do meio de cultivo industrial, após 72 horas de fermentação, conter ao redor de 2% de massa seca. O resultado da purificação foi melhor com o caldo diluído.

Volume	Atividade	Abs	Volume coletado	Atividade	Abs
coletado(mL)	(U/mL)	(280nm)	(mL)	(U/mL)	(280nm)
50	0	0	1250	0	0
100	0	0	1300	0	0
150	0	0	1350	0	0,4231
200	0	0	1400	0	0,3443
250	0	0	1450	0	0,3443
300	0	0	1500	72,42	1,0763
350	0	0	1550	81,9	1,753
400	0	0	1600	48,22	1,7019
450	0	0	1650	32,8	1,6561
500	0	0	1700	14,38	1,5422
550	0	0	1750	46,74	2,054
600	0	0	1800	17,03	1,7019
650	0	0	1850	5,56	2,054
700	0	0	1900	3,11	2,054
750	0	0	1950	1,98	2,1793
800	0	0	2000	1,38	2,3551
850	0	0	2050	0,66	1,5769
900	0	0	2100	0	1,6561
950	0	0	2150	0	1,5769
1000	0	0	2200	0	1,2089
1050	0	0	2250	0	0,8852
1100	0	0	2300	0	0,6108
1150	0	0	2350	0	0,5194
1200	0	0	2400	0	0,4658

Tabela 4.38 - Resultados do ensaio 2 de purificação da inulinase em leito expandido.

As atividades foram medidas apenas nas frações de eluição onde apresentaram hidrólise da sacarose. As frações em que foram eluídas com solução tampão contendo NaCl 0,5 M não apresentaram hidrólise.

Somando as atividades das doze frações (Tabela 4.38), a recuperação em relação quantidade da enzima alimentada é de 25%, e as duas frações com as melhores atividades somam 12% de recuperação. Na fração 3, na etapa de eluição, o fator de purificação foi de 7,0. As frações com atividades altas foram eluídas com 0,1 M de NaCl (Figura 3.35), valores baixos quando comparados com resultados obtidos por Kalil (2000) na purificação

de inulinase utilizando resina Streamline SP, que obteve 74% de recuperação e fator de purificação de 10,4 vezes.



Figura 4.35 – Cromatograma do ensaio 2 de purificação da inulinase em leito expandido.

Ensaio 3

Neste ensaio a eluição na forma de degrau foi substituída pelo gradiente salino descrito na metodologia, o fator de diluição passou de 3 para 7,5 diminuindo o pH para 5,2. Utilizou-se uma resina nova pois nos ensaios anteriores a resina não ficou livre das impurezas somente com a limpeza e regeneração realizada na coluna, sendo necessário empacotar a coluna novamente. Os resultados foram bastante animadores como pode ser observado na Tabela 4.39.

Volume (mL)	Atividade	NaCl	Volume (mL)	Atividade	NaCl
	(U/mL)	(M)		(U/mL)	(M)
100	0	0	1500	142,07	0,285
200	0	0	1550	29,44	0,3509
300	0	0	1600	14,87	0,4218
400	0	0	1650	4,25	0,4731
500	0	0	1700	2,31	0,5304
600	0	0	1750	0	0,5834
700	0	0	1800	0	0,6304
800	0	0	1850	0	0,6789
900	0	0	1900	0	0,722
1000	0	0	1950	0	0,762
1100	0	0	2000	0	0,7995
1200	0	0	2050	0	0,8334
1300	0	0	2100	0	0,8640
1350	3,64	0,0613	2150	0	0,892
1400	31,45	0,138	2200	0	0,9146
1450	784,43	0,2151	2250	0	0,939
	Volume (mL) 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1350 1400 1450	Volume (mL)Atividade (U/mL) 10002000300040005000600070008000900010000110001300013503,64140031,451450784,43	Volume (mL)Atividade (U/mL) NaCl (M) 1000020000300003000040000500006000070000800009000011000013000013503,640,0613140031,450,1381450784,430,2151	Volume (mL)Atividade (U/mL) NaCl (M) Volume (mL) (M) 10000150020000155030000160040000165050000170060000175070000180080000190010000019501100002000120000210013503,640,06132150140031,450,13822001450784,430,21512250	Volume (mL) Atividade (U/mL) NaCl (M) Volume (mL) Atividade (U/mL) 100 0 0 1500 142,07 200 0 0 1550 29,44 300 0 0 1600 14,87 400 0 0 1650 4,25 500 0 0 1700 2,31 600 0 0 1800 0 700 0 0 1850 0 900 0 0 1900 0 1100 0 0 2000 0 1100 0 0 2000 0 1100 0 0 2000 0 1100 0 0 2000 0 1350 3,64 0,0613 2150 0 1400 31,45 0,138 2200 0

Tabela 4.39– Resultados do ensaio 3 de purificação da inulinase em leito expandido.

Foram recuperadas 78% da enzima em 8 frações em que apresentaram atividade de hidrólise, sendo que a fração 16 continha 60% da enzima que foi introduzida na coluna.

No ensaio anterior como foi utilizado o caldo bruto com células, a coluna foi desempacotada para retirar as impurezas retidas na resina ao longo do leito. E a regeneração foi realizada em reator com agitação.

Ensaio 4

Neste ensaio foi testada a purificação no leito expandido utilizando o tampão tris-HCl. Os resultados deste ensaio foram melhores do que o esperado, apresentando recuperação da enzima na etapa de eluição foi de 66% (Tabela 4.40), sendo que a fração 17 continha 45% da enzima introduzida na coluna com um fator de purificação de 10 vezes. A Figura 4.36 ilustra o cromatograma com o gradiente salino, e observa-se a eluição da enzima ocorre ao redor de 0,1 M de NaCl.

Volume	Atividade	Abs	Volume	Atividade	Abs
(mL)	(U/mL)	(280nm)	(mL)	(U/mL)	(280nm)
50	0	0,0228	1150	0	1,1544
100	0	0,0197	1200	0	1,0161
150	0	0,0595	1250	0	0,9121
200	0	1,6534	1300	0	0,47
250	0	3,0304	1350	0	0,4612
300	0	3,2856	1400	0	0,4806
350	0	3,0815	1450	0	0,5358
400	0	3,3826	1500	882,07	3,3271
450	0	3,2065	1550	408,74	3,6282
500	0	3,1189	1600	47,9	3,4063
550	0	3,1769	1650	15,49	3,4063
600	0,28	3,151	1700	3,92	3,5032
650	1,115	3,1053	1750	2,05	3,2602
700	6,52	3,3271	1800	0,897	3,3271
750	6,52	3,151	1850	0	2,7831
800	1,77	3,3271	1900	0	2,0225
850	0,31	3,4063	1950	0	1,4668
900	0	3,2022	2000	0	1,1027
950	0	2,5371	2050	0	0,8486
1000	0	1,9321	2100	0	0,6674
1050	0	1,549	2150	0	0,5194
1100	0	1,308	2200	0	0,4246
	Volume (mL) 50 100 150 200 250 300 350 400 450 550 600 650 700 750 800 850 900 950 1000 1050 1100	$\begin{array}{c ccc} Volume & Atividade \\ (mL) & (U/mL) \\ \hline 50 & 0 \\ 100 & 0 \\ 150 & 0 \\ 200 & 0 \\ 250 & 0 \\ 300 & 0 \\ 350 & 0 \\ 400 & 0 \\ 450 & 0 \\ 550 & 0 \\ 500 & 0 \\ 550 & 0 \\ 600 & 0,28 \\ 650 & 1,115 \\ 700 & 6,52 \\ 750 & 6,52 \\ 800 & 1,77 \\ 850 & 0,31 \\ 900 & 0 \\ 950 & 0 \\ 1000 & 0 \\ 1050 & 0 \\ 1100 & 0 \\ \end{array}$	$\begin{array}{c ccccc} Volume & Atividade & Abs \\ (mL) & (U/mL) & (280nm) \\ \hline 50 & 0 & 0,0228 \\ 100 & 0 & 0,0197 \\ 150 & 0 & 0,0595 \\ 200 & 0 & 1,6534 \\ 250 & 0 & 3,0304 \\ 300 & 0 & 3,2856 \\ 350 & 0 & 3,0815 \\ 400 & 0 & 3,3826 \\ 450 & 0 & 3,2065 \\ 500 & 0 & 3,1189 \\ 550 & 0 & 3,1769 \\ 600 & 0,28 & 3,151 \\ 650 & 1,115 & 3,1053 \\ 700 & 6,52 & 3,3271 \\ 750 & 6,52 & 3,3271 \\ 800 & 1,77 & 3,3271 \\ 850 & 0,31 & 3,4063 \\ 900 & 0 & 3,2022 \\ 950 & 0 & 2,5371 \\ 1000 & 0 & 1,9321 \\ 1050 & 0 & 1,549 \\ 1100 & 0 & 1,308 \\ \end{array}$	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$

Tabela 4.40 – Resultados do ensaio 4 de purificação da inulinase em leito expandido.



Figura 4.36 – Cromatograma do ensaio 4 de purificação da inulinase em leito expandido.

Foi realizada uma purificação semelhante ao ensaio 3, utilizando o caldo clarificado por centrifugação. A coluna foi equilibrada com o tampão fosfato 0,05M pH 6,0. A eluição foi realizada com gradiente salino.

Nas frações que apresentaram atividade de hidrólise foram recuperadas 77% (tabela 4.41) da enzima alimentada sendo que a fração 14 continha 63%, resultado próximo do que foi obtido no ensaio 3 e com um maior fator de pureza (14,3). Pode-se observar no cromatograma um pico com alta concentração de enzima (Figura 3.37).

Tabela 4.41 - Resultados do ensaio 5 de purificação da inulinase em leitoexpandido.

	Atividade	Abs		Atividade	Abs
Volume (mL)	(U/mL)	(280nm)	Volume (mL)	(U/mL)	(280nm)
50	0	0,0064	1000	2,53	2,1038
100	0	0,006	1050	0	1,6668
150	0	0,3485	1100	0	1,3857
200	0	1,7322	1150	0	1,1809
250	0	3,0332	1200	0	0,4969
300	0	3,3343	1250	29,38	0,7231
350	2,89	3,8114	1300	549,37	3,0332
400	4,73	3,2093	1350	72,6	3,4134
450	6,98	3,1582	1400	11,38	3,2093
500	5,1	3,1124	1450	2,8	3,3343
550	5,98	3,0332	1500	1,23	3,2093
600	10,15	3,5103	1550	0	3,1582
650	23,81	3,3343	1600	0	3,071
700	7,68	3,1582	1650	0	3,1124
750	8,75	3,1582	1700	0	2,681
800	8,07	3,2093	1750	0	2,0954
850	8,26	3,2673	1800	0	1,6353
900	4,15	3,0332	1850	0	1,2857
950	1,89	2,65	1900	0	0,958



Figura 4.37 – Cromatograma do ensaio 5 de purificação da inulinase em leito expandido.

Ao purificar inulinase obtido pela fermentação de *K. marxianus* NRRL Y-7571 no meio de cultivo industrial, parte dos precipitados presentes no meio após a fermentação não foram eliminados na etapa de lavagem prejudicando a recuperação da enzima. Com objetivo de solucionar este problema foram realizados os ensaio 6, 7, 8 e 9. No ensaio 6 foi utilizada a resina streamline SP, onde o pH de operação é baixo de 3,5 a 4,1. A coluna foi equilibrada com tampão acetato pH 3,5 e após a alimentação do caldo o tampão utilizado na lavagem e eluição foi com pH 4,1. O meio industrial fermentado apresentou uma atividade de 864 U/mL, foi injetado 100 mL de caldo, a vazão de alimentação e lavagem foi de 200 cm/h. A eluição foi realizada com solução tampão contendo NaCl 0,5 M, e foram coletadas amostras de 50 mL na eluição. A recuperação foi de 18% e o fator de purificação foi de 3. Os resultados não foram satisfatórios e o problema das impurezas permanecerem na coluna após a lavagem persistiu.

