

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

**Estudo da otimização da produção de inulinase por
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 em meios industriais
pré-tratados**

Helen Treichel

Mestre em Engenharia de Alimentos (UNICAMP)

Engenheira de Alimentos (FURG)

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da UNICAMP
para obtenção do Título de Doutor
em Engenharia de Alimentos.

Campinas, 2004

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

Treichel, Helen
T717e Estudo da otimização da produção de inulinase por
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 em meios industriais
pré-tratados / Helen Treichel. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.Inulinase. 2.*Kluyveromyces marxianus*. 3.Planejamento
experimental. 4.Pré-tratamento. I.Rodrigues, Maria Isabel.
II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

CARS-FEA

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues
Orientadora – DEA/FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant
Membro Titular – DCA/FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça S. Andrietta
Membro Titular – CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. Jonas Contiero
Membro Titular – UNESP

Prof^a. Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Membro Titular – FURG

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Membro Suplente – DEA/FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina B. Currelero
Membro Suplente – UNIP

Dedicatória

A minha mãe e meu “pai” drasto (Lederly e Francisco),
obrigada por me ensinarem a nunca desistir.

Minha querida irmã Vivian,
obrigada por existir e ser tão especial.

Amo vocês!!!

Agradecimentos

À Profª Maria Isabel

Um mestre funciona como um agente catalisador, cuja simples presença estimula...Ele não pode entregar a você aquilo que conhece, mas pode criar um certo campo de energia no qual suas pétalas podem se abrir, no qual suas sementes são encorajadas, em que você pode criar coragem suficiente para dar o salto, no qual o milagre torna-se possível. (Osho-Zen)

Bel, obrigada pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, através de sua orientação, amizade e compreensão.

À Profª. Lucia Durrant, Profª. Maria da Graça Andrietta, Prof. Jonas Contiero, Profª. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert, Prof. Francisco Maugeri e Profª. Isabel Currello, pelas valiosas correções.

À UNICAMP e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Indústria Carvorite LTDA, pelas amostras de carvão ativo utilizado neste trabalho.

Ao Márcio, pela presença constante e idéias valiosas no desenvolvimento deste trabalho. Serás para sempre um amigo muito especial!!!

À Fernanda, sempre disposta a me ajudar...desculpa incomodar tanto. Sabes o quanto te admiro e respeito...Obrigada por tudo!!!

Ao Luciano, um amigo excelente!

À Fifa, um carinho especial.

À Querida Michele, minha irmãzinha de coração...

À Saartje, Daniel, Olga, Jana, André, Carlos, Lia, Yemiko, Camila, Juliana.
Foi ótimo conviver com vocês no LEB!!!

As grandes amigas: Adriana e Keli. Contem sempre comigo!!!

Aos novos grandes amigos: Eunice, Francine e Marco. No mínimo, vocês são o máximo...

Ao Altemir...chegou no final, mas com certeza veio para ficar. Obrigada por ser meu porto seguro.

À todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E acima de tudo à Deus; sem Ele tudo seria impossível.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 4 |
| 2.1 Inulinases..... | 4 |
| 2.1.1 Produção de inulinase..... | 5 |
| 2.1.2 Caracterização da inulinase..... | 9 |
| 2.1.2.1 Estabilidade com a temperatura e o pH..... | 9 |
| 2.1.2.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e da temperatura na reação e na estabilidade enzimática..... | 11 |
| 2.2 Processos de pré-tratamento..... | 13 |
| 2.3 Purificação da enzima..... | 16 |
| 2.3.1 Purificação de inulinase..... | 17 |
| 2.3.2 Purificação em leito expandido..... | 18 |
| 3. Material e Métodos | 20 |
| 3.1 Substratos Testados..... | 21 |
| 3.1.1 Produção da Enzima Inulinase em frascos agitados..... | 22 |
| 3.1.2 Pré-tratamento com carvão ativo..... | 23 |
| 3.1.3 Pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico..... | 23 |
| 3.1.4 Testes com a terra diatomácea..... | 23 |
| 3.1.5 Estudo cinético com o carvão ativo Carvorite-ANF e com a Água de maceração de milho e o melaço separados..... | 24 |
| 3.2 Planejamentos experimentais para o pré-tratamento do melaço e água de maceração de milho..... | 25 |
| 3.3 Planejamentos experimentais para a otimização da produção da inulinase em frascos agitados..... | 26 |
| 3.4 Ensaios de purificação em leito expandido..... | 27 |
| 3.4.1 Testes de purificação em leito expandido..... | 27 |
| 3.4.2 Preparo da Coluna Streamline 25..... | 27 |
| 3.4.3 Procedimento para regeneração da resina Streamline..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.4 Sistema para a eluição com gradiente salino linear e crescente..... | 29 |
| 3.5 Caracterização parcial da enzima purificada..... | 30 |
| 3.5.1 Temperatura ótima e pH ótimo..... | 30 |
| 3.5.2 Temperatura de estabilidade..... | 31 |
| 3.5.3 pH de estabilidade..... | 32 |
| 3.5.4 Determinação de K_m e $V_{máx}$ | 32 |
| 3.6 Otimização da produção da inulinase em fermentador de bancada | 32 |
| 3.6.1 Fermentação em reator de bancada | 33 |
| 3.6.2 Ensaios preliminares em Reator de Bancada | 33 |
| 3.6.3 Planejamento Experimental do tipo Plackett Burman em Reator de Bancada | 34 |
| 3.6.4 Planejamento Experimental Completo em Reator de Bancada..... | 34 |
| 3.7 Metodologia analítica | 35 |
| 3.7.1 Determinação da Atividade Enzimática..... | 35 |
| 3.7.2 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) | 35 |
| 3.7.3 Determinação de proteína..... | 36 |
| 3.7.4 Determinação de Nitrogênio Total..... | 36 |
| 3.7.5 Determinação de Massa Seca | 36 |
| 3.7.6 Determinação de pH | 36 |
| 4. Resultados e Discussão | 37 |
| 4.1 Pré-tratamento de substratos industriais: Ensaios preliminares..... | 37 |
| 4.2 Cinética da produção de inulinase no meio de cultura pré-tratado com carvão ativo ANF [®] - Carvorite | 41 |
| 4.3 Planejamentos fatoriais para o pré-tratamento | 43 |
| 4.4 Otimização da produção da inulinase em frascos agitados: Estudo da composição do meio de cultivo contendo melaço e água de maceração de milho pré-tratados e extrato de levedura | 49 |
| 4.4.1 Primeiro planejamento fatorial completo | 49 |
| 4.4.2 Segundo planejamento fatorial completo | 55 |
| 4.4.3 Terceiro planejamento fatorial completo | 60 |
| 4.4.4 Cinética de fermentação do meio otimizado em frascos agitados..... | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5 Ensaio de purificação da enzima inulinase | 66 |
| 4.6 Caracterização parcial da enzima | 68 |
| 4.6.1 Temperatura ótima e pH ótimo..... | 68 |
| 4.6.2 Influência da temperatura de estabilidade para a enzima inulinase | 70 |
| 4.6.3 Influência do pH no estudo da estabilidade da enzima inulinase | 74 |
| 4.6.4. Determinação de K_m e $V_{máx}$ | 76 |
| 4.7 Otimização da produção de inulinase em fermentador de bancada | 79 |
| 4.7.1 Ensaio preliminares | 79 |
| 4.7.2 Planejamento experimental do tipo Plackett Burman | 82 |
| 4.7.3 Planejamento experimental completo para otimização da produção de inulinase em fermentador de bancada..... | 85 |
| 4.7.4 Cinética de fermentação do meio otimizado em reator de bancada..... | 88 |
| 5. Conclusões | 90 |
| 6. Sugestões para Trabalhos Futuros..... | 92 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 93 |

RESUMO

A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina e é também utilizado na produção de frutooligossacarídeos, produto utilizado como novo ingrediente funcional em alimentos, sendo considerado um alimento prebiótico. Hoje a obtenção desta enzima no mercado exterior é realizada principalmente através da inulina como fonte de substrato, sendo esta relativamente caro. No Brasil, a produção desta enzima a partir de resíduos de cana de açúcar e de milho (melaço e água de maceração de milho) poderá ter grande apelo econômico, devido à abundância e ao baixo custo destes subprodutos. Esta redução no custo já vem sendo verificada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – UNICAMP, utilizando meios industriais, onde se tem obtido atividades enzimáticas superiores às obtidas com meio sintético. No entanto, os meios industriais contêm normalmente substâncias inibidoras e materiais em suspensão, necessitando um pré-tratamento de forma a clarificar e retirar compostos indesejáveis do meio sem provocar prejuízos na fermentação, visando a viabilidade operacional da fase de recuperação e purificação da enzima. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral o estudo da produção da inulinase em meios industriais pré-tratados por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Inicialmente estudou-se diferentes pré-tratamentos, definindo-se o uso do carvão ativo para cada substrato industrial individualmente, como o mais adequado. Após definido o pré-tratamento otimizou-se a produção da enzima em frascos agitados. Para este estudo utilizou-se três planejamentos fatoriais completos seqüenciais, sendo alcançada uma atividade enzimática de 1300 U/mL em 72 horas de fermentação, com um meio contendo 150 g/L de melaço, 50 g/L de água de maceração de milho e 6 g/L de extrato de levedura. Após esta etapa verificou-se através de ensaios preliminares a viabilidade de purificação da enzima em leite expandido a partir do caldo bruto fermentado e caracterizou-se parcialmente a inulinase obtida. Partiu-se então para um aumento de escala em fermentador de bancada, onde foram realizados dois planejamentos experimentais. Primeiramente um planejamento do tipo Plackett Burman (Screening Design), seguido de um planejamento completo de segunda ordem através do qual foi possível a otimização da produção da inulinase obtendo-se uma atividade enzimática de 1300 U/mL com concentração de melaço de 250 g/L, água de maceração de milho 80 g/L, extrato de levedura em 6 g/L, agitação e aeração de 300 rpm e 1,5 vvm respectivamente, temperatura de 36°C e um pH inicial de 5,0.

ABSTRACT

Inulinase is an enzyme relevant to fructose production by enzymatic hydrolysis of inulin. This enzyme is also used in the production of fructooligosaccharides that may be used as a new food functional ingredient. Commercial inulinase is currently obtained using inulin as substrate, which is a relatively expensive raw material. In Brazil, the production of this enzyme using residues of sugarcane and corn industry (molasses and corn steep liquor) is economically attractive, due to the high amount and low cost of such wastes. The reduction of process costs has already been verified at the Laboratory of Bioprocess Engineering – UNICAMP, where it was shown that higher enzymatic activities may be obtained with industrial rather than the synthetic medium. However, industrial media usually contain inhibitory compounds and suspended matter, thus demanding a pretreatment to clarify and remove the undesirable compounds. The pretreatment of fermentation media could also help the downstream processing for enzyme recovery and purification, though care should be taken on the choice of pretreatment process to avoid loss of fermentation yield. In this context, the aim of this work was the assessment of inulinase production using pretreated industrial media by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Firstly, different pretreatments of the fermentation medium were investigated. Adsorption by activated coal was found to be the most appropriate process to pretreat the industrial medium. Enzyme production in shaken flasks was optimized after determining the best pretreatment process. In this study three complete factorial designs were performed, yielding enzymatic activities as high as $1,300 \text{ U.mL}^{-1}$ in 72 h of fermentation, obtained by fermentation of a medium containing 150 g.L^{-1} of molasses, 50 g.L^{-1} of corn steep liquor and 6 g.L^{-1} of yeast extract. Preliminary experiments were carried out to investigate the possibility of enzyme purification in an expanded bed Streamline DEAE resine. The production of the enzyme was scaled up in a bench bioreactor by two experimental designs. A screening design (Plackett-Burman) was used to assess the significant factors that influence the process. A second order complete experimental design was then performed to optimize inulinase production in the bioreactor. The optimized medium contained 250 g.L^{-1} of molasses, 80 g.L^{-1} of corn steep liquor and 6 g.L^{-1} of yeast extract and enzymatic activities $1,300 \text{ U.mL}^{-1}$ of inulinase in a bioreactor operating at a stirring and aeration rate of 300 rpm and $1.5 \text{ L of air. (L of medium)}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectively.