Neste ensaio foi utilizado a inulinase produzida em meio de cultivo sintético otimizado por Kalil (2000). A inulinase do caldo de fermentação foi purificada em resina Streamline DEAE. A inulinase do caldo de fermentação do meio de cultivo sintético apresentou atividade de 396 U/mL, sendo utilizado 250 mL do caldo para alimentar a coluna, durante a fermentação observou-se que não ocorreu a floculação e as células permaneceram em suspensão mesmo com o meio em repouso, enquanto que o caldo obtido pela fermentação do meio de cultivo industrial apresentou floculação com formação de precipitado em poucos minutos de repouso. A eluição foi realizada com solução tampão contendo NaCl 0,5 M. Neste ensaio a recuperação foi de 46% e o fator de purificação foi de 5,3. Este resultado foi melhor que obtido no ensaio 6, mas continuou abaixo dos valores obtidos por Kalil (2000).

O meio sintético não apresentou problemas de retenção de precipitados na resina, e na lavagem apresentou um pouco de dificuldade ao acumular massa celular na peneira de retenção no topo da coluna. Ao agitar o êmbolo a massa celular se desprendia e deixava alguns fragmentos no meio do leito.

Ensaio 8

Neste ensaio, a alimentação da coluna e a lavagem foram realizadas como nos outros ensaios, mas na etapa da eluição a coluna foi acoplada ao sistema FPLC, que permitiu programar a eluição com diferentes volumes do gradiente salino e realizar a coleta automática das frações. A fase de alimentação não foi realizada no FPLC por utilizar o caldo contendo células e impurezas da fermentação, podendo causar entupimentos nas mangueiras das bombas e do equipamento para a leitura de UV.

A coluna foi alimentada com 300 mL de meio bruto e com presença de células, durante a alimentação e lavagem foram coletados amostras de 100 mL. Na tentativa de eliminar os precipitados, durante a etapa de lavagem a vazão foi aumentada gradativamente de 200 cm/h até 450 cm/h como pode ser observado na Tabela 4.42, e a eluição foi realizada com 50 cm/h, mesmo assim ainda verificou-se a presença de células no leito da

coluna. Na etapa da eluição foram coletadas frações de 15mL, e as atividades foram medidas somente nas frações que apresentaram hidrólise de sacarose.

Volume	Vazão	Altura	Ativ.	Volume	Vazão	Altura	Ativ.
(mL)	(cm/mL)	(cm)	(U/mL)	(mL)	(cm/mL)	(cm)	(U/mL)
100	200	22	0	1730	50	10	0
200	200	31,5	40,23	1745	50	10	0
300	200	36	80,26	1760	50	10	0
400	200	37,5	74,86	1775	50	10	0
500	200	33	38,43	1790	50	10	0
600	200	31	15,06	1805	50	10	0
700	250	34	0	1820	50	10	0
800	300	36	0	1835	50	10	0
900	350	38,8	0	1850	50	10	23,15
1000	400	41	0	1865	50	10	48,94
1100	400	41	0	1880	50	10	26,72
1200	450	37,5	0	1895	50	10	14,96
1300	450	37,0	0	1910	50	10	9,06
1400	450	37	0	1925	50	10	5,30
1500	450	37	0	1940	50	10	0
1600	450	37	0	1955	50	10	0
1700	450	37	0	1970	50	10	0
1715	50	10	0	1985	50	10	0

Tabela 4.42– Resultados da purificação variando a vazão na etapa de lavagem com tampão.

A fração 10 que corresponde ao volume 1865mL da Tabela 4.42 apresentou um bom fator de purificação 11,5 vezes, mas a recuperação de 1,52% da enzima introduzida na coluna foi bem baixa. A fração 11 que corresponde ao volume de 1.880 mL, apresenta recuperação melhor 3,17%, mas o fator de pureza foi de apenas 3 vezes.

Ensaio 9

O meio industrial fermentado apresenta células floculantes e decanta rapidamente quando o meio está em repouso, para diminuir a concentração de precipitados o meio ficou 24 horas em repouso sendo coletado o sobrenadante. A coluna foi alimentada com 300mL do sobrenadante. A vazão de 200 cm/h foi constante durante toda a etapa de alimentação e lavagem. Mesmo diminuindo bastante os precipitados, foi observada a formação de flocos ao longo do leito durante a alimentação e após a lavagem com volume maior (900 mL) de tampão não foi suficiente para eliminar as impurezas que ficaram retidas na resina. A enzima foi eluida com gradiente salino e obteve uma fração com 2,5% de recuperação e com fator de pureza de 4 vezes.

Através dos resultados obtidos ensaios preliminares em leito expandido, conclui-se que há uma necessidade de realizar estudos de pré-tratamento para eliminar as impurezas responsáveis pela floculação do meio após a fermentação, tanto no melaço como na água de maceração de milho. Assim verifica-se que o meio industrial pode substituir o meio sintético, resultando num processo economicamente mais viável, mesmo necessitando de tratamento para a retirada de impurezas. No entanto, como o objetivo principal deste trabalho era o estudo da purificação da enzima em leito expandido, decidiu-se prosseguir os estudos de adsorção e eluição da enzima realizando purificações a partir do meio sintético.

O estudo de pré-tratamento do meio de produção, para viabilizar a purificação em leito expandido a partir do meio industrial, está sendo realizado em outro projeto de doutorado do LEB/FEA.

Assim, para dar continuidade aos estudos de otimização da purificação da enzima em leito expandido diretamente do caldo fermentado com células, foi utilizado o meio sintético estudado por Kalil (2000), Santos (2002) e Kabke (2002). Nas figuras 4.38 a 4.40 pode-se observar as diferenças entre o meio industrial e o meio sintético.

A figura 4.38 ilustra as impurezas do meio que ficaram retidas na coluna.

A figura 4.39 compara as diferenças do meio de cultivo sintético e industrial após 72 horas de fermentação, meio 1 corresponde ao meio industrial que após alguns minutos em repouso os precitados estão decantados, e o meio 2 corresponde ao meio sintético em que as células continuam em suspensão após o mesmo tempo de repouso do meio 1.

A figura 4.40 ilustra a alimentação da coluna com o meio sintético e não se observa a presença de impurezas retidas na coluna.

109



Figura 4.38 – Purificação do meio industrial com formação de aglomerações de células que ficam no meio do leito.



Figura 4.39 : Meio industrial (1) e meio sintético (2) após 72 horas de fermentação.



Figura 4.40 Alimentação do leito expandido com o meio sintético.

4.7 Estudo de otimização da purificação da inulinase

As etapas de adsorção e eluição da enzima do processo de purificação foram otimizadas aplicando-se planejamento fatorial como descrito no item 3.6.

Para realizar a otimização das condições de adsorção, foram definidas as variáveis que mais poderiam influenciar na adsorção da enzima durante a alimentação do caldo no leito expandido: pH, a molaridade do tampão fosfato de sódio e o fator de expansão do leito. Assim, foi realizado um planejamento experimental mais 1 ponto central com 4 repetições totalizando 12 ensaios. Nesta etapa, em cada ensaio foi usada resina nova e logo após a purificação foi regenerada e guardada em etanol 20% para os próximos testes.

Vários fatores que podem afetar na recuperação da enzima, sendo que através dos ensaios preliminares as variáveis pH e volume no gradiente salino de 0 a 1 M, foram escolhidas para este estudo. Foi realizado um planejamento experimental, 2 pontos axiais (2 fatores) mais 1 ponto central com 3 repetições, totalizando 11 ensaios.

Foi utilizada a resina regenerada nos ensaios de adsorção, que foi homogeneizada para obter 11 alíquotas de 50 ml de resina com as mesmas características para os ensaios de eluição.

Como a resina pode ser regenerada, a coluna pode ser empacotada uma única vez e após cada ensaio, regenerar a coluna para o próximo ensaio, foi o procedimento utilizado nos testes preliminares. Porém, durante os testes preliminares observou-se que após cada regeneração, para um mesmo fluxo, a expansão do leito diminuía. Observações em microscópio ótico revelam que a resina sofre alterações com a regeneração (figura 4.41), o que pode ter afetado na densidade da resina, sendo necessário um fluxo maior para manter a mesma expansão do leito. Devido as alterações da resina após a regeneração optou-se por utilizar resina nova em cada ensaio na etapa da otimização da adsorção, foi utilizada a resina regenerada uma vez em todos os ensaios da etapa de otimização da dessorção.



Figura 4.41 - micrografias da resina nova (a) e depois de regenerada 5 vezes (b).

4.7.1 Resultado do estudo de otimização da adsorção de inulinase em leito expandido por planejamento experimental

Nesta etapa, a coluna foi alimentada com o caldo bruto obtido da fermentação do meio sintético, que foi diluído até obter uma atividade final próxima de 200 UI/mL com o tampão na condição indicada pelo planejamento, assim como o pH e o fator de expansão (F.E.). Injetou-se aproximadamente 2500 mL do caldo, sendo esse volume em função de capacidade de adsorção da resina que pode chegar à saturação ou não. Foram coletadas amostras de 100 mL e mediu-se a atividade em cada amostra para acompanhar a adsorção

da resina em leito expandido. Os resultados em forma de porcentagem de adsorção, conforme o planejamento experimental, estão listados na Tabela 4.43, e os cálculos de enzima adsorvida na coluna estão apresentadas no anexo C.

Ensaio*	pН	Tampão (M)	F.E.	Enzima adsorvida na resina (%)
1 (2)	5,5	0,02	2,0	87
2 (5)	6,5	0,02	2,0	94
3 (11)	5,5	0,08	2,0	24
4 (7)	6,5	0,08	2,0	19
5 (4)	5,5	0,02	3,0	88
6 (8)	6,5	0,02	3,0	92
7 (10)	5,5	0,08	3,0	17
8 (3)	6,5	0,08	3,0	15
9 (1)	6,0	0,05	2,5	48
10 (9)	6,0	0,05	2,5	70
11 (6)	6,0	0,05	2,5	72
12 (12)	6,0	0,05	2,5	57

Tabela 4.43 – Resultados do planejamento experimental sobre a influência do pH, concentração do tampão fosfato de sódio e fator de expansão para os ensaios de purificação da inulinase em leito expandido.

*Os números entre parênteses correspondem a ordem (aleatória)

em que os ensaios foram realizados.

Em cada ensaio foi calculada a relação da atividade final com a atividade inicial em função do volume coletado, e foi construído um gráfico para cada ensaio. Os resultados que conforme a combinação das condições de pH, concentração de tampão e fator de expansão do leito a porcentagem de enzima adsorvida pode variar de 15 a 94%. Os ensaios com molaridade do tampão igual a 0,08 (ensaios 3, 4, 7 e 8) apresentaram curvas de rupturas completas, e para as molaridades mais baixas (ensaios 1, 2, 3, e 6) apresentaram melhores resultados de adsorção como pode ser observado na Figura 4.42.



Figura 4.42: Relação da atividade final e atividade inicial (A/Ao) em função do volume coletado. (a) tampão 0,02M, (b) tampão 0,4M e (c) tampão 0,8M.

Os ensaios 2 e 6 são os que apresentaram melhores resultados de adsorção, e no ensaio 2 ao passar 2500 mL de meio, a atividade enzimática na solução coletada na saída

da coluna apresentou apenas 5% da atividade inicial. O pH e a concentração do tampão foi o mesmo para os dois ensaios sendo 6,5 e 0,02 M respectivamente, variando apenas no fator de expansão que foi de 2,0 para ensaio 2 e 3,0 para o ensaio 6.

A resposta utilizada para análise dos efeitos das variáveis foi porcentagem da enzima adsorvida na resina, já que em alguns ensaios foi atingida a saturação da resina e em outros a atividade na saída não atingiu a 10% da atividade inicial.

Pelos valores de efeitos (Tabela 4.44) verifica-se que a variação de pH e o fator de expansão na faixa estudada, não foram estatisticamente significativos. No entanto, a concentração molar do tampão apresentou um efeito negativo e estatisticamete significativo a 5%, indicando que o aumento da concentração molar do tampão diminui a quantidade de enzima adsorvida em média de 71% quando a concentração molar passa de 0,02 para 0,08M (Figura 4.43). A melhor condição escolhida para alimentação, foi equilibrar a coluna com tampão fosfato 0,02 M, pH 6,5 e o fator de expansão 2.

Tabela 4.44- Efeito das variáveis do planejamento experimental 2^3 para a otimização da adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE.

variáveis	efeitos	Erro puro	t(3)	р
média	56,92*	3,27*	17,41*	0,0004*
pН	1,00	8,01	0,12	0,9085
Tampão	-71,50*	8,01*	-8,93*	0,0029*
**F.E.	-3,00	8,01	-0,37	0,7328

^{*}efeito significativo a p<0,05

**F.E. = fator de expansão

Ao analisar o planejamento linear verificou-se que apenas a variável concentração molar do tampão (M) apresentou ser significativa dentro da faixa estudada.

Foi possível obter um modelo (Equação 4.15) de 1^ª ordem validado pela ANOVA (Tabela 4.45) onde o coeficiete de correlação foi igual a 0,97 e o F calculado 34 vezes superior ao tabelado.

% de enzima adsorvida = 56,92-35,75M (Equação 4.15)

Tabela 4.45	Tabela ANOVA	para a análise	da resposta o	de porcentagem	da inulinase
adsorvida na coluna	de Streamline D	EAE a 5% de s	ignificância		

Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	*F _{calc}
Regressão	10224	1	10224	169,55
**Resíduo	603	10	60,3	
Falta de ajuste	218	7		
Erro puro	385	3		
Total	10827	11		
R = 0,97				

F_{0,95;1;10}=4,96

 $*F_{calc} = F$ calculado

**Resíduo= falta de ajuste + erro puro

A melhor condição para a alimentação da coluna foi a do ensaio 2 com tampão fosfato 0,02 M pH 6,5, e o fator de expansão 2 como pode ser observado na Figura 4.42.



Figura 4.43- Relação da porcentagem de inulinase adsorvida em função da concentração do tampão fosfato (M).

Foi construída uma curva de ruptura completa (Figura 4.44), para verificar a capacidade máxima de adsorção da inulinase pela resina Streamline DEAE na condição do ensaio 2. Os resultados utilizados na construção do gráfico podem ser conferidos na tabela C4 do anexo C. A saturação da coluna ocorreu quando foi passado 7800 mL de caldo com atividade inicial de 223 U/mL. A coluna empacotada com 50 mL de resina adsorveu

1131373 U de inulinase, o que significa uma adsorção de 22627 U/mL, valor 16 vezes superior a Qm=1428 U/mL estimado pela construção de isoterma no item 4.4.4.1.



Figura 4.44: Curva de ruptura completa utilizando a solução de tampão fosfato 0,02M, pH 6,5 e fator de expansão 2.

KALIL (2000) trabalhando com a resina catiônica Streamline SP também observou um aumento de 4 vezes no valor de adsorção na coluna de leito expandido, do que o Qm (1254 U/mL) encontrado nos testes de batelada. Esse mesmo autor cita que BATT et al. (1995) também constatou um aumento de 75% de adsorção obtido no leito expandido em relação aos testes de batelada. Segundo os autores o sistema de mistura em batelada é um processo de um estágio que requer mais resina e maior tempo para atingir o grau de adsorção comparado com o sistema de mútiplos estágios como o processo cromatográfico do leito expandido.

O planejamento experimental mostrou ser uma ferramenta muito útil para determinar as condições mais favoráveis para a adsorção da enzima pela resina aniônica Streamline DEAE, melhorando significativamente a adsorção. A faixa estudada de pH e do fator de expansão, influenciou muito pouco na adsorção em relação ao efeito provocado pelo aumento da molaridade do tampão de 0,02 para 0,08.

4.7.2 Resultado do estudo de otimização da eluição de inulinase em leito expandido por planejamento experimental

Para o estudo da etapa de eluição da enzima, as condições de adsorção utilizadas foram as otimizadas no item anterior: solução de tampão fosfato de sódio com 0,02M, pH 6,5 e fator de expansão 3,0. A condição otimizada para o fator de expansão foi de 2,0, mas como esta variável não foi significativa utilizou-se o fator 3,0, reduzindo o tempo de alimentação pela metade. Foi realizado um planejamento completo de 2^{a.} ordem totalizando 11 ensaios para as variáveis pH e volume de eluição.

Os resultados da adsorção nestas condições comprovaram que a otimização realizada na etapa de adsorção é bastante confiável, como pode ser verificado na Figura 4.45, onde se apresenta a relação da atividade final por atividade inicial (A/Ao) em função do volume injetado na coluna, e pode se observar que ao passar 1500 mL de caldo na coluna a perda da enzima não ultrapassa 5%. No anexo D estão listados os resultados da relação A/Ao em cada fração de 100 mL dos ensaios.



Figura 4.45: Relação atividade final e atividade inicial (A/Ao) em função do volume alimentado: a) ensaios de 1 a 6 e b) ensaios 7 a 11.

A Tabela 4.46 ilustra os ensaios realizados conforme o planejamento, as respostas de porcentagem da enzima recuperada em relação à quantidade de enzima no caldo que foi injetado na coluna, média da porcentagem de recuperação de 3 frações de cada ensaio, a porcentagem da enzima recuperada em relação à quantidade de enzima que ficou adsorvida após a etapa de lavagem e o fator de purificação considerando a média de 3 frações com os melhores resultados de recuperação e purificação.

Na etapa de eluição, a coluna foi acoplada ao sistema de FPLC, permitindo programar a recuperação com gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl, conforme o esquema de purificação descrito na metodologia.

Ensaios*	pН	Volume	% rec.	%rec. média	% rec. Ads.	FP
		(mL)	caldo			
1 (1)	5,5	400	33,08	31	34,69	4,02
2 (8)	7,0	400	15,21	34	15,45	2,45
3 (7)	5,5	900	53,32	34	54,24	7,32
4 (3)	7,0	900	43,07	50	43,95	5,62
5 (5)	5,2	650	100,00	93	100,00	15,43
6 (9)	7,3	650	49,05	42	49,91	5,83
7 (11)	6,25	300	25,17	48	25,56	3,06
8 (10)	6,25	1000	61,12	12	62,32	11,88
9 (2)	6,25	650	53,57	74	54,66	7,49
10 (4)	6,25	650	46,77	21	47,24	6,02
11 (6)	6,25	650	50,66	46	52,38	11,26

Tabela 4.46 – Planejamento experimental completo e as respostas de porcentagem de enzima recuperada do total alimentado (% rec. Caldo), média da porcentagem de recuperação de 3 frações (% rec. Média), porcentagem da enzima recuperada em relação a enzima adsorvida na resina (% rec. Ads.) e o fator de purificação (FP).

*Os números entre parênteses correspondem a ordem (aleatória) em que os ensaios foram realizados

Pode-se observar também na Tabela 4.46 que a resposta de porcentagem de enzima recuperada em relação ao total injetada, e a resposta de porcentagem de enzima recuperada em relação à quantidade de enzima que ficou adsorvida na resina após a lavagem, são praticamente iguais, devido a pouca perda da enzima durante a alimentação e na etapa de lavagem.

A Tabela 4.47 apresenta os resultados de fator de purificação e a relação S/I das frações que apresentaram melhores resultados de atividade na etapa da dessorção.

Ensaio	Fração	Atividade	Proteína (mg/mL)	Atividade	Fator de	Média ED	S/I	Média
		(U/ML)	(mg/mL)	(U/mg)	purmeaçao (FP)	FF		70 rec.
	Caldo	236.08	3 75	<u>(U/mg)</u> 62.95	<u>(F1)</u>		16.07	
1	F11	4929 51	12 91	381.84	6.06	4 02	29.66	31
1	E11 E12	1686 19	8 16	206 64	3 28	4,02	20,00	51
	E13	587 99	3 44	170.93	2,72		20,01	
	Caldo	244.93	3 43	71 41	1		11 74	
2	E24	1631.06	7.91	206.20	2.88	2.45	10.09	34
	E25	1071,76	5,48	195,57	2,74	_,	16,69	
	E26	190,11	1,53	214,25	1,74		,	
	Caldo	228,68	3,40	67,26	1		16,69	
3	E27	4920,75	8,71	564,95	8,84	7,32	31,09	34
	E28	4568,08	7,63	598,70	8,90		23,06	
	E29	1501,02	5,30	283,21	4,21		38,77	
	Caldo	222,34	3,86	57,60	1		11,35	
4	E27	3798,27	9,96	381,35	6,62	5,62	18,43	50
	E28	2765,76	6,67	414,66	7,19		14,90	
	E29	920,96	5,23	176,09	3,05		26,43	
	Caldo	211,05	3,92	53,84	1		11,81	
5	E25	1633,82	2,28	716,59	13,31	15,43	13,67	93
	E26	14492,23	11,05	1311,51	24,36		48,21	
	E27	3419,17	7,36	464,56	8,63		40,05	
	Caldo	273,71	3,64	75,19	1		13,05	
6	E25	5083,30	6,54	777,26	10,23	5,83	39,51	42
	E26	1763,31	8,67	203,38	2,70		12,59	
	E27	2121,49	6,18	343,28	4,56		55,62	
7	Caldo	204,98	3,50	58,56	1	2.06	17,03	40
/	E23	644,/1	11,/3	54,96	I 5 41	3,06	25.00	48
	E24	2818,55	8,90	310,09	5,41		25,99	
	E23	849,70	3,22	102,78	2,78		47,23	
Q		190,49	5,51	55,98 77 077	12.03	11.99	17,95	12
0	E27 E28	7607.07	0,32 8 70	875.76	15,05	11,00	13 34	12
	E20 F29	2168 32	5 54	391 39	6 99		37 72	
	Caldo	189.91	3.82	49 71	1		16 75	
9	E25	2837.26	7.62	372.34	7 49	7 49	14.08	74
,	E26	4942.33	10.32	478.44	9.62	7,12	30.15	, ,
	E27	1757.27	6.61	265.85	5.35		38.11	
	Caldo	203.61	3.38	60.24	1		14.52	
10	E25	2380,69	6,14	387,62	6,43	6,02	18,83	21
	E26	3932,10	10,58	371,65	6,17	,	21,45	
	E27	2211,62	6,71	329,60	5,47		38,09	
	Caldo	135,43	3,29	41,03	1		11,33	
11	E25	1001,85	1,52	659,16	16,06	11,26	28,21	46
	E26	3836,85	7,64	502,20	12,24		24,96	
	E27	1345,43	5,98	225,00	5,48		44,77	

Tabela 4.47 Dados de purificação de 3 frações que apresentaram melhoresresultados de recuperação e de pureza de cada ensaio.

 E_{xy} corresponde a ordem da fração na etapa da eluição.

Verifica-se que os resultados variaram de 15 a 100% de recuperação, de 2,4 a 15 vezes no valor médio de fator de purificação e de até 24,36 vezes em uma das frações do ensaio 5, conforme a condição de pH e volume do gradiente salino, mostrando a importância destas variáveis na etapa de eluição.

Ao analisar a resposta de porcentagem da enzima recuperada em relação à quantidade da enzima alimentada, é possível obter o modelo codificado (Equação 4.16) com um coeficiente de correlação de 0,85, sendo o F_{calc} superior ao F_{tab} , como pode ser observado na análise de variância (ANOVA) da Tabela 4.48. Este resultado não foi excelente em termos estatísticos, mas considerando-se um processo tão complexo como a de purificação de enzimas pode-se afirmar como citado por Haaland (1989) que ele é suficientemente adequado para avaliar os efeitos das variáveis estudadas nas respostas desejadas através da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 4.46)

%recuperação de inulinase do caldo = 50,42-12,62*pH+6,45*pH²+12,29*V-9,33*V² (Equação 4.16)

Para a resposta em termos de fator de purificação, considerando a média de 3 frações (Tabela 4.47) obtida na recuperação, obteve-se um modelo codificado (Equação 4.17) com um coeficiente de correlação 0,7 e o F_{calc} superior ao F_{tab} (ANOVA da Tabela 4.49). É possível verificar a tendência do efeito do pH e do volume de gradiente salino através da Figura 4.46. As condições de pH de 5,2 e volume de 650 mL resultaram no melhor fator de purificação da enzima, condição esta que favorece também a maximização da recuperação.

FP=7,31 –2,11*pH+2,37*V (Equação 4.17)

Observando-se a superfície de resposta gerada pelo modelo (Figura 4.47), verificase uma tendência de obter melhores resultados de pureza para valores de pH baixo e com volume elevado do gradiente de NaCl de 0 a 1 M.

Tabela 4.48 – ANOVA para resposta de porcentagem da enzima recuperada em relação a total de enzima alimentada na coluna a 10% de significância.

Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	*F _{calc}
Regressão	3479,22	4	869,8	4,0
**Resíduo	1287	6	214,5	
Falta de ajuste	1263,72	4		
Erro puro	23,28	2		
Total	4766,22	10		
R = 0.85				

 $F_{0,90;4;6} = 3,18$

* F_{calc} = F calculado **Resíduo= falta de ajuste + erro puro

Tabela 4.49 – Tabela ANOVA para análise da resposta de fator de purificação

Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrados médios	*F _{calc}
Regressão	80	2	40,1	3,94
**Resíduo	82	8	10,2	
Falta de ajuste	67	6		
Erro puro	15	2		
Total	162	10		
R = 0,7				

F_{0,85; 2; 8}=3,06

 $*F_{calc} = F$ calculado

**Resíduo= falta de ajuste + erro puro



Figura 4.46 – Superfície de resposta gerada para a resposta de porcentagem de enzima recuperada em relação a enzima total.



Figura 4.47 - Superfície de resposta gerada para a resposta de fator de purificação.

Através destes resultados pode-se estabelecer que as condições do ensaio 5 para a eluição da enzima foram melhores em termos de pureza, tendo o pH 5,2 e um volume do gradiente de 650 mL. Nestas condições, obteve-se 100% de recuperação da enzima ao somar as 19 frações da eluição em que apresentaram atividade, sendo que na fração com maior concentração de atividade obteve-se um fator de purificação de 24 vezes e recuperação de 69%, cujo volume desta fração (15 mL) representa apenas um centésimo

do volume injetado (1500 mL). Considerando as 3 frações com maior concentração de atividade enzimática, a recuperação foi de 93%.

Concluindo este estudo foi possível definir as condições ideais para a etapa de adsorção e eluição:

Etapa de Adsorção: equilíbrio da coluna com tampão fosfato de sódio 0,02 M e pH 6,5 e fator de expansão de 3,0.

Etapa de eluição: obteve-se melhor resultado utilizando o tampão fosfato de sódio 0,02 M e pH 5,2 e o volume 650 mL para obter o gradiente salino de 0 a 1 M.

O objetivo inicial de otimizar as etapas de adsorção e dessorção na purificação de inulinase utilizando a metodologia de planejamento experimental foi atingido, como pode ser observado na Tabela 4.50. Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os resultados obtidos por Kalil (2000) na purificação da inulinase em resina Streamline. Através dos estudos de otimização foi possível melhorar a capacidade de adsorção da resina de 2.219 para 22.627, a concentração da enzima na fração coletada de 1.065 U/mL para 14.492 e o fator de purificação de 10,4 para 24,3 vezes.

Tabela 4.50- Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por Kalil (2000).

	KALIL	Resultados obtidos
		neste trabalho
resina	Streamline SP	Streamline DEAE
Volume da resina (mL)	50	50
Capacidade de adsorção (U/mL	2.219	22.627
de resina)		
Inulinase introduzida na coluna	71.829	316.500
(U)		
Recuperação (%)	74	69
Fração recuperada (mL)	50	15
Atividade da fração recuperada	1.065	14.492
(U/mL)		
Fator de purificação	10,4	24,3

5. CONCLUSÕES

Na seleção entre as 10 linhagens de *Kluyveromyces* estudadas neste trabalho, verificou-se que alguns microrganismos (NCYC 587, NRRL Y-610, NRRL Y-1196, NRRL Y-7571, NRRL Y-8279 e NRRL Y-8280) apresentaram maior produção da inulinase em meio industrial. Este resultado é de grande interesse para a exploração industrial destes microrganismos, uma vez que o custo da produção em meio industrial é reduzido sensivelmente quando comparado ao meio sintético.

As espécies *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foram selecionadas como melhores produtores de inulinase. Através da metodologia do planejamento experimental e análise de superfície de resposta, o meio de produção foi otimizado para os dois microrganismos; ambos atingiram a produção em atividade de aproximadamente 800 U/mL. A composição do meio otimizado foi o mesmo para os dois microrganismos, diferenciado apenas no valor do pH inicial, sendo pH 3,5 para linhagem *K. marxianus* NCYC 587 e pH 5,5 para *K. marxianus* NRRL Y-7571. O meio otimizado é composto por: melaço 90 g/L, água de maceração de milho 45 g/L e extrato de levedura 4 g/L.

A inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi parcialmente caracterizada, apresentando temperatura ótima de 55°C e um pH ótimo de 4,5. A enzima apresentou etabilidade na faixa de pH entre 4,0 e 6,0, e os valores para os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$, para a inulinase obtida diretamente do caldo fermentado foram, 20,38 µmol/mL e 769,23 µmol/min, respectivamente, e para a enzima purificada obteve-se K_m igual a 11,05 µmol/mL e velocidade máxima igual a 526,31 µmol/min para o substrato sacarose.

A estabilidade térmica foi verificada através da meia vida, e para enzima incubada a 56°C, obteve-se 137 minutos para a inulinase bruta do caldo fermentado, 53 minutos para a inulinase bruta e imobilizada, 40 minutos para a inulinase purificada e 9 minutos para a inulinase purificada e imobilizada. Portanto, dentre as inulinases estudadas, a inulinase bruta do caldo fermentado apresentou melhor estabilidade térmica, cuja a estabilidade diminuiu ao ser purificada. A imobilização da enzima utilizando alginato de cálcio também

diminuiu a estabilidade da enzima. No estudo de adsorção da inulinase pela resina Streamline DEAE, verificou-se que o modelo de Langmuir se ajusta aos dados experimentais da isoterma de adsorção, e foram determinadas a capacidade máxima de adsorção igual a 1428 U/mL e constante de adsorção igual a 2 U/mL, com coeficiente de correlação de 0,96 para a enzima em solução do tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 0,05 M. Em solução tampão tris-HCl com pH 7,5 e 0,02M, obteve-se um Qm igual a 5000 U/mL e kd de 0,05 U/mL.

Nos ensaios preliminares de purificação da inulinase em leito fixo, verificou-se melhor recuperação da enzima utilizando tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 0,02 M, com 79% de recuperação da enzima adicionada na coluna e com um fator de purificação de 11,4 vezes. Com tampão tris-HCl 0,02 M e pH 7,5 a recuperação foi de apenas 19% e com um fator de purificação de 2,6 vezes.

Ao realizar os ensaios iniciais em leito expandido, alimentando a coluna com enzima diretamente do caldo fermentado em meio industrial, o processo de purificação foi bastante prejudicado devido às impurezas proveniente do melaço e da água de maceração de milho. Através dos resultados obtidos nesta etapa do trabalho, verificou-se a inviabilidade do uso do meio industrial diretamente na coluna de leito expandido, sendo que o estudo de pré-tratamento do meio para reduzir as impurezas, foi conduzido em outro trabalho paralelo no laboratório.

A otimização do processo de purificação em leito expandido foi realizada então utilizando caldo fermentado em meio sintético com presença de células. Na adsorção, a condição que proporcionou melhor resultado foi obtido equilibrando o leito com tampão fosfato de sódio, 0,02 M, pH 6,5 e o fator de expansão de 2,0, apresentando adsorção de 1131373 U de enzima pela coluna, o que significa uma adsorção de 22627 U/ mL de resina, ou seja, maior que 15 vezes a adsorção obtida em testes de batelada (Q_m =1428 U/mL).

As condições otimizadas para a purificação da inulinase em coluna de leito expandido Streamline 25 equilibrada a 15°C, com 50 mL de resina Streamline DEAE foram obtidas a partir de 2 planejamentos fatoriais, um para a etapa de adsorção e outro para a eluição.
Adsorção: a enzima em caldo fermentado, com pH ajustado para 6,5 foi alimentada na coluna de leito expandido, a coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,5 e com fator de expansão de 3,0.

Eluição: a enzima foi eluida com tampão fosfato 0,02 M, pH 5,2 e o volume de 650 mL para tampão contendo gradiente salino de NaCl de 0 para 1M.

Nas condições acima foi possível recuperar 93% da inulinase coletadas em 3 frações, e em uma das frações coletadas obteve-se 69% de recuperação e o fator de purificação foi de 24 vezes.

Assim, através dos planejamentos fatoriais, foi possível otimizar as condições para a purificação da inulinase em leito expandido, obtida a partir do meio sintético.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Estudar a purificação de inulinase obtida por fermentação do meio industrial após o pré-tratamento do meio.

Estudar a influência de outras variáveis no processo de purificação em leito expandido como: a temperatura e a altura inicial do leito, concentração de células no caldo, concentração de enzima no caldo.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIS, J.-J.; KAMMOUN, S.; BLANC, P.; GIRARD, C.; BARATI, J.C. Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. Applied and Environmental Microbiology, p. 1086-1090, nov., 1986.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH 1 Ion Exchange Chromatography–Principles and Methods - http://www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/ion_exchange.pdf acessado em dez/2003
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH 2 Expanded Bed Adsorption Handbook http://www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/expanded_bed.pdf acessado em dez/2003
- ANÔNIMO 1 A Biotecnologia em números, no Brasil Agropecuária Tropical http://www.zebus.com.br/biotecnologia5_126_at.htm acessado em mar/2004
- ANÔNIMO 2 http://www.novozymes.com.br/enzimas.htm acessado em mar/2004
- ANÔNIMO 3 http://www.anbio.org.br/jornais/jornal7/pag6e7.htm acessado em mar/2004
- ANÔNIMO 4 Fibras em Nutrição Enteral http://nutricaoclinica.nestle.com.br/publicacoes/fibrasnutricaoenteral/fibras acessado em mar/2004
- ANÔNIMO 5 http://www.docigual.com.br/informe/textos/naturalis.htm acessado em mar/2004
- ANÔNIMO 6 http://www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/fplcsystem.html acessado em mar/2004.
- AZHARI, R; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. Purification and Characterization of endo- and exo-Inulinase. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 11, p. 105-117, 1989.

- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals 2^a. edição Singapore: McGraw-Hill Book Co., 1986.
- BARTHOMEUF, C.; POURRAT,H. Production of High-content Fructo-oligosaccharides by an Enzymatic System from *Penicillium rugulosum*, **Biotechnology Letters**, v.17, p.911-916,1995.
- BATT, B.C.; YABANNAVAR, V.M.; SINGH, V. Expanded Bed Adsorption Process for Protein Recovery from whole Mammalian cell culture broth. Bioseparation, v. 5, n. 1, p. 41-52, 1995.
- BURKERT, J.F.M. Otimização das Condições de Produção de Lipase por Geotrichum candidum NRRL Y-552, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 2003.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos 6^a edição, Campinas: Editora da Unicamp,1995.
- COSTA, F.A.A. Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras, **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP,1986.
- COSTA, F.A.A. Estudo de Otimização do Meio de Cultura para a Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica*, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 2000.
- CRUZ-GUERRERO, A; GARCIA-PEÑA, I; BARZANA, E; GARCIA-GARIBAY, M; GOMES-LUIZ,L *Kluyveromyces marxianus* CDBB L-278: A Wild Inulinase Hyperproduction Strain, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 80, no.2, 159-163,1995.
- DRAEGER, M.N.; CHASE, H.A. Liquid Fluidized Beds for Protein Purification. I. Chem.. Eng. Symp. Ser., No. 118, 12.1-12.12, 1990.

- DUAN, K.J.; CHEN, J.S.; SHEU, D.C. Kinetic Studies and Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose, Enzyme Microb. Technol., v. 16, p. 334-339, 1994.
- ETTALIBI, M; BARATTI, J.C Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 26, p.13-20,1987.
- FERNANDEZ-LAHORE, H.M.;GEILENKIRCHEN, S.;BOLDT, K.; NAGEL, A.; KULA, M.-R.;THOMMES, J. The Influence of Cell Adsorbent Interactions on Protein Adsorption in Expandes Beds. Journal of Chromatography A, v. 873, p. 195-208, 2000.
- GANDRA, A. Brasil está atrasado na produção de enzimas. http://www.radiobras.gov.br/ct/1999/materia_081099_6.htm, acesso em 2004
- GILL, P.K; SHARMA, A.D.; HARCHAND, R.K.; SINGH, P. Effect of Media Supplements and Culture Conditions on Inulinase Production by an Actinomycete Strain, Bioresource Technology, v. 87, p. 359-362, 2003.
- GROOTWASSINK,J.W.D.; FLEMING,S.E. Non-specific β-fructofuranosidase (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: Batch and Continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties, **Enzyme Microbiology and Technology**, v.2, p.45-53, 1980.
- GUPTA, A.K.; RATHORE, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Thermal Stability and Immobilisation of Inulinase from *Fusarium oxusporum*, J. Chem. Tech. Biotechnol., v. 47, p. 245-257, 1990.
- GUPTA, A.K.; KAUR, M.; KAUR, N.; SINGH, R. A Comparison of Properties of Inulinases of *Fusarium oxysporum* Immobilised on Various Suports, J. Chem. Tech. Biotechnol., v. 53, p. 293-296, 1992.