1. Introdução

As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando-se a inulina como matéria-prima (Ettalibi & Baratti, 1987). A produção de frutose por hidrólise da inulina é mais vantajosa do que a produção convencional a partir do amido. A reação enzimática com o uso da inulinase é simples, e forma produtos com 95% de frutose. Por outro lado, a produção convencional de frutose inclui três etapas enzimáticas: a ação da α -amilase, amiloglicosidase 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 inulinases também têm sido utilizadas na produção de frutooligossacarídeos (Kim, *et al.*, 1997). Os frutooligossacarídeos têm atraído especial atenção pelo aumento da demanda no consumo de alimentos saudáveis ou ingredientes de alimentos considerados saudáveis, como são designados os frutooligossacarídeos (Chien *et al.*, 2001). A ingestão de frutooligossacarídeos estimula o aumento da população de bifidobactérias que é o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal (Gibson & Wang, 1994). Recentemente Flamm *et al.* (2001) estudaram como a inulina se relaciona com o conceito de fibra dietética. A inulina apresenta características comuns às fibras dietéticas sendo sacarídeos de origem vegetal, resistentes a digestão e absorção no intestino delgado, que sofrem fermentação no cólon para produzir ácidos graxos de cadeia curta que são absorvidos e metabolizados em várias partes do corpo. Além disso, a inulina também não é metabolizada na via glicolítica ou armazenada diretamente como glicogênio.

Diversos microrganismos podem ser utilizados para produzir inulinase, e a seleção destes dependerá de suas características fisiológicas. Além disso, para o uso de algum microrganismo deve-se considerar o fato desses pertencerem ao grupo GRAS ("Generally Recognized as Safe") e serem aceitos pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos para produtos alimentícios

(Schneider, 1998). Neste contexto encontra-se o gênero *Kluyveromyces*, o que o torna muito interessante comercialmente.

Estudos recentes com microrganismos da linhagem *Kluyveromyces sp.* (*Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*) mostraram que a enzima inulinase apresentava tanto atividade hidrolítica quanto atividade de transfrutoseilação. A vantagem de utilizar microrganismos do gênero *Kluyveromyces sp.* consiste na alta produtividade da enzima inulinase, tanto em meio sintético (Kalil, 2001; Vranesic *et al.*, 2002 e Santos *et al.*, 2002) quanto em meio industrial (Treichel, 2001; Makino *et al.*, 2002 e Kabke, 2002).

No Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB - UNICAMP), a produção de inulinase vem sendo estudada há alguns anos. A produção desta enzima pelo *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045 foi melhorada de 9 para 120 U/mL com o uso de meios sintéticos e atingiu 130 U/mL com o uso de meio industrial, no qual os substratos eram melaço e água de maceração de milho. Desta forma, Treichel (2001) reduziu o custo do meio de produção de R\$ 14,00/L para R\$ 0,28/L, usando o meio complexo (água de maceração de milho e melaço) mantendo a mesma atividade enzimática nas condições otimizadas com o meio sintético. Foi realizada uma seleção de outras linhagens de *Kluyveromyces* como produtoras de inulinases (Makino *et al.*, 2002). A linhagem *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 atingiu cerca de 1000U/mL em meio industrial (Kabke, 2002).

Na produção das enzimas através de processos biotecnológicos, a tendência atual é ver estes processos de forma integrada, para que a otimização seja realizada desde as etapas iniciais do preparo do meio e condições de cultura (“upstream”) até a fase de purificação (“downstream”). Os meios industriais, como o melaço e a água de maceração de milho, utilizados para produção de enzimas são bastante complexos, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção da inulinase, e principalmente, dificultar a etapa de recuperação e purificação da enzima. Assim, o estudo do pré-tratamento

adequado do meio de cultivo tem grande relevância, para que a viabilidade econômica do produto seja considerada em todas etapas para sua obtenção.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção da inulinase em meios industriais pré-tratados através do desenvolvimento das seguintes etapas:

1. Estudo preliminar de diferentes pré-tratamentos para os substratos industriais.
2. Planejamentos experimentais para definição das melhores condições para o pré-tratamento.
3. Otimização da produção da inulinase em meio industrial pré-tratado em frascos agitados através de três planejamentos experimentais seqüenciais.
4. Ensaios preliminares em coluna de leito expandido para purificação da inulinase diretamente do caldo fermentado bruto utilizando-se meios industriais pré-tratados.
5. Caracterização parcial da enzima livre purificada.
6. Otimização da produção da inulinase em fermentador de bancada através de Planejamento Experimental do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) seguido por Planejamento Experimental Completo.

2. Revisão Bibliográfica

Devido à facilidade de produção, diversas enzimas são obtidas a partir de fermentações microbianas, suplantando a produção de origem vegetal. Isto se deve ao fato das enzimas necessitarem um tempo curto de produção, poderem ser obtidas em qualquer época do ano e utilizarem normalmente substratos de baixo custo. Neste contexto pode-se citar as inulinases (Schneider, 1998; Kalil, 2001; Makino *et al.*, 2002 e Santos *et al.* 2002).

As inulinases são potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose utilizando inulina como matéria-prima e na síntese de oligossacarídeos (Ettalibi & Baratti, 1987; Kim *et al.*, 1997).

2.1 Inulinases

Inulinases são 2,1- β -D frutano furohidrolase (EC 3.2.1.7.), que convertem inulina, um polímero de frutose ligadas em β -2,1, em frutose. A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose, os quais tem assumido grande importância como agentes responsáveis pela doçura em alimentos e bebidas (Poorna & Kulkarni, 1995).

As inulinases podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que contém inulina, ou através de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Dentre as leveduras, aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* tem despertado grande interesse industrial (Schneider, 1998).

A inulinase pode hidrolisar a sacarose, inulina e levanas, enquanto a invertase verdadeira hidrolisa fortemente a sacarose, possuindo uma atividade muito fraca ou quase nenhuma sobre a inulina (Kushi *et al.*, 1996).

Diversas inulinases microbianas têm sido parcialmente purificadas e suas propriedades foram revisadas por Vandamme & Derycke (1983). Em contraste com as enzimas das plantas, inulinases microbianas apresentam atividade sobre a sacarose, bem como sobre a inulina. É geralmente aceito que a taxa de atividade

sobre a sacarose em relação a inulina (S/I) caracteriza a enzima: para uma inulinase a taxa S/I é menor do que 100 (Ettalibi & Baratti, 1987).

A inulina pode ser hidrolisada por dois tipos de inulinasas: exoinulinase e endoinulinase. A completa hidrólise da inulina por exoinulinase produz 95% de xarope de frutose sob condições otimizadas. A endoinulinase age na ligação interna da inulina, liberando inulo-triose, -tetraose e -pentose como principais produtos. A maioria das inulinasas bacterianas são exoenzimas. *Aspergillus ficuus*, um dos fungos industriais mais importantes, também produz endoinulinase além da exo. Devido ao sinergismo de ação das duas enzimas, frutose é obtida facilmente, porém é difícil determinar se as enzimas coexistem. Também é difícil separar as duas enzimas completamente por métodos convencionais já que elas possuem propriedades similares (Jing *et al.*, 2003).

2.1.1 Produção de inulinase

As leveduras tem sido muito estudadas para a produção de inulinase, pois oferecem vantagens sobre os fungos no processo de fermentação por sua natureza unicelular e as do gênero *Kluyveromyces* possuem o “GRAS” (“Generally Regarded Safe”) que as fazem aceitas para a produção de compostos farmacêuticos e alimentícios (Hensing *et al.*, 1994).

Gupta *et al.* (1994) produziram inulinase de *Kluyveromyces fragilis* NCIM 3217, obtendo atividade máxima após 36 horas, a 25-27°C, em um meio com 1% de inulina como fonte de carbono. Após estudos do crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono: 1% de frutano, 1% de sacarose, 1% de frutose ou 1% de glicose, verificaram que a máxima produção de inulinase foi com o meio com 1% de frutano, seguido daquele contendo sacarose. Em testes feitos com meios compostos por diferentes fontes de nitrogênio, observaram que a peptona forneceu os melhores resultados. Estudando o efeito da adição de fosfatos inorgânicos, observaram que a adição da NaH_2PO_4 (0,25% (p/v)) + KH_2PO_4 (0,25% (p/v)) em meio contendo 1% de inulina, conduziu a um aumento significativo na produção de inulinase extracelular. A máxima atividade observada

foi de 7UI/mL, com 36h de crescimento, havendo após um declínio deste valor, devido, provavelmente, à desnaturação da enzima presente no meio por enzimas proteolíticas excretadas pelo microrganismo.

Poorna & Kulkarni (1995) estudaram a produção de inulinase com *Aspergillus niger* utilizando meio sintético e quatro diferentes fontes de carbono. Foram utilizadas na concentração de 2%, glicose, frutose, sacarose e inulina. A atividade da inulinase, concentração de biomassa, pH do meio e açúcares redutores foram avaliados. A inulina foi a melhor fonte de carbono, nas condições utilizadas, seguida pela sacarose. No caso da frutose e da glicose não houve produção de enzima. Com a inulina como fonte de carbono, obteve-se o máximo de produção em 60 horas, 80U/mL, e após houve um decréscimo na atividade da enzima para 28U/mL em 120 horas de experimento.

Cruz-Guerrero *et al.* (1995) produziram inulinase com *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 usando como fontes de carbono inulina e glicerol, separadamente. Esta inulinase foi posteriormente caracterizada, e foi determinado que esta possui uma maior afinidade por inulina. Além disso, verificou-se que a enzima possui estabilidade a altas temperaturas, com uma vida média de 180 minutos a 50°C.

Na produção contínua de inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046, em meio com limitação de carbono, Kushi *et al.* (1996) verificaram que a síntese de inulinase em fermentação contínua é regulada pela concentração da açúcar residual no meio de alimentação.

Schneider (1998) estudou a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e constatou que a faixa de temperatura entre 32-37°C foi a que proporcionou melhor crescimento celular e atividade enzimática total, sendo o controle de pH do meio em 4,5 favorável em relação ao meio sem controle. Concentração da inulina acima de 20g/L não é favorável à produção da enzima. A utilização de peptona não foi imprescindível à formação da enzima. A presença de extrato de levedura é fundamental para o crescimento; concentrações crescentes de uréia ou sulfato de amônio ocasionaram uma diminuição na formação de células e na síntese de inulinase.

Santos (1998) trabalhou com três meios distintos, para obtenção de inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045. Optou por aquele que continha 30g/L de sacarose, 10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona e 5g/L de K_2HPO_4 , sendo o pH inicial de 3,5. Obteve uma atividade final de 7,54UI/mL e boa reprodutibilidade quando comparado ao meio que continha água de maceração de milho e melaço, apesar deste último em algumas fermentações atingir maior atividade. As condições foram: temperatura de 30°C, aeração 0,2-0,3vvm, agitação moderada e tempo de fermentação de 18 horas.

A otimização de meio de cultivo pelo método clássico envolve variação de apenas uma variável independente (tal como, nutriente, temperatura, pH) enquanto fixam-se outras em determinados níveis. Um método mais prático é o planejamento fatorial fracionário (Poorna & Kulkarni, 1995).