- GUPTA, A.K.; DAVINDER, P.S.; KAUR, N. e SINGH, R. Production, purification and Immobilisation of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal Chemical Technology Biotechnology, 59: 377-385, 1994.
- HAALAND, P.D. Experimental design in Biotechnology. ASQC Quality Press, 1989.
- HAYASHI,S., NONOGUCHI,M., TAKASAKI,Y., UENO,H., IMADA,K. Purification and Properties of β-fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* TCC 20524. Journal Indrustrial Microbiology., v.7, p.251-256, 1991.
- HENSING,M.C.M.;VROUWENVELDER,H.;HELLINGA,C.; BAARTMANS,R.; VAN DIJKEN, H. Production of Extracellular Inulinase in High-cell-density Fed-batch Cultures of *Kluyveromyces marxianus* Applied Microbiology and Biotechnology, v.42, p.516-521, 1994
- HIDAKA,H., HIRAYAMA,M., SUMI,N. A Fructooligosaccharide Producing Enzyme from Aspergillus niger ATCC 20661. Agricultural Biological Chemical, v.52(5), p.1181-1187, 1988.
- HIRAYAMA, M., SUMI, N., HIDAKA,H. Purification and Properties of a Fructoligosaccharide from *Aspergillus niger* ATCC 20661. Agricultural Biological Chemical.,v.53(3), p.667-673, 1989.
- JONG,W.Y., LEE,M.G., SONG,S.K. Batch Production of High-Content Fructo-Oligosaccharides from Sucrose by Mixed-Enzyme System of β-fructofuranosidase and Glucose-Oxidase, **Journal Fermentation Biotechnology**, v.77 (2), p.159-163, 1994.
- JUNG,H.K., YUN,J.W., KANG,K.R., LIM,J.Y., LEE,J.H. Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides form Sucrose., Enzyme Microbiological Technololgy , v.11, p.491-494, August, 1989.

- KABKE, K.C.P. Otimização da Produção de Inulinase em Meio Industrial através da Linhagem *Kluyveromyces marxianus*, **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 2002.
- KALIL, S.J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Evolution of Inulinase Production of *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 II Enpromer, 30/ago-2/set, Florianópolis-SC, 1999.
- KALIL, S.J. Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e Purificação da Enzima por Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Leito Expandido, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 2000.
- KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Ion Exchange Expanded Bed Chomatography for the Purification of na Extracelular Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*, **Process Biochemistry**, in press, 2004.
- KIM, D.H.; CHOI,Y.J.; SONG,S.K.; YUN,J.W. Production of Inulo-oligosaccharides Using Endo-inulinase from a *Pseudomonas sp.*, **Biotechnology Letters**, v.19,p.369-371, 1997.
- KIM,C.H.; RHEE,S.K. Frutose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin, Biotechnology Letters, v.11,p.201-206, 1989.
- KUSHI, R.T.; HOJO, O.; TREVISAN, H.C.; MONTI,R.; CARVALHO,A.; CONTIEIRO,J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Anais XI SINAFERM, São Carlos, agosto/1996.
- LEE, K.J.; CHOL, J.D.; LIM, J.Y. Purification and properties of intracellular fructosil transferase from *Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.7, p.411-415, 1991.
- LEITE, J.T.C. Obtenção de extrato de Inulina de Chicória (*Cichorium intybus*) por Abaixamento de Temperatura e Secagem por Spray Dryer, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Agrícola-UNICAMP, 2001.

- LOWRY, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, v.193, p.265-275.
- MAKINO, Y.; TREICHEL, H.; SCANAVINI, H.F.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Otimização do Meio Industrial para Produção de Inulinase por *Kluyveromyces*, Anais do 14º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 25-28 de outubro, Natal-RN, 2002.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalisylic acid reagent for determination of reducin sugar. Ana. Chem, v.31, p.426-428, 1959.
- MITSOUKA,T. Bifidobacteria and Their Role in Human Health, Journal Industrial Microbiology, v.6, p.263-268, 1990.
- NAKAMURA, T.; OGATA, Y.; SHITARA, A.; NAKAMURA, A.; OHTA, K. Continuous Production of Fructose Syrups from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n^o 2, p. 164-169, 1995.
- NOGUEIRA, R.I. Processo de Obtenção de Inulina de Chicória (*Cichorium intybus*) em Pó, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia Agrícola-UNICAMP, 2002.
- OLIVEIRA, I.M.A. Produção e Caracterização da β-Frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* e sua aplicação na Produção de Frutooligossacarídeos, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP, 1997.
- ÖNGEN-BAYSAL, G.; SUKAN, S.S.; VASSILEV, N. Production and Properties of Inulinase from *Aspergillus niger*, **Biotechnology Letters**, v. 16, n^o 3, p. 275-280,1994
- ONODERA, S & SHIOMI, N Purification and Subsite Affinities of exo-Inulinase from *Penicillium* trzebinskii, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 56(9), 1443-1447, 1992.

- OWEN, R.O.; CHASE, H.A. Modeling of the Continuous Counter-corrent Expanded Bed Adsorber for the Purification of Proteins. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 3765-3781, 1999
- PALSSON, E.; AXELSSON, A.; LARSSON, P.-O. Theories of Chromatographic Efficiency Applied to Expanded Beds. Journal of Chromatography A, v. 912, p. 235-248, 2001.
- PAREKH, S.; MARGARITIS, A. Production of Inulinase (β-Frutan Frutanohydrolase) by *Kluyveromyces marxianus*, **Agric. Biol. Chem**., v. 50(4), p. 1085-1087, 1986.
- PARK,Y.K., ALMEIDA,M.M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by transfructosylase from *Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.7, p.331-334, 1991.
- PAZUR,J.H. Transfructosilation Reactions of an Enzyme of Aspergillus oryzae . Journal Biological Chemical , v.199, p.217-225, 1952.
- PESSOA Jr., A.; HARTMANN, R.; VITOLO, M.; HUSTED, H. Recovery of Extracellular Inulinase by Expanded Bed Adsorption, Journal Biotechnology, v. 51, p. 89-95, 1996.
- PHARMACIA BIOTECH Streamline 25 Column, User Manual
- PLAYNE, M.J.; CRITTENDEN, R. Commercially Available Oligosaccharides, in **Bulletin** of the IDF 313, 10-22., 1996.
- ROBERFROID, M.B., VAN LOO, J. A. E., GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of Chicory and its hidrolysis productos. Journal of Nutrition. v.128, p.11-19, 1998.
- ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E., VAN DER BAAN, A. SCHEFFEERS, A. VAN DIJKEN, J. Production, Distribution and Kinetic properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied and Environmental Microbiology, v.54, n.5, p.1131-1137,1988.

- SANTOS, A.M.P. Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, **Dissertação de Mestrado**, FEA, UNICAMP,1998.
- SANTOS, E.S. Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP, 2001.
- SANTOS, A.M.P Síntese de Oligossacarídeos a partir da Sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 2002.
- SCHIWECK,H., MOHAMMED,M., RAPP,K.M. New Developments in the Use Sucrose as Industrial Bulk Chemical, In: "Carbohydrates as Organic Raw Materials", ed. LICHTENTHALER,F.W., p.57-94,VCH, New York,1995.
- SNOW, U Adsorbent Reduces Primary unit Operations for Bioprocess Recovery. Genetic Engineering News, v. 9, p. 320-329, 1994.
- SCHNEIDER,A.L.S. Estudo da Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. **Tese de Mestrado**, FEQ-UFSC, 1996.
- SCOPES, R.K. Protein Purification Principles and Pratice 2a. edição, New York: Springer-Verlag, 1988.
- 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*, **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 2001
- SKIDMORE, G.L.; CHASE, H.A. Multi-component Adsorption of Protein to Ion exchanger. Sep. Biotechnol., v.2, p. 418-427, 1990.
- THELEN, T.V.; RAMIREZ, W.F. Bed-height Dynamics of Expanded Beds. Chemical Engineering Science, v. 52, p. 3333-3344, 1997

- THOMMES, J.; Flluidized Bed Adsorption as a Primary Recovery Step in Protein Purification. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, v. 58, p. 185-230,1997.
- TONG, X.; XUE, B.; SUN, Y. Modeling of expanded Bed Protein Adsorption by Taking into Account the Axial Particle Size Distribuition. Biochemical Engineering Journal, v. 16, p. 265-272, 2003.
- TREICHEL, H. Estudos de meios industriais para a produção de inulinase por Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 2001.
- TREICHEL, H. Estudo da Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em Meios Industriais pré-tratados. **Tese de Doutorado em andamento,** 2004.
- VANDAMME, E. J. e DERYCKE, D. G. Fermentation Process, Properties and Applications. Advances in Applied Microbiology, 29: 139-176, 1983.
- VILLEN, R.A. Biotecnologia Histórico e Tendências http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm acesso em 2004
- WEI, W.; ZHENG, Z.; LIU, Y.; ZHU, X. Optimizing the Culture Conditions for Higher Inulinase Production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and Scaling-Up Fermentaton, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 86, nº 4, p. 395-399, 1998.
- WORKMAN, W. E.; DAY, D.F. Enzymatic Hydrolysis of Inulin to Fructose by Gluteraldehyde fixed Yeast Cells, Biotechnology and Bioengineering, v. XXVI, p. 905-910, 1984.
- YUN, J.W.; JUNG, K.H.; OKU, J.W.; LEE, J.H. Semi-batch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. Applied Biochemical and Biotechnology, v.24/25, p.299-308, 1990.

- YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. Enzyme and Microbial Technology. v. 19, p. 107-117, 1996.
- YUN, J.; YAO, S.-J.; LIN, D.-Q;LU,M.-H.;ZHAO, W.-T. Modeling Axial Distributions of Adsorbent Particle Size and Local Voidage in Expanded Bed. Chemicall Engineering Science, v. 59, p. 449-457, 2004.
- ZITTAN, L. Enzimatic Hydrolisis of Inulin An Alternative Way to Frutose Production. **Starch**, v.33, p.373-377, 1981.

ANEXO A

Princípios de adsorção em leito expandido

Princípios de adsorção em leito expandido

Adsorção do leito expandido é uma operação de passo simples na qual a proteína desejada é purificada diretamente do caldo bruto, sem a necessidade de clarificação, concentração e purificação inicial. A expansão do leito cria uma distância entre as partículas da resina, isto é espaços vazios no leito (porosidade), que permite a passagem sem obstáculos de células, fragmentos de células e outras partículas durante a aplicação do caldo bruto na coluna (figura A1).



Figura A1 - Princípio de funcionamento do leito expandido para adsorção de proteínas na presença de particulados. O esquema mostra a formação da torta de células quando se trabalha com leito fixo (a) e a dispersão das células quando leito expandido é utilizado (b). (KALIL, 2000)

A resina é expandida e equilibrada por aplicação de um fluxo ascendente na coluna. Um leito fluidizado estável é formado quando as partículas da resina ficam suspensas em equilíbrio devido ao balanço entre a velocidade de sedimentação das partículas e a velocidade de fluxo ascendente do líquido. O adaptador da coluna é posicionado na parte superior da coluna durante esta fase.

O caldo não clarificado é aplicado no leito expandido com o mesmo fluxo ascendente usado no equilíbrio da expansão. Nesse processo, somente as proteínas se ligam às resinas e as células, fragmentos de células, partículas e contaminantes passam direto sem impedimento. O material fracamente ligado, assim como os resíduos de células e outros tipos de partículas, são lavados do leito expandido usando o fluxo ascendente do líquido.

Após a lavagem e a remoção de todo material fracamente retido, o fluxo do líquido é interrompido e as partículas da resina se depositam rapidamente na coluna. O adaptador da coluna é então abaixado até a superfície do leito sedimentado. O fluxo é invertido e as proteínas capturadas são eluídas do leito sedimentado usando um tampão apropriado. Obtém-se dessa forma frações do eluente com a proteína clarificada, concentrada e parcialmente purificada, e pronto para outra purificação por cromatografia em leito fixo.