Santisteban-Silva (2001) estudou a agitação, aeração e tipo de agitador para otimização da produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em fermentador de bancada, utilizando o meio otimizado por Kalil (2001). Foi verificado que velocidades de agitação e condições de aeração superiores a 450 rpm e 1 vvm implicavam em um decréscimo da atividade enzimática. Em relação ao tipo de agitador, dentre os estudados (Rushton, hélice naval e pás inclinadas), o agitador do tipo pás inclinadas apresentou melhores resultados, atingindo uma atividade de 176 U/mL.

Medeiros *et al.* (1999) estudaram através da técnica de planejamento de experimentos a influência da concentração de substrato, temperatura e pH na determinação da atividade enzimática. A concentração de sacarose não apresentou efeito significativo na faixa estudada (2 % - 5 %) e as condições ótimas para pH e temperatura foram de 61°C e 4,7 respectivamente. A atividade enzimática da inulinase produzida por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 atingiu 110 U/mL.

Kalil *et al.* (2001) utilizaram a técnica de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta para otimizar o meio de cultura para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*. Ao invés de inulina, a sacarose foi usada como

fonte de carbono. Inicialmente, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) para determinar as variáveis mais relevantes na produção da enzima. Foram estudadas as variáveis sacarose, peptona, extrato de levedura, pH e K_2HPO_4 , e todas se mostraram significativas. De acordo com os resultados obtidos, as condições ótimas para produção da enzima foram: 14g/L de sacarose, 10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona, 1g/L de K_2HPO_4 e pH inicial de 3,5. A atividade enzimática nas condições de cultura foi de 127U/mL, o que representa uma atividade 29 vezes maior do que nas condições anteriormente estudadas por Santos (1998).

Treichel (2001), realizou quatro planejamentos fatoriais seqüenciais, sendo as variáveis independentes o melaço, a água de maceração de milho (AMM) e o extrato de levedura, e otimizou um meio de produção para a enzima inulinase com a seguinte composição: melaço 90g/L, AMM 45g/L, extrato de levedura 4g/L, K_2HPO_4 1g/L e pH 3,5. Com este meio foi obtida uma atividade enzimática de 138U/mL, ultrapassando assim o valor atingido com o meio sintético (127U/mL). Também foi realizado um estudo no qual a máxima atividade atingida foi de 113 U/mL com o meio composto de melaço (80g/L), água de maceração de milho (50g/L) e Prodexlac[®] (hidrolisado de levedura fabricado pela Indústria Prodesa, Mogi Mirim – SP) (4,5g/L), pH 3,5 e temperatura de 30°C. O custo final da enzima produzida no meio otimizado por Treichel (2001) foi de aproximadamente US\$ 38/5000U de enzimas, considerando-se o custo relativo ao meio de cultivo. Comparando-se estes valores com os preços da inulinase comercial da Megazyme (exo-inulinase de *Aspergillus niger* US\$120/5000 U e endo-inulinase de *Aspergillus niger* US\$ 100/200 U) confirma a viabilidade do processo para aplicação industrial.

Makino *et al.* (2002) estudaram a produtividade da inulinase utilizando várias linhagens de *Kluyveromyces*, obtendo-se altos valores para a atividade enzimática quando comparadas com as linhagens já citadas na literatura. A melhor linhagem foi *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 com uma atividade máxima de 900 U/mL após 72 horas de fermentação. Kabke (2002) otimizou a produção da inulinase em meio industrial utilizando as linhagens de

Kluyveromyces sp. selecionadas por Makino *et al.* (2002) como melhores produtores de inulinase. Atingiu-se atividade máxima de 1000 U/mL para o *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 a pH 5,0 e temperatura de 36°C nas condições de 90 g/L de melaço, 45 g/L de água de maceração de milho e 2 g/L de extrato de levedura em frascos agitados.

2.1.2 Caracterização da inulinase

2.1.2.1 Estabilidade com a temperatura e o pH

Sabendo-se que altas temperaturas (em torno de 50°C) e baixos valores de pH (em torno de 4,0) são condições operacionais de grande interesse industrial, uma vez que diminuem os riscos de contaminação microbiana, melhoram a solubilidade de alguns substratos, como por exemplo inulina, e no preparo de xaropes reduzem a formação de cor, uma característica indesejável, é importante estudar a estabilidade da enzima (Vandamme & Derycke, 1983).

Estudos realizados por estes pesquisadores mostraram que a enzima inulinase de *Kluyveromyces fragilis* apresentou uma máxima atividade a 50°C e pH em torno de 4,5 - 5,0, mantendo-se estável a um pH de 4,0 - 6,0 na temperatura de 50°C.

Cruz-Guerrero *et al.* (1995) caracterizaram a inulinase obtida de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 com relação à atividade sobre a inulina e sacarose e observaram que o pH ótimo foi de 5,0 para ambos os substratos e a temperatura ótima foi de 50°C para a sacarose e 70°C para a inulina. A enzima manteve-se estável a 50°C, perdendo rapidamente a atividade enzimática nas temperaturas de 60 e 70°C.

Rouwenhorst *et al.* (1988) trabalhando com a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 verificaram que a enzima apresentou uma temperatura ótima para a atividade enzimática sobre a sacarose de 70°C e de 50°C sobre a inulina, e um pH de 3,5 para a sacarose e 5,0 para a inulina. A enzima se mostrou estável

quando incubada por 8 horas a 50°C, porém a 60°C a enzima apresentou uma meia vida de 30 minutos.

Schneider (1998) verificou que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 apresentou uma atividade ótima sobre a inulina em temperaturas de 50 a 60°C e pH de 4,5 a 6,0. Estes valores baixos de pH são atrativos para a indústria, pois diminuem o risco de contaminação microbiana. Quanto à estabilidade, a enzima extracelular foi estável em temperaturas inferiores a 55°C, na faixa de pH entre 3,0 e 7,0.

Vários estudos foram realizados sobre a influência da temperatura na atividade da inulinase. Öngel-Baysel *et al.* (1994) estudaram a influência da temperatura na atividade da inulinase de *Aspergillus niger* e verificaram que a enzima apresentava uma máxima atividade a 50°C. Nakamura *et al.* (1997) determinaram para a endo-inulinase de *Penicillium* sp. Tn-88 uma temperatura ótima de 50°C e uma estabilidade de 40°C quando incubaram a enzima durante 30 minutos. A 60°C verificaram que a enzima perdia atividade rapidamente. Outro trabalho sobre a influência da temperatura sobre a inulinase purificada foi realizado por Xiao *et al.* (1989), onde as frações com atividade inulinolítica, denominadas de F2 e F3, apresentaram uma temperatura ótima em torno de 55°C, em tampão fosfato 0,05M e pH 4,6. Para a inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 a temperatura ótima para a hidrólise de sacarose foi de 70°C e 50°C para a inulina.

Santos (2002) realizou estudos para caracterizar a enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. Quanto ao pH, verificou que a enzima livre em tampão acetato de sódio 0,1M apresentou maior atividade em uma faixa de valores de pH (4,4 a 4,8). Nos estudos do efeito da temperatura, obteve as máximas atividades a 63°C. Em relação à estabilidade térmica, observou-se uma meia vida de 228,8 horas a 50°C. A modelagem matemática da atividade em função do tempo e da temperatura se ajustou bem aos dados experimentais e possibilitou prever a temperatura ótima de operação da enzima (53°C).

Gill *et al.* (2003) estudaram a produção de inulinase extracelular por *Streptomyces* sp. GNDU 1. Foram produzidos níveis de enzima em torno de 0,552 UI/mL após 24 horas em pH 7,5 e temperatura 46°C, na presença de 1% de inulina. Temperatura e pH ótimos foram, respectivamente, 60 °C e 5,5. Extrato de levedura foi utilizado como fonte apropriada de nitrogênio, já que o íon amônio é inibidor da produção enzimática.

2.1.2.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e da temperatura na reação e na estabilidade enzimática

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

O módulo da constante cinética K é fortemente dependente da temperatura, influenciando em consequência a atividade enzimática. A constante K, pode ser correlacionada com a temperatura, através da equação de Arrhenius (Equação 1):

$$K(T) = K_0 \exp(-E_a/RT) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: K(T) = constante cinética a temperatura T

E_a = energia de ativação

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

K₀ = constante de proporcionalidade

T = Temperatura absoluta

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

temperatura, sendo sugerida, como uma primeira aproximação para a dependência real da temperatura. Além disso, existe concordância com a teoria das colisões e teoria do estado de transição (Santos, 2002).

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

A estabilidade térmica é dependente das condições do meio em que se encontra a enzima, se está imobilizada e/ou complexada a outro componente e ainda pode ser influenciada pela própria concentração de substrato (Cabral, 1989). As enzimas, como qualquer outra proteína sofrem desnaturação térmica, perdendo sua atividade parcial ou totalmente. Desta forma, é de grande importância o conhecimento da estabilidade térmica no projeto de reatores catalíticos (Santos, 2002).

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

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

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

A enzima, como toda proteína, é composta de vários aminoácidos que possuem grupos laterais básicos, ácidos ou neutros, portanto a enzima pode conter grupos carregados positivamente ou negativamente, a um dado valor de pH. Tais grupos ionizáveis são freqüentemente parte do sítio ativo, já que o mecanismo catalítico ácido-base está ligado a várias enzimas. Desta forma, para que a catálise ocorra, os grupos ionizáveis no sítio ativo devem possuir uma carga particular, o que implica que a enzima cataliticamente ativa só existe em um estado particular de ionização. Assim, a enzima cataliticamente ativa pode ser uma fração maior ou menor da concentração total da enzima em um determinado pH (Contiero, 1992).

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

2.2 Processos de pré-tratamento

Os meios industriais utilizados para produção de enzimas são bastante complexos, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação e purificação. Assim,

um pré-tratamento destes substratos surge como alternativa de forma a clarificar o meio sem provocar prejuízos na fermentação, garantindo maior facilidade na extração e purificação da enzima.

Melaço é um subproduto da indústria de açúcar e é utilizado como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e matéria-prima para a indústria de fermentações (Underfolker citado por Sirianuntapiboon *et al.*, 2004). Sua grande concentração de metais pesados é a causa de um problema crítico na sua utilização em fermentações. A presença desses metais pesados inibe o crescimento de microrganismos, influencia o pH do substrato e está envolvida na inativação de enzimas associadas a biossíntese do produto. O pré-tratamento de melaço de beterraba, com diferentes técnicas, a fim de remover metais pesados, foi feito por Roukas (1998). Resinas catiônicas, tratamento com ácido sulfúrico, tratamento com tricálcio fosfato, ferrocianeto de potássio e EDTA foram usados; os resultados mostraram que o tratamento com ácido sulfúrico foi o que gerou as máximas concentrações do produto estudado.

Kasseno & Kokugan (1997) testaram os efeitos do pré-tratamento do melaço através da microfiltração com uma membrana de cerâmica na fermentação de etanol. Foi testada uma membrana de microfiltração de cerâmica com poros de 0,05 μm de diâmetro na remoção de impurezas do melaço. Os resultados mostraram que cerca de 99,5% de glicose poderiam ser metabolizados pelas células no melaço pré-tratado, enquanto apenas 83,1% de glicose são metabolizados pelas células no melaço não tratado.

Ryan & Johnson (2001) estudaram os efeitos da modificação de uma membrana padrão de diálise, comercialmente disponível, através da redução de seus poros com a deposição de cristais de cálcio octanato na membrana; quando esta é utilizada na remoção da concentração de potássio em melaços destinado à fermentação microbiana. Nas fermentações com melaço, uma concentração ideal de potássio deve ser alcançada, considerando que em níveis maiores ele pode inibir a fermentação, e em níveis menores pode não atender as necessidades requeridas pelo microrganismo para seu crescimento. Uma membrana normal de diálise é um método economicamente viável na remoção de potássio do melaço,

porém resulta em uma grande perda de açúcar no processo de difusão. A membrana modificada é capaz de reduzir a concentração de potássio no melaço, aumentando o rendimento da fermentação, com perdas de açúcares bem menores durante a difusão.