Após a eluição, o leito é regenerado por lavagem com fluxo descendente em leito sedimentado utilizando tampões específicos para o tipo de cromatografia aplicada. A regeneração remove as proteínas ligadas fortemente que não são removidas durante a fase de eluição. As etapas da purificação em leito expandido estão esquematizadas na Figura A2.



Figura A2 - Etapas de um sistema de leito expandido. (Amersham Pharmacia Biotech 2)

A adsorção em leito expandido se baseia no controle da fluidização estável combinando propriedades hidrodinâmicas de um leito fluidizado com as propriedades de um leito fixo. A fluidização permite ao material particulado a passar através do leito. O princípio do leito expandido, isto é, a formação da fluidização estável com diversas unidades de transferência de massa e diversos pratos teóricos no leito expandido, imitam o desempenho de uma coluna cromatográfica empacotada tradicional, apresentando um mínimo de retorno de mistura, formação de canais preferenciais e turbulências no leito.

As resinas Streamline são baseadas em agarose, um material comprovado ser eficiente para trabalhar em cromatografia de escala industrial. A estrutura macroporosa da matriz de ligações cruzadas de agarose combinam boa capacidade de ligação com moléculas grandes, como as proteínas, com alta estabilidade química e mecânica. A alta estabilidade mecânica é uma propriedade importante para matrizes utilizadas em leito expandido por reduzirem os efeitos do atrito durante o movimento livre das partículas pelo leito expandido.

Particulados fabricados somente com materiais orgânicos têm baixa densidade, necessitando de grandes diâmetros de particulados para garantir maiores velocidades de sedimentações. Esse aumento no diâmetro dos particulados resulta em um longo caminho de difusão, causando uma considerável resistência à transferência de massa e contrapondose à produtividade. Os adsorventes que são baseados em compostos particulados contendo um núcleo de material inerte mais denso que os materiais orgânicos, podem ser projetados para terem uma alta velocidade de sedimentação mesmo tendo um tamanho pequeno de partículas. Os adsorventes Streamline exibem distribuições Gaussianas de tamanhos de partículas e densidade, como a ilustrada na figura A3.

Ĺ	-				
		Volum Sedim	ne nentado	d _{50V}	Densidade
		ml	%	μm	g/ml
	 	30	12	144	1.15
		49	19	164	1.16
		72	28	186	1.17
		104	41	238	1.19
Ţ	-				

Figura. A3 – Representação da distribuição dos leitos do trocador iônico Streamline (coluna de 50 mm d.i.) expandido 2,5 vezes, em água, com fluxo de 300cm/h. (Amersham Pharmacia biotech 2).

A polidispersão dos particulados é um importante fator de projeto que contribui para a estabilidade do leito expandido. Os gradientes de tamanhos e densidades das partículas adsorventes posicionam os leitos em alturas específicas da coluna, em função das velocidades individuais de sedimentação dos particulados. Quanto menores e mais leves, as partículas se movimentam para posições no topo da coluna, resultando numa expansão uniforme e estável. Por terem posições (alturas) específicas dentro do leito expandido, as partículas se movimentam em pequenos círculos durante a passagem da solução, como mostrado na Figura A4, evitando retorno da mistura e aumentando a eficiência de purificação. (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH 2)



Figura A4 - Comparação dos movimentos dos particulados em leito expandido: (a) particulado homogêneo com movimento extenso dos particulados e (b) particulados polidispersos com movimentos circulares pequenos. (Amersham Pharmacia Biotech 2).

Em cromatografia por troca iônica a distribuição dos grupos iônicos na superfície da resina é aleatória, e o sítio real de adsorção da proteína não é uma entidade única. Assim, o sítio de adsorção não pode ser tratado da mesma maneira como postulado para adsorção por afinidade. Entretanto, resultados experimentais de sistemas nos quais a proteína é adsorvida em um trocador iônico levam a uma isoterma que pode ser descrita como uma equação de Langmuir (SKIDMORE & CHASE, 1989).

ANEXO B

Estabilidade térmica

ESTABILIDADE TÉRMICA DA INULINASE BRUTA

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	54,36	0
15	51,626	0,051603
30	46,276	0,161005
45	45,877	0,169665
60	43,942	0,212758
90	37,851	0,361971

Tabela B1 – Estabilidade a temperatura de 56°C

Tabela B2 – Estabilidade a temperatura de 58°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	44,658	0
10	44,226	0,009721
32	24,845	0,586377
40	20,72	0,767934
50	22,085	0,704135
60	20,35	0,785953
75	19,07	0,850917
90	15,738	1,042955
105	15,653	1,048371
120	14,4	1,131805

Tabela B3 – Estabilidade a temperatura de 60°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	41,968	0
5	38,920	0,075417
10	30,586	0,316342
15	20,831	0,700465
20	18,520	0,818078
25	16,284	0,946724
30	15,140	1,019567
35	13,667	1,121923
40	12,651	1,199171
45	11,076	1,332127
50	9,348	1,501745
55	9,043	1,534916
60	8,332	1,616804

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	53,907	0
5	39,122	0,320575
10	21,746	0,907831
15	12,88	1,431585
20	9,475	1,738604
25	4,776	2,423657
30	4,522	2,478306
35	3,353	2,777405

Tabela B4– Estabilidade a temperatura de 62°C

Tabela B5 – Estabilidade a temperatura de 64°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
2	35,312	0,215414
4	32,238	0,306488
6	9,370	1,542217
8	9,222	1,55807
12	5,610	2,055083
16	3,226	2,608391

Tabela B6 – Estabilidade a temperatura de 66°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0,5	39,808	0,095566
1	38,030	0,141258
2	36,861	0,172465
3	31,018	0,345047
4	25,252	0,550736
5	19,104	0,829737

 $\textbf{Tabela B7}-Estabilidade \ a \ temperatura \ de \ 68^{\circ}C$

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0,5	60,513	0
1	47,710	0,237733
1,5	33,381	0,594864
2	26,980	0,807786
2,5	15,557	1,35831
3	13,730	1,483386
4	8,730	1,936091
5	6,727	2,196727

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0,25	53,958	0
0,5	42,171	0,246484
0,75	31,475	0,538996
1	26,471	0,712159
1,5	13,078	1,417278
2	7,906	1,920621
3	3,424	2,757262
4	2,063	3,264141

Tabela B8 – Estabilidade a temperatura de 70°C

ESTABILIDADE TÉRMICA DA INULINASE BRUTA IMOBILIZADA

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	11,69	0
180	9,17	-0,2428
360	8,15	-0,36072
720	7,66	-0,42272
1440	5,66	-0,72531
2160	3,51	-1,20312
2880	2,35	-1,60432
4320	1,18	-2,29322

Tabela B9– Estabilidade a temperatura de 50°C

Tabela B10 – Estabilidade a temperatura de 56°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	11,69	0
30	7,29	-0,47223
60	4,73	-0,90481
90	3,33	-1,25576
120	2,37	-1,59584
150	1,41	-2,11514
180	1,12	-2,34541
210	0,83	-2,64506
240	0,63	-2,92077

A	
Atividade (U/ml)	Ln C/Co
16,75	0
9,81	-0,535
7,73	-0,77329
3,6	-1,53746
1,47	-2,43314
1,07	-2,75074
0,74	-3,1195
	Atividade (U/ml) 16,75 9,81 7,73 3,6 1,47 1,07 0,74

Tabela B11 – Estabilidade a temperatura de 57,5°C

Tabela B12 – Estabilidade a temperatura de 60°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	11,09	0
15	2,95	-1,32424
30	0,82	-2,60449
45	0,37	-3,4003
75	0,028	-5,98159

Tabela B13 – Estabilidade a temperatura de 62,5°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	20,32	0
2	9,85	-0,72413
4	8,63	-0,85636
6	1,40	-2,67513
8	1,82	-2,41277
10	0,45	-3,81011
12	0,25	-4,3979

Tabela B14 – Estabilidade a temperatura de 65°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	11,23	0
3	3,38	-1,20071
4	1,44	-2,05395
6	0,51	-3,09193
8	0,12	-4,53885
10	0,06	-5,232
12	0,045	-5,51968

Tabela B15 - Estabilidade a temperatura de 50°C				
	Tempo (min)	Atividade (U/mL)	Ln C/Co	
	0	485,47	0	
	360	362,85	0,291128	
	720	197,07	0,901558	
	1440	112,92	1,458438	
	1800	78,14	1,826615	
	2250	72,19	1,905816	

ESTABILIDADE TÉRMICA DA INULINASE PURIFICADA

Tabela B16 -	Estabilidade a temperatura	de 55°C
--------------	----------------------------	---------

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	Ln C/Co
0	437,92	0
15	322,81	0,304972
30	217,71	0,698872
45	183,3	0,870912
60	149,52	1,074606
90	96,03	1,517376

 Tabela B17 - Estabilidade a temperatura de 57,5°C

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	Ln C/Co
0,5	544,28	0
10	302,79	0,586424
21	157,02	1,243091
31	96,96	1,725165
45	55,36	2,285607
60	29,27	2,922901

Tabela B18 - Estabilidade a temperatura de 60°C

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	Ln C/Co
0,5	536,77	0
2,5	345,33	0,441069
5	178,92	1,098631
10	127,62	1,436513
20	55,05	2,277328
30	25,27	3,055952

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	Ln C/Co
0	545,53	0
2	362,85	0,407768
4	190,18	1,053787
6	87,58	1,829205
10	51,92	2,352054
15	34,52	2,760219

Tabela B19 - Estabilidade a temperatura de 62,5°C

Tabela B20 - Estabilidade a temperatura de 65°C

Tempo (min)	Atividade (U/mL)	Ln C/Co
0	510,5	0
0,5	347,83	0,383677
1	239,6	0,75642
2	127,31	1,388766
3	61,31	2,119448
4	38,47	2,585512
5	23,77	3,066966

ENZIMA PURIFICADA E IMOBILIZADA

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	7,56	0
10	2,89	0,961615
20	1,36	1,715386
30	0,72	2,351375
40	0,74	2,323976
50	0,55	2,657749
60	0,33	3,131534

Tabela B21 – Estabilidade a temperatura de 55°C

Tabela B22 – Estabilidade a temperatura de 57,5°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	5,62	0
5	1,73	1,17821
15	0,3518	2,771024
25	0,2625	3,063836
30	0,1785	3,449498

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	9,75	0
1	7,65	0,242562
2	6,93	0,341407
4	1,31	2,009533
6	0,76	2,551704
8	0,48	3,011236

Tabela B23 – Estabilidade a temperatura de 60°C

Tabela B24 – Estabilidade a temperatura de 62,5°C

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	8,29	0
1	8,42	-0,01556
2	3,52	0,856589
3	1,13	1,992832
4	0,45	2,913558
5	0,16	3,947631

 $\textbf{Tabela B25}-\text{Estabilidade a temperatura de 65}^\circ\text{C}$

Tempo (min)	Atividade (U/ml)	Ln C/Co
0	9,48	0
1	9,27	0,022401
2	2,78	1,226733
3	0,11	4,456459
4	0,089	4,668303

ANEXO C

Etapa de adsorção

Tabela C1 - Resultado em atividades (U/mL) das frações coletadas na etapa da otimização das condições para a adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE segundo o planejamento completo 2^3 , mais 1 ponto central com 4 repetições totalizando 12 ensaios.

volume(ml)	ensaio1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10	ensaio 11	ensaio12
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0,62	0,6	6,49	22,52	0,1	0,68	4,12	7,74	5,46	3,07	0,75	0,86
300	1,06	1,14	32,35	46,05	0,79	1,33	31,72	64,74	21,87	1,01	2,20	4,09
400	1,06	1,26	61,18	85,11	0,76	1,21	48,78	75,81	31,15	5,04	3,93	6,81
500	1,3	1,23	79,23	95,67	0,82	1,31	100,34	153,28	20,78	6,68	6,01	14,83
600	1,46	1,16	90,88	92,96	1,05	1,53	117,75	180,56	38,49	16,38	11,91	26,49
700	1,68	1,11	121,9	141,97	1,37	1,65	137,59	180,83	40,07	19,98	15,45	32,76
800	1,86	1,13	126,75	161,81	1,64	1,77	130,55	199,02	55,46	23,79	18,85	48,41
900	2,23	1,14	117,86	155,12	2,41	2,38	169,54	187,52	77,25	27,53	25,34	67,12
1000	4,33	1,17	142,09	194,91	3,13	2,43	186,55	215,87	81,53	38,17	29,00	72,61
1100	5,79	1,61	174,44	194,62	4,98	3,25	191,45	211,59	87,47	42,04	31,4	81,58
1200	6,64	1,53	170,69	204,14	8,35	3,71	184,53	228,72	98,28	45,04	36,91	90,07
1300	12,1	1,49	165,8	208,17	11,26	4,05	173,29	234,6	97,79	52,42	41,52	96,24
1400	16,34	2,11	176,17	166,94	14,31	4,75	164,35	233,53	108,07	57,55	51,73	96,53
1500	20,13	7,96	190,01	200,96	16,13	6,44	173,00	219,89	110,9	58,07	59,74	113,21
1600	21,12	4,34	191,45	197,22	20,35	7,54	177,03	227,11	129,09	64,82	60,03	130,28
1700	26,9	3,86	194,91	195,49	24,26	7,88	168,96	239,15	132,81	78,08	63,78	134,62
1800	31,53	3,66	167,81	189,72	25,33	9,04	197,51	192,87	143,91	80,73	68,85	128,83
1900	33,17	4,65	201,54	202,12	33,46	10,7	182,51	186,98	135,49	84,77	75,43	143,44
2000	36,55	4,68	208,17	190,01	41,52	11,76	193,18	186,45	156,35	84,31	79,23	140,31
2100	50,53	4,76	207,02	183,38	43,5	12,29	202,98	194,21	157,29	91,57	83,96	151,64
2200	54,1	5,91	207,02	158,87	47,51	13,11	193,47	200,09	157,153	110,14	84,65	156,22

volume(ml)	ensaio1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10	ensaio 11	ensaio12
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0,003	0,004	0,034	0,109	0,001	0,004	0,024	0,035	0,030	0,017	0,005	0,004
300	0,006	0,007	0,171	0,222	0,004	0,007	0,185	0,291	0,120	0,006	0,013	0,020
400	0,006	0,007	0,323	0,411	0,004	0,007	0,284	0,340	0,171	0,028	0,024	0,033
500	0,007	0,007	0,419	0,461	0,004	0,007	0,585	0,688	0,114	0,037	0,036	0,073
600	0,008	0,007	0,480	0,448	0,005	0,008	0,686	0,810	0,211	0,091	0,072	0,130
700	0,009	0,007	0,644	0,685	0,007	0,009	0,802	0,812	0,220	0,111	0,093	0,161
800	0,010	0,007	0,670	0,781	0,008	0,010	0,761	0,893	0,304	0,132	0,113	0,238
900	0,012	0,007	0,623	0,748	0,012	0,013	0,988	0,842	0,424	0,152	0,153	0,329
1000	0,024	0,007	0,751	0,940	0,016	0,013	1,087	0,969	0,448	0,211	0,175	0,356
1100	0,032	0,009	0,922	0,939	0,026	0,018	1,116	0,950	0,480	0,233	0,189	0,400
1200	0,036	0,009	0,902	0,985	0,043	0,020	1,076	1,026	0,539	0,249	0,222	0,442
1300	0,066	0,009	0,877	1,004	0,058	0,022	1,010	1,053	0,537	0,290	0,250	0,472
1400	0,089	0,012	0,931	0,805	0,073	0,026	0,958	1,048	0,593	0,318	0,311	0,474
1500	0,110	0,047	1,005	0,969	0,083	0,035	1,008	0,987	0,609	0,321	0,360	0,556
1600	0,116	0,025	1,012	0,951	0,104	0,041	1,032	1,019	0,709	0,359	0,361	0,640
1700	0,147	0,023	1,031	0,943	0,124	0,043	0,985	1,073	0,729	0,432	0,384	0,661
1800	0,173	0,021	0,887	0,915	0,130	0,049	1,151	0,866	0,790	0,447	0,415	0,632
1900	0,182	0,027	1,066	0,975	0,171	0,058	1,064	0,839	0,744	0,469	0,454	0,704
2000	0,200	0,027	1,101	0,917	0,213	0,063	1,126	0,837	0,858	0,466	0,477	0,689
2100	0,277	0,028	1,095	0,885	0,223	0,066	1,183	0,872	0,863	0,507	0,506	0,744
2200	0,296	0,035	1,095	0,766	0,243	0,071	1,128	0,898	0,863	0,609	0,510	0,767
Ao	182,74	170,68	189,14	207,31	195,28	185,39	171,56	222,83	182,17	180,74	166,08	203,72

Tabela C2 - Resultados da atividade da fração em relação a atividade inicial (A/Ao) dos ensaios da adsorção da inulinase em resina Streamline DEAE.

volume(ml)	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensaio6	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11	ensaio12
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	18212	17008	18265	18479	19518	16036	16744	21509	17671	17767	16533	20286
300	18168	16954	15679	16126	19449	15971	13984	15809	16030	17973	16388	19963
400	18168	16942	12796	12220	19452	15983	12278	14702	15102	17570	16215	19691
500	18144	16945	10991	11164	19446	15973	7122	6955	16139	17406	16007	18889
600	18128	16952	9826	11435	19423	15951	5381	4227	14368	16436	15417	17723
700	18106	16957	6724	6534	19391	15939	3397	4200	14210	16076	15063	17096
800	18088	16955	6239	4550	19364	15927	4101	2381	12671	15695	14723	15531
900	18051	16954	7128	5219	19287	15866	202	3531	10492	15321	14074	13660
1000	17841	16951	4705	1240	19215	15861		696	10064	14257	13708	13111
1100	17695	16907	1470	1269	19030	15779		1124	9470	13870	13468	12214
1200	17610	16915	1845	317	18693	15733			8389	13570	12917	11365
1300	17064	16919	2334		18402	15699			8438	12832	12456	10748
1400	16640	16857	1297		18097	15629			7410	12319	11435	10719
1500	16261	16272			17915	15460			7127	12267	10634	9051
1600	16162	16634			17493	15350			5308	11592	10605	7344
1700	15584	16682			17102	15316			4936	10266	10230	6910
1800	15121	16702			16995	15200			3826	10001	9723	7489
1900	14957	16603			16182	15034			4668	9597	9065	6028
2000	14619	16600			15376	14928			2582	9643	8685	6341
2100	13221	16592			15178	14875			2488	8917	8212	5208
2200	12864	16477			14777	14793			2502	7060	8143	4750
enzima												
adsorvida (U)	350704	352778	99299	88553	379785	327303	63209	75134	193891	280435	263701	254117
Total de	402029	275406	416100	156000	420616	251200	277422	400226	400774	207629	265276	110101
enzima (U)	402028	3/3490	410108	430082	429010	334288	377432	490220	400774	397028	303370	440104
adsorvida	87	94	24	19	88	92	17	15	48	70	72	57

Tabela C3 – Resultando em porcentagem da inulinase adsorvida na resina Streamline DEAE (relação entre unidades de inulinase adsorvida na coluna por unidades de inulinase introduzida na coluna). Os valores ilustrados na tabela são em unidades de inulinase (U) adsorvida na resina em cada fração.

volume (L)	A (U/mL)	A/Ao									
0,1	0	0	2,6	8,02	0,035	5,1	98,18	0,440	7,6	214,29	0,960
0,2	3,15	0,014	2,7	8,19	0,036	5,2	100,28	0,449	7,7	218,43	0,979
0,3	3,32	0,014	2,8	10,51	0,047	5,3	105,68	0,473	7,8	218,7	0,980
0,4	3,43	0,015	2,9	10,29	0,046	5,4	111,2	0,498	7,9	228,08	1,022
0,5	3,59	0,016	3	12,69	0,056	5,5	115,28	0,516	8	241,04	1,080
0,6	3,31	0,014	3,1	14,56	0,065	5,6	120,13	0,538	8,1	260,62	1,168
0,7	3,11	0,013	3,2	16,46	0,073	5,7	124,65	0,558	8,2	261,72	1,173
0,8	2,94	0,013	3,3	18,37	0,082	5,8	173,47	0,777	8,3	223,94	1,003
0,9	2,78	0,012	3,4	18,34	0,082	5,9	155,55	0,697	8,4	236,35	1,059
1	2,79	0,012	3,5	21,29	0,095	6	174,57	0,782	8,5	249,87	1,119
1,1	2,32	0,010	3,5	24,24	0,108	6,1	168,23	0,754	8,6	243,25	1,090
1,2	2,74	0,012	3,5	26,26	0,117	6,2	175,68	0,787	8,7	232,49	1,042
1,3	2,51	0,011	3,5	22,39	0,100	6,3	185,61	0,831	8,8	246,83	1,106
1,4	2,7	0,012	3,5	32,21	0,144	6,4	207,95	0,932	8,9	245,45	1,100
1,5	2,76	0,012	3,5	36,54	0,163	6,5	198,29	0,888	9	236,08	1,058
1,6	2,84	0,012	4,1	39,41	0,176	6,6	179,26	0,803	9,1	263,93	1,182
1,7	2,65	0,011	4,2	46,39	0,207	6,7	196,91	0,882	9,2	278,27	1,247
1,8	3,56	0,015	4,3	50,41	0,225	6,8	194,98	0,873	9,3	255,66	1,145
1,9	3,55	0,015	4,4	50,91	0,228	6,9	206,29	0,924	9,4	265,31	1,189
2	3,68	0,016	4,5	56,59	0,253	7	211,53	0,948	9,5	244,9	1,097
2,1	3,83	0,017	4,6	59,24	0,265	7,1	209,32	0,938	9,6	265,86	1,191
2,2	3,99	0,017	4,7	63,38	0,284	7,2	220,63	0,988	9,7	283,51	1,270
2,3	4,18	0,018	4,8	66,85	0,299	7,3	218,7	0,980	9,8	245,73	1,101
2,4	4,78	0,021	4,9	71,65	0,321	7,4	188,09	0,843	9,9	248,49	1,113
2,5	5,21	0,023	5	84,94	0,380	7,5	214,01	0,959	10	254,56	1,140

Tabela C4: Curva de ruptura completa em coluna Streamline DEAE equilibrada com tampão fosfato pH 6,5, 0,02M e fator de expansão de 2,0. Resultados da atividades (U/mL) para cada fração de 100mL.
ANEXO D

Etapa de eluição

Tabela D1 – Resultados em atividade (U/mL) em cada fração coletada na etapa de adsorção dos ensaios de purificação de inulinase bruta do caldo em resina Streamline DEAE, os ensaios correspondem ao planejamento fatorial completo 2^2 , 2 pontos axiais para cada fator e 1 ponto central com 3 repetições totalizando 11 ensaios. A última linha da tabela corresponde a atividade inicial do caldo bruto.