Kim & Shoda (1999) estudaram a clarificação de melaço através de um processo semicontínuo de produção de peroxidase pelo *Geotrichum candidum*. A peroxidase agiu na clarificação de melaço por quatro semanas com 80% de melaço clarificado. Em um segundo teste, o microrganismo foi imobilizado em uma espuma de polietano e o tempo de ação da peroxidase aumentou para mais de oito semanas.

Carr'ere & Blaszhow (2000), desenvolveram um trabalho que tinha como foco a etapa de “upstream” do processo de produção biológico de ácido láctico: a clarificação de caldo de fermentação por microfiltração. Diferentes modos de operação da microfiltração foram comparados em termos de produtividade e da taxa de deposição de resíduos da filtração. A produção esperada não foi atingida durante a microfiltração com valores muito altos de constante de permeabilidade, porque o aumento da pressão da transmembrana foi muito grande. A maior vantagem de operar no modo de constante de permeabilidade foi a pequena taxa de deposição de resíduos quando o modo foi operado com valores abaixo da vazão crítica. Já o modo de pressão de transmembrana constante foi mais conveniente por causa do aumento dos níveis de produtividade e valores moderados de taxa de deposição de resíduos.

Walford (2002), estudou as aplicações da cromatografia de troca iônica na resolução de problemas de processamento de cana-de-açúcar. A cromatografia de troca iônica ofereceu uma técnica simples e confiável, tanto para separação quanto para determinação de íons orgânicos e inorgânicos na mistura complexa. Identificar e quantificar íons presentes em xarope de açúcar são fatores importantes para entender e maximizar a recuperação do açúcar. A escolha do tipo de empacotamento da coluna cromatográfica, da composição da fase móvel e seu pH, e do modo de detecção se mostraram variáveis muito úteis na análise de produtos manufaturados de açúcar; especialmente para a separação dos íons

multivalentes, como o fosfato, e de ácidos orgânicos. A cromatografia de troca iônica possui excelente repetibilidade e recuperação dos compostos das matrizes. Um grande exemplo da aplicação desse método de separação está exatamente na solução de problemas de clarificação de caldos de açúcar. No entanto, é um procedimento de custo ainda elevado.

Sirianuntapiboon *et al.* (2004) estudaram a despigmentação das melanoidinas do melaço testando 170 linhagens de bactérias acetogênicas. Entre elas, a linhagem BP103 foi a que apresentou o melhor resultado quando cultivada a 30°C por cinco dias num meio contendo glicose 30%, extrato de levedura 0,5%, K₃PO₄ 0,1% e MgSO₄ . 7 H₂O 0,05% a pH 6,0. A adição dessa linhagem de bactéria resultou numa descoloração de 73,5 ± 3,5% dos pigmentos do melaço em tratamentos anaeróbios.

Assim, verifica-se através da revisão de literatura que a utilização de resíduos industriais tem tido grande interesse de estudo devido ao apelo ecológico e econômico além de uma ampla aplicação, requerendo, portanto, estudos de clarificação que viabilizem não só a obtenção dos produtos, mas também as etapas de recuperação e purificação dos mesmos sem aumento excessivo no custo do processo .

2.3 Purificação da enzima

Na produção da enzima inulinase através de processos biotecnológicos, após a fermentação são necessárias operações de purificação que devem ser incluídas no custo final do produto. Para minimizar estes custos é importante a escolha de métodos de separação e purificação adequados de modo a se obter um bioproduto comercialmente viável. Um processo que vem recebendo atenção ultimamente é a adsorção de proteínas na presença de biomassa através do uso de leite fluidizado, particularmente o uso de leite expandido.

2.3.1 Purificação de inulinase

Kushi *et al.* (1996) obtiveram inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046. A enzima foi inicialmente dialisada e liofilizada, obtendo-se um fator de purificação de 10,2 vezes. Após a mostra passar por resina DEAE-Trisacryl, a mesma foi novamente dialisada e liofilizada, com um fator final de purificação de 34 vezes. O tampão utilizado na cromatografia foi fosfato de sódio 5mM e a eluição foi feita com gradiente salino de 0,3M.

Cruz-Guerrero *et al.*(1995) produziram inulinase por fermentação com *K. marxianus* CDBB-L-278, em meio contendo 1% de inulina. As células foram separadas por centrifugação (3500rpm, 10min). A inulinase extracelular foi recuperada do sobrenadante por precipitação com acetona a 0°C, adicionando-se o solvente lentamente a 44% (v/v). O precipitado foi filtrado através de filtro de papel e então suspenso em tampão acetato (0,01M, pH5,0) e dialisado contra o mesmo tampão por 24h a 4°C.

A inulinase produzida por Gupta *et al.* (1994) foi obtida através de *K. fragilis* (NCIM 3217). O meio após a fermentação foi centrifugado a 4°C e ao sobrenadante frio, foram adicionados 2 volumes de etanol (95%). O precipitado foi coletado por centrifugação e então dissolvido em tampão acetato de sódio 50 mmol/dm³ (pH 5,4). A inulinase foi posteriormente purificada em Sephadex G 200, DEAE – celulose e CM – celulose. Após a precipitação com etanol e passagem nas colunas, o fator de purificação foi de 26,5 vezes para a inulinase. A enzima da coluna contendo DEAE – celulose foi eluída com 0,1 mol/dm³ de tampão acetato de sódio (pH 5,4).

Pessoa *et al.* (1996) purificaram inulinase, obtida por fermentação com *Candida kefir*, em coluna contendo STREAMLINE DEAE. Verificaram que o pH mais apropriado foi entre 6,5 e 7,5; utilizando tampão Tris – HCl (20mM). A eluição foi realizada com NaCl 0,5M em tampão. Nos testes em leito expandido, obtiveram uma purificação de 5,8 vezes.

A inulinase obtida por fermentação com *Kluyveromyces fragilis* ATCC 12424 foi purificada por Grootwassink & Fleming (1980) através de autólise (13h,

50°C, pH 5-6), seguido de ultrafiltração e precipitação com acetona, obtendo 83% de rendimento e um fator de purificação de 6 vezes.

Santos (1998) trabalhando com inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* purificou a enzima através de precipitação em etanol 70%, ressuspensão do precipitado em tampão 0,05M, pH5,2 e posterior passagem da amostra em coluna de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow. A eluição da enzima foi feita com gradiente salino em tampão fosfato 0,05M pH7,5. Ao final, o fator de purificação foi de 9,2 vezes e a recuperação da enzima de 52%.

Kalil (2001) realizando estudos em coluna de leito expandido, conseguiu uma recuperação de 74% e um fator de purificação de 10,4 vezes. Estes resultados foram obtidos operando-se com uma expansão de 2,0, alimentação a pH 3,5, lavagem a pH 4,1 e eluição do tipo degrau com velocidade de 100cm/h e pH 4,1.

Através da análise dos trabalhos relatados na literatura sobre a purificação de inulinase, observou-se que na maioria deles, várias etapas de recuperação e purificação são realizadas para a obtenção da enzima purificada, processos estes que encarecem o valor do produto final. Assim, alternativas como o uso do leito expandido, que elimina etapas preliminares pela utilização direta do caldo bruto, possui um apelo industrial muito promissor e atraente, pois reduz o tempo total de processo (ganho de produtividade), bem como conduz a um aumento de eficiência global.

2.3.2 Purificação em 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 fixo, apresenta uma maior capacidade de adsorção. Esta adsorção é uma operação unitária de recuperação de bioprodutos presentes em caldos brutos. Em processos em que o produto é extracelular, esta

operação ocorre logo após a fermentação, e no caso de intracelular logo após a ruptura das células (Snow, 1994).

Tradicionalmente a adsorção de proteínas a partir de meios fermentados é feita em leito fixo (adsorção), onde o líquido precisa passar por um tratamento prévio para remoção de particulados. A aplicação de uma alimentação, contendo particulados, em leitos fixos convencionais de adsorvente, resulta em severos problemas operacionais como resultado da retenção de particulados nos espaços do leito. Estes problemas podem se manifestar pelo incremento na queda de pressão através do leito e a formação de uma capa na entrada. No caso da utilização de leitos expandidos, o caldo bruto resultante da fermentação pode ser utilizado diretamente, sem clarificação prévia, com o material particulado passando através do leito sem ser retido, além disto, este processo resulta em um número menor de passos e pode conduzir a menores perdas do produto desejado.

A Figura 1, apresentada por Frej *et al.* (1994) mostra o princípio básico de adsorção em leito expandido. As quatro colunas mostram os diferentes estágios de operação, sendo que as setas indicam a direção do escoamento. O leito é primeiramente estabilizado com uma solução tampão, quando isto ocorre, passa-se o caldo bruto, não clarificado, na mesma vazão que permitiu a estabilização. Segue-se então uma lavagem com tampão até que a leitura UV retorne a linha base, a bomba é então desligada permitindo que o adsorvente assente. O adaptador é empurrado até o topo do leito e a eluição é iniciada.

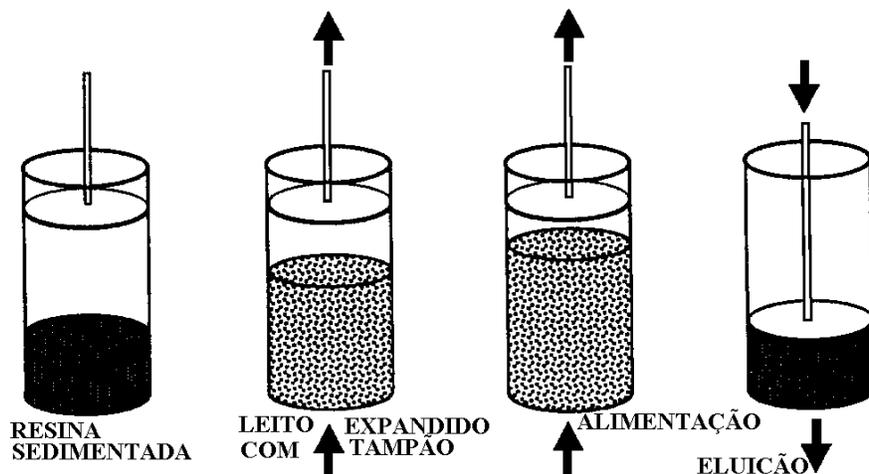


Figura 1. Princípio básico da adsorção em leito expandido

3. Material e Métodos

Neste capítulo são descritos os procedimentos utilizados no desenvolvimento do trabalho. A Figura 2 esquematiza as etapas realizadas.

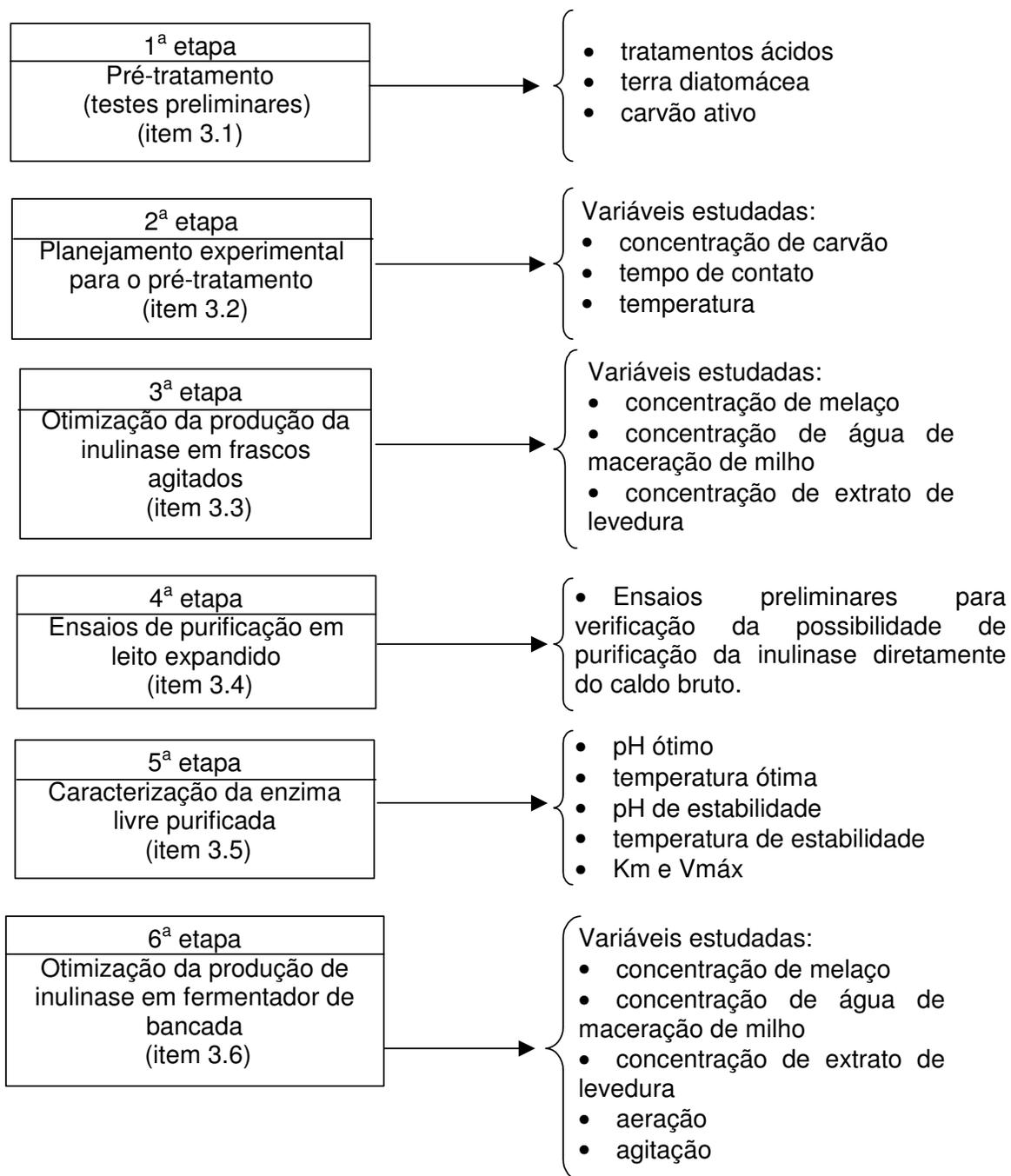


Figura 2. Fluxograma das etapas desenvolvidas

3.1 Substratos Testados

Os substratos industriais utilizados foram melaço, adquirido na Usina Éster na região da Grande Campinas e água de maceração de milho cedida pela Corn Products – Mogi Guaçu.

Os meios industriais (melaço e água de maceração de milho) utilizados para produção de enzima são bastante complexos, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção da inulinase, ou ainda, dificultar sua posterior purificação devido a formação de precipitados no meio de fermentação. Como o meio de cultivo consiste em resíduos industriais como fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, para que este possa ser purificado em coluna de leito expandido, a utilização do meio clarificado é indispensável para não comprometer a recuperação e purificação da enzima na coluna.

Para avaliar os diferentes pré-tratamentos realizados no melaço e na água de maceração de milho foram conduzidos ensaios de fermentação em frascos agitados (item 3.1.1). Em paralelo sempre foi realizada uma fermentação em triplicata com o meio otimizado por Kabke (2002), sem o pré-tratamento, composto por 90 g/L de melaço, 45 g/L de água de maceração de milho e 4g/L de extrato de levedura. Este meio foi utilizado como padrão, por ter uma atividade enzimática otimizada conhecida (em torno de 1000 U/mL), e é chamado de controle durante todo o trabalho.

Nos estudos de pré-tratamento os substratos industriais estavam nas concentrações iguais ao meio controle. Para os ensaios de fermentação após os pré-tratamentos testados, sempre foi adicionado 4g/L de extrato de levedura. O extrato de levedura foi mantido na composição do meio por estar presente no meio controle e ter sido definido como indispensável para a produção da enzima no estudo de otimização (Kabke, 2002).

3.1.1 Produção da Enzima Inulinase em frascos agitados

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi repicado de ágar inclinado de extrato de malte e levedura para tubo de ensaio contendo caldo do mesmo meio, em um volume de 10 mL. O meio foi incubado por 24 h a 30°C. Cada tubo de ensaio foi usado como pré-inóculo. A escolha deste microrganismo levou em consideração o fato do gênero *Kluyveromyces* possuir o “GRAS” (Generally Regarded as Safe), o que o faz aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e também por ser considerado um ótimo produtor de inulinase.

O meio para obtenção do inóculo é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Meio para obtenção do inóculo

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

O pH do meio foi ajustado para 6,8 e preparados Erlenmeyers aletados de 500 mL, contendo 100 mL do mosto. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos. A cada frasco foi adicionado 10 mL de pré-inóculo, e posteriormente o meio foi incubado por 24 h a 30°C e 150 rpm.

A produção da inulinase foi realizada em Erlenmeyers aletados de 500 mL, com 100 mL do meio pré-tratado a ser estudado. A temperatura foi mantida em 36°C (Kabke, 2002) em frascos agitados em agitador orbital PSYCROTHERM (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, N. J.), com rotação de 150 rpm e pH inicial 5,0. A cada frasco foi adicionado 10 % de inóculo. A resposta atividade enzimática foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 h.

3.1.2 Pré-tratamento com carvão ativo

Em ensaios preliminares de pré-tratamento com carvão ativo (Sinth) foram testadas as metodologias citadas abaixo.

Inicialmente utilizou-se carvão ativo em uma concentração de 10 %, e o melaço e a AMM, na concentração que iriam estar no meio de fermentação (meio controle: 90 g/L e 45 g/L, respectivamente), foram submetidos à agitação de 150 rpm com este carvão por um período de 20 horas em frascos agitados a uma temperatura de 28°C.

Após análise destes resultados iniciais, a concentração de carvão ativo foi estudada em 3 %, 5 % e 10 % e o tempo de agitação reduzido para 5 h. Também foram realizados testes com carvão através de filtração direta, isto é, adicionado ao meio e após rápida homogeneização diretamente filtrado.

3.1.3 Pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico

Os primeiros ensaios com o tratamento ácido foram realizados no meio de cultivo com o melaço e a água de maceração de milho nas concentrações do meio controle. Foi utilizado primeiramente o ácido sulfúrico, e em ensaios posteriores, o ácido fosfórico por este possuir maior poder complexante que o primeiro, podendo desta forma retirar principalmente os metais pesados presentes em ambos substratos industriais. Ajustou-se o pH do melaço junto com a água de maceração de milho para 3,0 com o ácido escolhido, deixou-se o meio em repouso por 24 horas a temperatura de 24°C; então o meio foi centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos e ajustou-se o pH para 5,5 (Roukas ,1998).

3.1.4 Testes com a terra diatomácea

Duas terras de especificações diferentes fornecidas por uma indústria cervejeira, foram testadas da seguinte maneira: a terra diatomácea foi utilizada

nas mesmas concentrações e condições do carvão ativo, tratou-se a água de maceração de milho e o melaço tanto com a terra quanto com o carvão com a mesma metodologia já descrita, e realizou-se a fermentação com as combinações: água de maceração de milho tratada com terra misturada com melaço também tratado com a terra diatomácea; água de maceração de milho tratada com carvão misturada com melaço tratado com carvão e água de maceração de milho tratada com terra misturada com melaço tratado com carvão.

3.1.5 Estudo cinético com o carvão ativo Carvorite-ANF e com a Água de maceração de milho e o melaço separados

Após os ensaios preliminares, buscou-se um uma nova especificação de carvão ativo. A especificação do carvão ativo utilizado nesta etapa do trabalho encontra-se na Tabela 2.

Nos novos testes com o carvão fez-se o tratamento da água de maceração de milho e do melaço separadamente. Ambos foram tratados nas concentrações do meio de cultivo, com 3 % de carvão ativo, 1 hora de agitação em frascos agitados à 70°C, tempo e temperatura recomendadas pelo fabricante. Depois a água de maceração de milho foi filtrada por duas vezes e então centrifugada, e o melaço foi filtrado por três vezes após uma centrifugação inicial. As centrifugações foram de 15 minutos, a 10000 rpm, entre 5 e 10°C.

Tabela 2. Características Carvão Ativo ANF - Carvorite®

| Aspecto | Pulverizado |
|---------------------|---|
| Granulometria | 38% a 45% retido pela malha de mesh 325 |
| PH | 5,0 a 6,5 |
| Eficiência relativa | 75% |
| Cinzas | 5% a 7% |
| Densidade aparente | 0,450 g/cm ³ |
| Umidade ao embalar | <4% |
| Filtrabilidade | Ótima |

Fonte: Empresa Carvorite – Irati/PR

Essa metodologia foi definida buscando separar o máximo de carvão possível do meio, a inversão da ordem de filtração e centrifugação da água de maceração e milho para o melaço se deve ao fato de que remover o carvão do melaço por filtração com grande quantidade de carvão presente é muito difícil, levando a retirada do excesso inicial deste, por centrifugação. Já no caso da água de maceração de milho, são os resíduos finais de carvão que são retirados mais facilmente por centrifugação. O ensaio fermentativo foi acompanhado através de uma cinética para que pudesse ser verificado o tempo no qual a atividade enzimática iniciava o declínio em relação ao meio controle.

3.2 Planejamentos experimentais para o pré-tratamento do melaço e água de maceração de milho

Após ter sido definido que os substratos melaço e água de maceração de milho deveriam ser tratados com carvão ativo do tipo ANF fornecido pela empresa Carvorite[®], devido ao melhor aspecto apresentado pelo caldo, partiu-se para a realização de dois planejamentos experimentais fatoriais completos (2³ ensaios com 1 ponto central para cada variável repetido 3 vezes), com o intuito de avaliar o efeito das variáveis: concentração de carvão, tempo de contato do carvão com o substrato a ser pré-tratado e temperatura do pré-tratamento. Os níveis estudados nesses dois planejamentos estão apresentados nas Tabela 3 e Tabela 4 e as respostas foram as variações do pH após o pré-tratamento e a leitura da densidade ótica (absorbância) a 600nm (Roukas, 1998).

Tabela 3. Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2³ para o pré-tratamento do melaço

| Variáveis independentes / Níveis | -1 | +1 | 0* |
|----------------------------------|----|----|-----|
| Carvão (%) | 6 | 10 | 8 |
| Temperatura (°C) | 60 | 80 | 70 |
| Tempo (h) | 1 | 2 | 1,5 |

* Ponto Central

Tabela 4. Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2³ para o pré-tratamento da água de maceração de milho

| Variáveis independentes / Níveis | -1 | +1 | 0* |
|----------------------------------|----|----|-----|
| Carvão (%) | 4 | 8 | 6 |
| Temperatura (°C) | 60 | 80 | 70 |
| Tempo (h) | 1 | 2 | 1,5 |

* Ponto Central

3.3 Planejamentos experimentais para a otimização da produção da inulinase em frascos agitados

Os ensaios de fermentação dos três planejamentos fatoriais completos (2³ ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) para otimização do meio de produção da inulinase foram realizados conforme item 3.1.1. É importante salientar que em paralelo aos três planejamentos experimentais foram realizadas triplicatas de fermentação com o meio controle (sem o pré-tratamento) otimizado por Kabke (2002).