Volume (mL)	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensai06	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
100	0,54	0,66	0,43	0,05	0,68	1,37	0,72	2,47	0,4	0,46	1,76
200	1,92	1,78	1,4	1,36	1,73	2,18	1,79	4,29	1,1	1,13	3,04
300	2,5	1,76	1,67	1,61	1,99	2,29	1,87	4,55	1,4	1,12	3,2
400	2,87	1,95	1,98	1,62	2,09	2,41	2,13	5	1,53	1,26	3,67
500	2,97	1,93	2	1,86	1,92	2,51	2,18	4,91	1,63	1,26	3,67
600	3,38	2,2	2,14	1,94	4	2,78	2,31	4,86	1,85	1,4	3,64
700	3,91	2,44	2,18	2,25	3,75	2,85	2,66	5,15	2,16	1,53	3,91
800	4,55	2,77	2,52	3,03	4,24	3,37	2,26	4,38	2,6	1,67	4,06
900	4,74	3,13	2,36	3,41	3,46	2,82	3,24	5,97	3,17	1,98	3,41
1000	5,87	3,01	2,23	4,8	6,11	3,4	3,2	5,31	3,44	1,96	3,23
1100	6,89	4,02	3,31	5	7,91	4,99	3,64	8,73	4,06	2,48	3,6
1200	8,95	4,8	4,46	5,43	9,47	4,55	4,46	8,73	5,63	2,92	3,04
1300	9,32	5,21	3,66	5,6	9,61	4,05	4,93	8,73	6,38	3,06	4,76
1400	10,95	6,06	9,78	5,77	10,63	4,71	5,7	8,73	7,35	3,88	5,12
1500	11,95	6,23	7	7,89	11,49	4,68	6,31	7,63	9,18	3,76	5,06
Ao	236,08	215,18	222,34	189,91	211,05	203,61	228,68	244,93	196,49	204,98	135,43

Tabela D2 – Ensaios de purificação da inulinase resultados em atividade (U/mL) em cada fração coletada na etapa de lavagem.

volume (mL)	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensaio6	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
10	0 5,8	6 2,84	6,61	4,14	5,01	2,7	7 3,06	5 3,86	5,12	2,03	3 2,71
20	0 1,9	7 0,66	1,67	0,65	1,32	2 0,9	9 0,98	3 1,37	0,98	8 0,12	2 0,59
30	0 0,8	7 0,25	0,42	0,19	0,22	2 0,22	2 0,61	0,91	0,31	0,08	3 0,19
40	0 0,4	6 0,1	0,11	0,19	0,05	5 0,28	3 0,13	3 0,34	0,1	0,07	7 0,37
50	0 0,1	4	0,11					0,56)		0,17
60	0 0,0	6	0,1								0,22
70	0 0,1	2									0,26
80	0										0,47
90	0										0,13

volume	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensaio6	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0,002	0,003	0,002	0,000	0,003	0,007	0,003	0,010	0,002	0,002	0,013
200	0,008	0,008	0,006	0,007	0,008	0,011	0,008	0,018	0,006	0,006	0,022
300	0,011	0,008	0,008	0,008	0,009	0,011	0,008	0,019	0,007	0,005	0,024
400	0,012	0,009	0,009	0,009	0,010	0,012	0,009	0,020	0,008	0,006	0,027
500	0,013	0,009	0,009	0,010	0,009	0,012	0,010	0,020	0,008	0,006	0,027
600	0,014	0,010	0,010	0,010	0,019	0,014	0,010	0,020	0,009	0,007	0,027
700	0,017	0,011	0,010	0,012	0,018	0,014	0,012	0,021	0,011	0,007	0,029
800	0,019	0,013	0,011	0,016	0,020	0,017	0,010	0,018	0,013	0,008	0,030
900	0,020	0,015	0,011	0,018	0,016	0,014	0,014	0,024	0,016	0,010	0,025
1000	0,025	0,014	0,010	0,025	0,029	0,017	0,014	0,022	0,018	0,010	0,024
1100	0,029	0,019	0,015	0,026	0,037	0,025	0,016	0,036	0,021	0,012	0,027
1200	0,038	0,022	0,020	0,029	0,045	0,022	0,020	0,036	0,029	0,014	0,022
1300	0,039	0,024	0,016	0,029	0,046	0,020	0,022	0,036	0,032	0,015	0,035
1400	0,046	0,028	0,044	0,030	0,050	0,023	0,025	0,036	0,037	0,019	0,038
1500	0,051	0,029	0,031	0,042	0,054	0,023	0,028	0,031	0,047	0,018	0,037

Tabela D3 – Resultados da etapa de adsorção dos ensaios de purificação (relação da atividade da fração e a atividade inicial do caldo A/Ao)

Fração (15 mL)	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensaio6	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
19	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	479,87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	4929,51	0,35	0	0,56	0	0	0,05	0	0	0	0
22	1686,19	0,47	0	0,35	0	0,46	978,09	0,04	0	0	0
23	587,99	58,96	0	0,5	0	0,42	644,71	0,09	0	0	0
24	177,61	1631,06	0,02	0,55	0,62	10,36	2818,55	0,05	1,92	1,69	0,52
25	57,92	1071,76	0,04	0,8	1633,82	5083,3	849,7	0,03	2837,26	2380,69	1001,93
26	27,72	190,11	58,41	80,08	14492,23	1763,31	282,13	5,81	4942,33	3932,1	3836,85
27	15,22	195,07	4920,75	3798,27	3419,17	2121,49	98,36	4612,97	1757,27	2211,62	1345,43
28	7,86	62,98	4568,08	2765,76	975,33	627,08	43,37	7697,97	561,16	619,73	403,03
29	4,25	30,8	1501,02	920,96	346,05	252,37	21,99	2168,32	247,12	236,34	161,03
30	2,62	19,64	496,48	380,97	135,55	85,41	8,51	171,92	104,97	103,58	57,51
31	1,63	5,72	181,29	148,15	60,06	33,06	4,74	176,33	35,75	40,27	23,72
32	0,27	2,13	69,71	51,02	25,73	6,21	3,25	92,85	17,16	21,94	11,52
33	0,23	1,5	29,87	16,47	12,18	2,16	1,53	45,02	10,18	12,95	6,17
34	0,19	0,74	15,24	3,49	6,39	0,9	1,12		5,49	8,01	4,3
35	0,11	0,31	4,72	4	2,95	0,5			2,46	4,47	2,56
36	0,11	0,25	3,39	2,19	1,73	0,22			1,77	3,58	1,94
37		0,47	2,42	2,16	1,17				1,13	2,76	1,12
38		0,41	1,36	1,45	0,76				0,7	2,35	0,83
39			0,96	0,89	0,56				0,41	1,6	0,72
40			0,65	0,62	0,37				0,29	1,39	0,68
41			0,54	0,33	0,3				0,22	1,27	0,85
42			0,41	0,35					0,11		0,51
43			0,21								
44			0,22								
45			0,14								

Tabela D4 - Resultados da etapa de eluição dos ensaios de purificação (atividade (U/mL) nas frações coletadas que apresentaram atividade de hidrólise).

Volume (mL)	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensaio6	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
100	23554	21452	22191	18986	21037	20224	22796	24246	19609	20385	13324
200	23416	21340	22094	18855	20932	20143	22689	24064	19539	20386	13196
300	23358	21342	22067	18830	20906	20132	22681	24038	19509	20372	13180
400	23321	21323	22036	18829	20896	20120	22655	23993	19496	20372	13133
500	23311	21325	22034	18805	20913	20110	22650	24002	19486	20358	13133
600	23270	21298	22020	18797	20705	20083	22637	24007	19464	20345	13136
700	23217	21274	22016	18766	20730	20076	22602	23978	19433	20331	13109
800	23153	21241	21982	18688	20681	20024	22642	24055	19389	20300	13094
900	23134	21205	21998	18650	20759	20079	22544	23896	19332	20302	13159
1000	23021	21217	22011	18511	20494	20021	22548	23962	19305	20250	13177
1100	22919	21116	21903	18491	20314	19862	22504	23620	19243	20206	13140
1200	22713	21038	21788	18448	20158	19906	22422	23620	19086	20192	13196
1300	22676	20997	21868	18431	20144	19956	22375	23620	19011	20110	13024
1400	22513	20912	21256	18414	20042	19890	22298	23620	18914	20122	12988
1500	22413	20895	21534	18202	19956	19893	22237	23730	18731	20498	12994
Total (U)	345989	317975	328798	279703	308667	300519	338280	358451	289547	304529	196983

Tabela D5 – Resultado em unidades de inulinase (U) de cada fração da etapa de adsorção. A última linha da tabela corresponde a quantidade de enzima (U) que ficou adsorvida na resina na etapa de alimentação.

Tabela D6 – Quantidade de inulinase perdida (U) em cada fração coletada na etapa de lavagem dos ensaios de purificação.

Volume (mL)	ensaio 1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensai06	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
100	586	284	661	414	501	270	306	386	512	203	271
200	197	66	167	65	132	90	98	137	98	12	59
300	87	25	42	19	22	22	61	91	31	8	19
400	46	10	11	19	5	28	13	34	10	7	37
500	14	0	11	0	0	0	0	56	0	0	17
600	6	0	10	0	0	0	0	0	0	0	22
700	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
Total (U)	948	385	902	517	660	410	478	704	651	230	511

Fração (15mL)	ensaio1	ensaio2	ensaio3	ensaio4	ensaio5	ensaio6	ensaio7	ensaio8	ensaio9	ensaio10	ensaio11
19	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	7198,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	73942,65	5,25	0	8,4	0	0	0,75	0	0	0	0
22	25292,85	7,05	0	5,25	0	6,9	14671,35	0,6	0	0	0
23	8819,85	884,4	0	7,5	0	6,3	9670,65	1,35	0	0	0
24	2664,15	24465,9	0,3	8,25	9,3	155,4	42278,25	0,75	28,8	25,35	7,8
25	868,8	16076,4	0,6	12	24507,3	76249,5	12745,5	0,45	42558,9	35710,35	15028,95
26	415,8	2851,65	876,15	1201,2	217383,5	26449,65	4231,95	87,15	74134,95	58981,5	57552,75
27	228,3	2926,05	73811,25	56974,05	51287,55	31822,35	1475,4	69194,55	26359,05	33174,3	20181,45
28	117,9	944,7	68521,2	41486,4	14629,95	9406,2	650,55	115469,6	8417,4	9295,95	6045,45
29	63,75	462	22515,3	13814,4	5190,75	3785,55	329,85	32524,8	3706,8	3545,1	2415,45
30	39,3	294,6	7447,2	5714,55	2033,25	1281,15	127,65	2578,8	1574,55	1553,7	862,65
31	24,45	85,8	2719,35	2222,25	900,9	495,9	71,1	2644,95	536,25	604,05	355,8
32	4,05	31,95	1045,65	765,3	385,95	93,15	48,75	1392,75	257,4	329,1	172,8
33	3,45	22,5	448,05	247,05	182,7	32,4	22,95	675,3	152,7	194,25	92,55
34	2,85	11,1	228,6	52,35	95,85	13,5	16,8		82,35	120,15	64,5
35	1,65	4,65	70,8	60	44,25	7,5			36,9	67,05	38,4
36	1,65	3,75	50,85	32,85	25,95	3,3			26,55	53,7	29,1
37		7,05	36,3	32,4	17,55				16,95	41,4	16,8
38		6,15	20,4	21,75	11,4				10,5	35,25	12,45
39			14,4	13,35	8,4				6,15	24	10,8
40			9,75	9,3	5,55				4,35	20,85	10,2
41			8,1	4,95	4,5				3,3	19,05	12,75
42			6,15	5,25					1,65		7,65
43			3,15								
44			3,3								
45			2,1								
Total	119691	49091	177839	122699	316725	149809	86342	224571	157916	143795	102918

Tabela D7 – Quantidade de inulinase (U) coletada em cada fração de 15mL durante os ensaios de purificação da inulinase em resina Streamline DEAE. A ultima linha da tabela corresponde a quantidade total de enzima recuperada em cada ensaio (1 a 11).

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11
Total de											
enzima	345041	317590	327896	279186	308007	300109	337802	357747	288896	304299	196472
adsorvida (U)											
Total de											
enzima	354120	322770	333510	284865	316575	305415	343020	367395	294735	307470	203145
alimentada (U)											
Total de											
enzima	110600 7	40000.05	177820	122609 9	2167246	1/00/00 0	96241 5	224571	157015 5	142705 1	102018 2
recuperada na	119090,7	49090,93	1//039	122090,0	510724,0	149000,0	00341,3	224371	137913,5	143793,1	102916,5
eluição (U)											
% de enzima											
recuperada	35	15	54	44	103	50	26	63	32	55	47
(adsorvida)											
% de enzima											
recuperada	34	15	53	43	100	49	25	61	31	54	47
(alimentada)											

Tabela D8 Adsorção e recuperação da inulinase durante os ensaios de purificação (1 a 11) em resina Streamline DEAE.

Cromatogramas dos ensaios de purificação da etapa de eluição



Figura D1 - Cromatograma do ensaio 1 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 5,5, volume de 400 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D2 - Cromatograma do ensaio 2 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 7,0, volume de 400 mL e com gradiente salino de NaCl de 1 M.



Figura D3 - Cromatograma do ensaio 3 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 5,5, volume de 900 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D4 - Cromatograma do ensaio 4 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 7,0, volume de 900 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D5 - Cromatograma do ensaio 5 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 5,2, volume de 650 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D6 - Cromatograma do ensaio 6 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 7,3, volume de 650 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D7 - Cromatograma do ensaio 7 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 6,25, volume de 300 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D8 - Cromatograma do ensaio 8 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 6,25, volume de 1.000 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D9 - Cromatograma do ensaio 9 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 6,25, volume de 650 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D10 - Cromatograma do ensaio 10 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 6,25, volume de 650 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.



Figura D11 - Cromatograma do ensaio 11 de purificação da inulinase (etapa da eluição) em coluna Streamline DEAE, eluição com pH 6,25, volume de 650 mL e com gradiente salino de NaCl 1 M.