Os níveis das variáveis que foram estudadas, nos três planejamentos experimentais realizados estão nas Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 5. Valores utilizados no primeiro planejamento fatorial completo 2³

| Variáveis independentes / Níveis | -1,68 | -1 | +1 | +1,68 | 0* |
|----------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|
| Melaço (g/L) | 76,4 | 90,0 | 130,0 | 143,6 | 110,0 |
| AMM (g/L) | 38,2 | 45,0 | 65,0 | 71,8 | 55,0 |
| Ext. Lev. (g/L) | 0,64 | 2,0 | 6,0 | 7,36 | 4,0 |

* Ponto Central

Tabela 6. Valores utilizados no segundo planejamento fatorial completo 2³

| Variáveis independentes / Níveis | -1,68 | -1 | +1 | +1,68 | 0* |
|----------------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Melaço (g/L) | 110,0 | 126,19 | 173,81 | 190,0 | 150,0 |
| AMM (g/L) | 50,0 | 58,09 | 81,90 | 90,0 | 70,0 |
| Ext. Lev. (g/L) | 4,0 | 4,81 | 7,19 | 8,0 | 6,0 |

* Ponto Central

Tabela 7. Valores utilizados no terceiro planejamento fatorial completo 2³

| Variáveis independentes / Níveis | -1,68 | -1 | +1 | +1,68 | 0* |
|----------------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Melaço (g/L) | 110,0 | 126,19 | 173,81 | 190,0 | 150,0 |
| AMM (g/L) | 30,0 | 38,09 | 61,90 | 70,0 | 50,0 |
| Ext. Lev. (g/L) | 4,0 | 4,81 | 7,19 | 8,0 | 6,0 |

* Ponto Central

3.4 Ensaios de purificação em leito expandido

3.4.1 Testes de purificação em leito expandido

Os testes preliminares foram realizados utilizando a coluna Streamline 25 da Pharmacia.

As condições de operação (vazão, fator de expansão) no leito expandido foram praticamente as mesmas estabelecidas por Kalil (2001) para a resina catiônica Streamline SP, alterando somente o tampão (tampão fosfato 0,05M) e o pH (6,5) para estudar a purificação com a resina aniônica Streamline DEAE.

Tampão foi alimentado até a estabilização do leito, quando foi introduzido o caldo na vazão pré-estabelecida, com os ajustes necessários para manter o leito estável. O controle foi realizado medindo-se absorvância e atividade na saída da coluna. Ao final a bomba foi desligada, permitindo a resina sedimentar. O adaptador foi então abaixado até o nível da resina e a eluição foi iniciada com fluxo no sentido inverso.

3.4.2 Preparo da Coluna Streamline 25

A montagem da coluna e o seu respectivo uso foi realizado da maneira descrita abaixo.

- Passou-se a resina em filtro a vácuo e esta foi lavada com água para retirar a solução de etanol 20%.

- Adicionou-se água na coluna até aproximadamente 5cm e, em seguida, 50 mL de resina, que havia sido previamente medida.
- Esperou-se a sedimentação da resina.
- O êmbolo foi colocado 10 cm acima da altura de expansão da resina.
- Passou-se 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.
- Acertou-se o pH do meio fermentado para o do tampão em estudo.
- Passou-se o tampão em estudo por 20 minutos na vazão de 8,2 mL/min.
- Iniciou-se a alimentação.
- Após o fim da alimentação, iniciou-se a etapa de lavagem passando-se tampão até que a solução fique translúcida. As amostras da lavagem foram colhidas para determinação da absorbância.
- Quando a absorbância chegou a zero, a bomba foi desligada. Aguardou-se a sedimentação da resina e o êmbolo foi colocado na 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.

3.4.3 Procedimento para regeneração da resina Streamline.

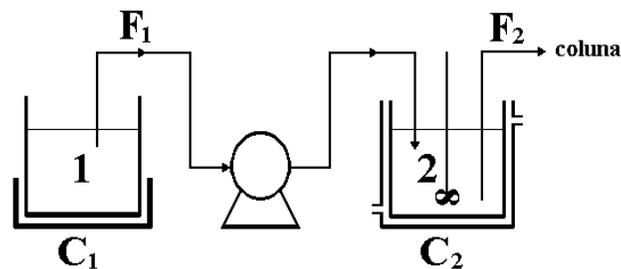
Após cada purificação, foi realizada a regeneração da resina. Os procedimentos seguidos foram os mesmos utilizados para a resina catiônica utilizada por Kalil (2001).

- O êmbolo foi posicionado em altura aproximadamente três vezes a da resina.
- Durante 4 horas, passou-se solução de NaOH com NaCl 1M na vazão de 2,5 mL/min.
- Em seguida, passou-se aproximadamente 225mL de água destilada na vazão de 8mL/min.

- Três vezes o volume sedimentado de Isopropanol 30% foi injetado com uma vazão de 8mL/min. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se ácido acético 25%.
- Acertou-se o pH de saída da coluna passando-se tampão fosfato.

3.4.4 Sistema para a eluição com gradiente salino linear e crescente

Para se realizar a eluição na forma de gradiente linear crescente, é montado um sistema conforme Figura 3. A solução tampão com NaCl (C_1) é bombeada continuamente para outro frasco, contendo inicialmente tampão puro (C_2). Este segundo frasco é mantido sob agitação e dele é retirada a solução para a coluna. A vazão do primeiro frasco (F_1) é mantida sempre a metade do segundo frasco (F_2). 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. Sistema montado para a realização da eluição tipo gradiente

Através de um balanço de massa no reator 2, obtém-se a concentração de NaCl (C_2) na solução que chega a coluna utilizando as Equações 2 e 3.

$$d(V_2C_2) / dt = F_1C_1 - F_2C_2 \quad (\text{Equação 2})$$

E estabelecendo que:

$$F_1 = F_2 / 2 \quad C_2 = C_1 / 2 * (1 - (V_1 / (V_1 - F_1 * t)))^{-2} \quad (\text{Equação 3})$$

Na dessorção da enzima, Makino (2004) otimizou os valores de pH e o volume necessário para que a concentração de NaCl passe de 0M para 1M durante a eluição. Através do planejamento experimental foi possível definir que, com pH ao redor de 5,2 e o volume do gradiente salino na faixa de 600 a 800 mL, foi possível recuperar praticamente toda enzima adsorvida na resina, condições estas que foram testadas neste trabalho.

3.5 Caracterização parcial da enzima purificada

3.5.1 Temperatura ótima e pH ótimo

Na determinação dos valores ótimos de pH e temperatura na atividade sobre a sacarose, foi realizado um planejamento fatorial completo (2² ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) . As faixas de pH e temperatura estudadas tiveram como base resultados de literatura e estão relacionados na Tabela 8. Através da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos destas variáveis para máxima atividade enzimática.

Tabela 8. Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2²

| Variáveis Independentes / Níveis | -1,14 | -1 | 1 | 1,41 | 0* |
|----------------------------------|-------|------|------|------|----|
| pH | 4,5 | 4,64 | 5,36 | 5,5 | 5 |
| Temperatura (°C) | 40 | 44,4 | 65,6 | 70 | 55 |

* Ponto Central

3.5.2 Temperatura de estabilidade

Segundo Contiero (1992) a estabilidade térmica da enzima foi determinada através da utilização da equação de Arrhenius (Equação 4).

$$K = A * e^{-Ed/RT} \quad (\text{Equação 4})$$

As soluções enzimáticas, diluídas em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 foram incubadas nas temperaturas: 50,0; 52,5; 55,0; 57,5 e 60,0 °C. As amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, dependendo da temperatura, para as medidas de atividade enzimática.

Tendo em mãos os dados de atividade em relação ao tempo de incubação para cada temperatura, constrói-se um gráfico de $\ln (A/A_0)$ x tempo (horas), sendo A_0 a atividade inicial e A , a atividade referente aos tempos de retirada de amostra. Desse gráfico, obtém-se o valor de K_d (constante de desativação da enzima) para cada temperatura. Posteriormente, para a determinação da energia de desativação da enzima E_d , grafica-se $\ln K_d \times 1/T(K)$, obtendo-se uma reta correspondente à equação de Arrhenius (Equação 5):

$$\ln K_d = \ln K - \frac{E_d}{RT} \quad (\text{Equação 5})$$

sendo que:

K_d = constante de desativação da enzima

K = constante de proporcionalidade

E_d = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (1,928cal/gmol K)

T = temperatura absoluta(K)

Costuma-se expressar a estabilidade térmica em termos de meia vida, a qual é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja: $A/A_0 = 0,5$.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) pode ser relacionado a constante de desativação K_d , através da Equação 6.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (\text{Equação 6})$$

3.5.3 pH de estabilidade

A enzima foi incubada a 50°C nos seguintes valores de pH: 4,0; 4,4; 4,8; 5,0; 5,2 e 5,6 em tampão acetato 0,1M. A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método do DNS, com tampão acetato 0,1M a pH 4,6, conforme descrita no item 3.7.1.

3.5.4 Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$

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

3.6 Otimização da produção da inulinase em fermentador de bancada

Para que fosse otimizada a produção da inulinase em fermentador de bancada, através de ensaios preliminares, foram definidos um planejamento fatorial tipo Plackett Burman com 12 ensaios e 3 pontos centrais e um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) com as variáveis que mostraram ter efeito significativo na produção da enzima.

3.6.1 Fermentação em reator de bancada

Ensaio de fermentação foram realizados em fermentador de 3L de volume com volume útil de 2,2L, tipo Bioflo III New Brunswick Scientific-Edison N.J. USA, ao qual foi adicionado 200mL de inóculo. Foi utilizado agitador do tipo pás inclinadas. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo regulares nos ensaios preliminares. No planejamento fatorial do tipo Plackett Burman e planejamento fatorial completo, as amostras para análise de atividade enzimática foram retiradas de 12 em 12 horas. O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item 3.1.1.

3.6.2 Ensaio preliminares em Reator de Bancada

Após a otimização do meio pré-tratado para produção da inulinase em frascos agitados, partiu-se para o estudo em fermentador de bancada.

Primeiramente realizou-se um ensaio preliminar em fermentador utilizando meio otimizado sem pré-tratamento para verificar o comportamento da produção da inulinase. Para que pudessem ser definidos os níveis que seriam estudados em um planejamento experimental visando verificar os efeitos das variáveis importantes para produção da inulinase em fermentador realizou-se então duas corridas de fermentação em reator de bancada, onde foram mantidas as concentrações dos substratos otimizadas em frascos agitados, variando-se somente os níveis de agitação e aeração, mantendo-se fixos o pH inicial em 5,0 e a temperatura em 36°C. As condições testadas encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Ensaio preliminares em fermentador de bancada

| | Ensaio 1 | Ensaio 2 |
|----------------|----------|----------|
| Agitação (rpm) | 200 | 300 |
| Aeração (vvm) | 1 | 1,5 |

3.6.3 Planejamento Experimental do tipo Plackett Burman em Reator de Bancada

Através dos resultados de atividade enzimática obtidos nos ensaios preliminares em fermentador de bancada verificou-se que com as mesmas concentrações dos substratos otimizadas em frascos agitados não se atingia a mesma atividade enzimática da inulinase, sendo necessário, portanto, estudar também essas variáveis (concentração de melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura) além de agitação e aeração. Isto é comum quando se estuda aumento de escala, já que as condições de transferência de massa são bastante distintas de um volume menor (100 mL) para um volume maior (2,2 L). Assim, realizou-se um planejamento do tipo Plackett Burman (Screening Design) de 12 ensaios com 3 pontos centrais, para que pudessem ser avaliadas as variáveis mais importantes do processo, selecionando as que deveriam entrar em um estudo de otimização propriamente dito. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Valores utilizados no Planejamento Fatorial do tipo Plackett Burman

| Variáveis Independentes / Níveis | -1 | +1 | 0* |
|----------------------------------|-----|-----|-----|
| Melaço (g/L) | 150 | 210 | 180 |
| AMM (g/L) | 50 | 70 | 60 |
| Ext. Lev. (g/L) | 6 | 8 | 7 |
| Aeração (vvm) | 1,5 | 2,5 | 2,0 |
| Agitação (rpm) | 300 | 500 | 400 |

* Ponto Central

3.6.4 Planejamento Experimental Completo em Reator de Bancada

A partir dos resultados obtidos no Planejamento do tipo Plackett Burman realizou-se um Planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável

independente repetido 3 vezes). Nesta etapa foram estudadas as variáveis concentração de melação e concentração de água de maceração de milho, mantendo-se fixos os níveis de concentração de extrato de levedura em 6 g/L, agitação em 300 rpm e aeração em 1,5 vvm. Os níveis estudados neste planejamento estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores utilizados na otimização da produção de inulinase em fermentador

| Variáveis independentes / Níveis | -1,14 | -1 | 1 | 1,41 | 0* |
|----------------------------------|-------|-----|-----|------|-----|
| Melaço (g/L) | 180 | 200 | 300 | 320 | 250 |
| AMM (g/L) | 50 | 69 | 101 | 110 | 80 |

* Ponto Central

3.7 Metodologia analítica

3.7.1 Determinação da Atividade Enzimática

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 termostaticado a 50 °C com agitação recíproca. Nos frascos adicionam-se, 4,5 mL de solução de sacarose a 2 % preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 e 0,5 mL da amostra convenientemente diluída. São retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos de tempo 2, 4, 6, 8 e 10 minutos e determina-se a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS. Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar 1 μ mol/mL de sacarose por minuto.

3.7.2 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

3.7.3 Determinação de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

3.7.4 Determinação de Nitrogênio Total

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

3.7.5 Determinação de Massa Seca

A determinação de massa seca na amostra foi feita espectrofotometricamente através da leitura da absorbância a 600 nm, utilizando água destilada para calibração do aparelho. Para avaliação da massa celular foi necessário construir uma curva padrão de densidade ótica *versus* massa seca, sendo obtida após secagem da amostra em estufa à vácuo (50°C). Paralelamente fez-se diluições sucessivas do meio fermentado e mediu-se a densidade ótica. A partir da densidade ótica determinou-se indiretamente a massa seca para cada diluição.

3.7.6 Determinação de pH

O pH foi medido diretamente em potenciômetro.

4. Resultados e Discussão

4.1 Pré-tratamento de substratos industriais: Ensaio preliminares

Os resultados dos testes preliminares estão apresentados na Tabela 12 e na Figura 4, os ensaios foram realizados em triplicata, sendo apresentadas as respectivas médias e desvio padrão. O tratamento do meio de cultivo com ácido apresentou atividade enzimática até 48 horas, igual ao do meio sem pré-tratamento (controle). Após 72 horas de fermentação a atividade atingiu 1195 U/mL, valor superior ao meio controle, provavelmente devido à retirada de elementos inibidores do meio industrial. No entanto a aparência física do meio mostrou que o tratamento não solucionava os problemas mais sérios que eram os de formação de precipitados no meio após 72 horas de fermentação, o que inviabiliza a purificação da enzima em coluna de leito expandido. Os flocos formados no meio de cultura aderem na resina utilizada na coluna de leito expandido impossibilitando a purificação.

Em relação ao meio pré-tratado com carvão, observa-se que a atividade ao final da fermentação (72 h) é bastante inferior ao controle, isto pode ter ocorrido devido a quantidade de carvão que permaneceu no meio mesmo após a filtração, o que pode ter ocasionado um efeito inibidor.

Tabela 12. Médias dos resultados de atividades enzimáticas obtidas

| Pré-tratamento | Atividade (U/mL) 24h | Atividade (U/mL) 48h | Atividade (U/mL) 72h |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Controle | 209 ± 3,47 | 484 ± 2,34 | 1010 ± 3,10 |
| Ácido | 225 ± 2,68 | 504 ± 3,04 | 1195 ± 2,88 |
| Carvão | 113 ± 2,15 | 206 ± 2,98 | 595 ± 2,14 |

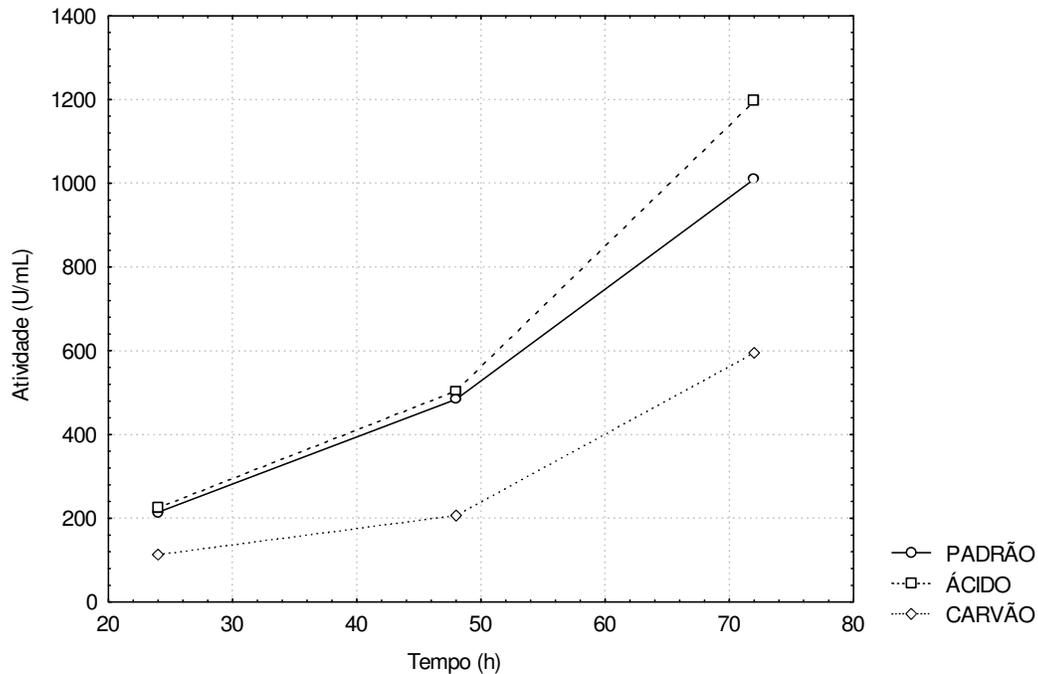


Figura 4. Acompanhamento das atividades enzimáticas obtidas em meios diferentemente tratados

Em uma segunda etapa optou-se pela combinação do tratamento com ácido mais o acréscimo do carvão ativo. Optou-se por esta estratégia para verificar se realizando primeiramente o tratamento com o ácido seria mais viável a retirada do carvão ativo do meio antes do mesmo ser utilizado para produção da enzima. Primeiramente fez-se o tratamento com ácido sulfúrico e após com o carvão, testando-se agitação por 1 e 2 horas. Os resultados de atividade enzimática em função dos tratamentos é dada pela Tabela 13 e pela Figura 5, este novamente sendo realizado com as respectivas médias.

Pela Tabela 13 e Figura 5 observa-se que os tratamentos empregados sobre o meio de cultivo prejudicaram a atividade enzimática, e o meio de fermentação não foi clarificado, continuou a apresentar resíduos de carvão no meio filtrado, como nos ensaios anteriores.

Tabela 13. Resultados de atividades enzimáticas obtidas em meios diferentemente tratados

| Pré-tratamento | Atividade (U/mL) 24hs | Atividade (U/mL) 48hs | Atividade (U/mL) 72hs |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Controle | 290 ± 2,14 | 502 ± 1,95 | 1003 ± 1,45 |
| Ácido + Carvão (1h) | 141 ± 3,25 | 390 ± 2,01 | 434 ± 1,98 |
| Ácido + Carvão (2h) | 126 ± 2,41 | 205 ± 2,12 | 286 ± 2,41 |

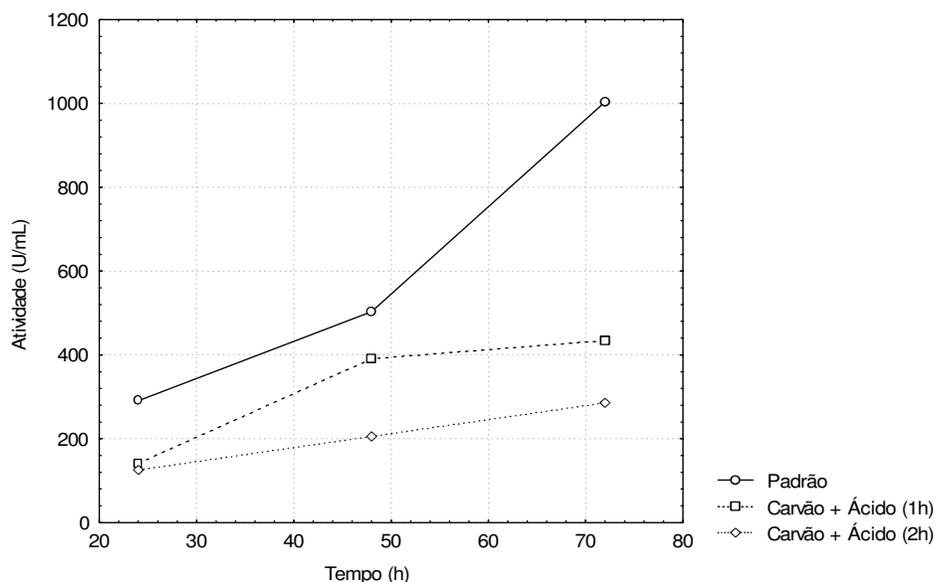


Figura 5. Médias de atividade enzimática nos diferentes tratamentos

A separação do carvão ativo do meio de cultivo foi a grande dificuldade para a clarificação, e conseqüentemente melhores condições para a posterior purificação da enzima.

Em relação ao tratamento ácido optou-se por substituir o ácido sulfúrico por ácido fosfórico, pelo fato do último ser mais complexante, e assim contribuir com a clarificação do meio.

Para facilitar a filtração optou-se por centrifugar o melaço antes da adição do carvão ativo, e realizar agitação por maiores intervalos de tempo. Anteriormente o tempo era de 1 e 2 horas, nestes próximos ensaios agitou-se por 5 horas. Os resultados estão detalhados na Tabela 14 e as médias dos resultados de atividade enzimática obtidas foram utilizadas para a construção da Figura 6.

Nestes resultados está incluído o tratamento com carvão através de filtração direta, isto é, sem agitação em frascos agitados.

Tabela 14. Resultados de atividades enzimáticas obtidas em meios submetidos a diferentes pré-tratamentos

| Pré-tratamento* | (U/mL) 24hs | (U/mL) 48hs | (U/mL) 72hs |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| (1) | 230 | 580 | 997 |
| | 244 | 598 | 1000 |
| (2) | 298 | 615 | 643 |
| | 302 | 601 | 638 |
| (3) | 302 | 733 | 756 |
| | 289 | 702 | 705 |
| (4) | 233 | 427 | 914 |
| | 221 | 431 | 910 |
| (5) | 205 | 319 | 399 |
| | 200 | 324 | 406 |
| (6) | 298 | 711 | 685 |
| | 312 | 715 | 706 |

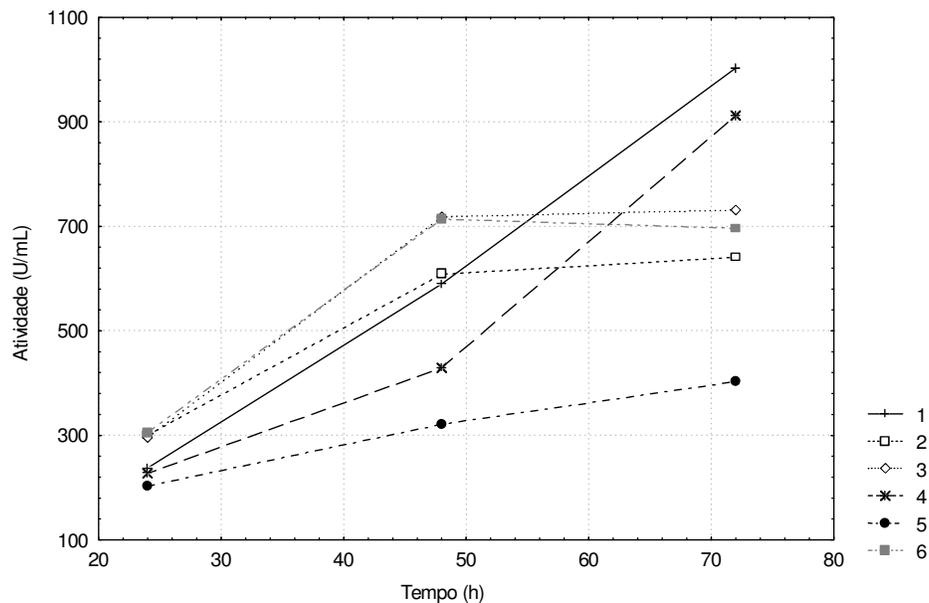
Onde: (1) Controle; (2) Carvão ativo 3% (filtração direta); (3) Carvão ativo 5% (filtração direta); (4) Carvão ativo 3% (agitação de 5horas); (5) Carvão ativo 5% (agitação de 5horas); (6) Tratamento com ácido fosfórico

Avaliando-se a Figura 6, nota-se que o tempo de agitação prévia melhorou a atividade enzimática quando comparados com a filtração sem a prévia agitação, porém a atividade enzimática permaneceu inferior ao controle, pode-se notar também que o aumento da concentração de carvão ativo não gerou mudanças positivas ao fim das 72 horas.

Outra opção de pré-tratamento testada foi à utilização de terra de diatomácea. A terra diatomácea foi abandonada por não se mostrar eficaz na remoção das impurezas do melão e da água de maceração de milho; além de visivelmente não clarear o meio de cultura, eliminando os compostos flocculantes, ainda promoveu uma queda bastante acentuada na atividade enzimática durante a fermentação, a qual atingiu valores de 200 U/mL após 72hs de fermentação.

O carvão ativo permaneceu no meio em todos os casos, o que levou a busca de nova amostra de carvão ativo, para a continuação do estudo. Os resultados obtidos até então demonstraram que o problema estava nas

especificações do carvão que vinha sendo utilizado até então, isto é, um carvão não apropriado para clarificação.



Onde: (1) Controle; (2) Carvão ativo 3% (filtração direta); (3) Carvão ativo 5% (filtração direta); (4) Carvão ativo 3% (agitação de 5 horas); (5) Carvão ativo 5% (agitação de 5 horas); (6) Tratamento com ácido fosfórico

Figura 6. Médias de atividade enzimática nos diferentes tratamentos

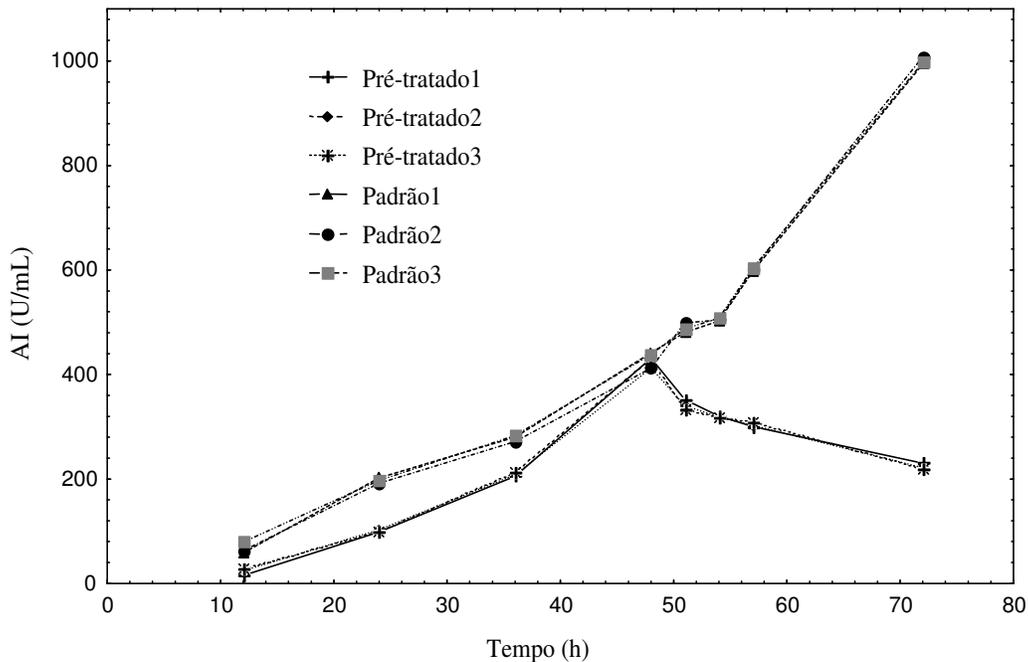
4.2 Cinética da produção de inulinase no meio de cultura pré-tratado com carvão ativo ANF[®] - Carvorite

Devido aos resultados demonstrados anteriormente buscou-se uma especificação de carvão ativo que fosse a mais adequada ao fim proposto. Essa busca resultou na mudança do carvão até então usado (Sinth), o qual possuía área superficial maior, para o carvão ativo fornecido pela empresa Carvorite de especificação ANF[®].

Com a finalidade de estudar o comportamento da fermentação com o meio de cultura pré-tratado com este carvão, foi realizada uma cinética da fermentação,

em triplicata, para o acompanhamento da atividade, como foi também realizada com o meio controle.

Foram preparadas as soluções de água de maceração de milho e de melação nas concentrações do meio controle e seguida a metodologia descrita no item 3.2.5.



onde: Pré-tratado 1, 2 e 3 correspondem a triplicata da fermentação do meio pré-tratado conforme descrito anteriormente e Padrão 1, 2 e 3 correspondem a triplicata do meio controle.

Figura 7. Cinética de fermentação para o meio controle e meio industrial pré-tratado

A curva que descreve os valores obtidos está representada na Figura 7. Nota-se que a atividade enzimática do meio pré-tratado inicia seu decréscimo exatamente a partir das 48 horas de fermentação, o que possivelmente acontece porque durante o pré-tratamento ocorre não somente a retirada de compostos indesejáveis, mas também a retirada de nutrientes importantes para a fermentação. Porém, é importante salientar que a aparência do caldo bruto

fermentado a partir do meio pré-tratado com este carvão apresentou menos grumos e precipitados após 72 horas de fermentação.

4.3 Planejamentos fatoriais para o pré-tratamento

Baseado nos resultados dos ensaios preliminares definiu-se que os substratos melão (90 g/L) e água de maceração (45 g/L) deveriam ser tratados separadamente com carvão ativo fornecido pela empresa Carvorite – ANF. Realizou-se dois planejamentos experimentais fatoriais 2^3 com 3 pontos centrais com o intuito de avaliar o efeito das variáveis: concentração de carvão, tempo de contato do carvão com o composto a ser pré-tratado e temperatura do pré-tratamento para que fossem definidas as condições que levassem à clarificação do meio de cultivo sem prejuízo na atividade enzimática. A matriz dos planejamentos experimentais com os valores reais e codificados, bem como as respostas em leitura de densidade ótica e pH para o melão, estão apresentados na Tabela 15. O pH da solução de melão antes do pré-tratamento era 5,4.

Tabela 15. Matriz do planejamento experimental completo de primeira ordem (valores reais e codificados) com as respostas de leitura de densidade ótica e pH para o melão

| Ensaio | Carvão (%) | Temp. (°C) | Tempo (h) | DO (600nm) | pH |
|--------|------------|------------|-----------|------------|------|
| 1 | 6 (-1) | 60 (-1) | 1 (-1) | 0,4128 | 6,24 |
| 2 | 10 (1) | 60 (-1) | 1 (-1) | 0,8126 | 6,14 |
| 3 | 6 (-1) | 80 (1) | 1 (-1) | 0,7457 | 5,57 |
| 4 | 10 (1) | 80 (1) | 1 (-1) | 0,6058 | 5,55 |
| 5 | 6 (-1) | 60 (-1) | 2 (1) | 1,535 | 6,02 |
| 6 | 10 (1) | 60 (-1) | 2 (1) | 2,121 | 6,02 |
| 7 | 6 (-1) | 80 (1) | 2 (1) | 0,2280 | 5,43 |
| 8 | 10 (1) | 80 (1) | 2 (1) | 0,0707 | 5,45 |
| 9 | 8 (0) | 70 (0) | 1,5 (0) | 1,639 | 5,85 |
| 10 | 8 (0) | 70 (0) | 1,5 (0) | 1,773 | 5,82 |
| 11 | 8 (0) | 70 (0) | 1,5 (0) | 1,405 | 5,87 |

Os resultados de leitura de densidade ótica no melão depois de submetido aos diferentes ensaios de pré-tratamento foram tratados estatisticamente e a

Tabela 16 apresenta os coeficientes de regressão, bem como o desvio padrão e valores de t e p para as variáveis que foram estatisticamente significativas a 5% de significância.

Verificou-se que a porcentagem de carvão ativo adicionado ao melão no pré-tratamento, não foi estatisticamente significativa na faixa estudada de 6 a 10%; ou seja, 6% de carvão tem o mesmo efeito que 10%. Dessa forma, os responsáveis pela clarificação desse componente do meio são a temperatura e o tempo de agitação.

Tabela 16. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão para a leitura de densidade ótica após o pré-tratamento do melão

| | Coef.de regressão | Desvio padrão | t (2) | p |
|----------------------|-------------------|---------------|-------|--------|
| Média * | 1,03 | 0,055 | 18,49 | 0,002 |
| Carvão | 0,09 | 0,065 | 1,31 | 0,3212 |
| Temperatura * | -0,40 | 0,065 | -6,18 | 0,0255 |
| Tempo | 0,17 | 0,065 | 2,61 | 0,1203 |
| Carvão x Temperatura | -0,16 | 0,065 | -2,44 | 0,1352 |
| Carvão x Tempo | 0,02 | 0,065 | 0,32 | 0,7790 |
| Temperatura x Tempo* | -0,43 | 0,065 | -6,67 | 0,021 |

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

Através Tabela 16 nota-se que o aumento da temperatura apresentou um efeito negativo significativo ($p < 0,05$). A Tabela 17 apresenta a análise de variância para a leitura de densidade ótica do melão submetido a diferentes pré-tratamentos. O coeficiente de correlação, bem como o F calculado em relação ao tabelado são baixos, o que representa um ajuste não adequado dos dados experimentais a um modelo não linear de primeira ordem.

A matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados, bem como as respostas em leitura de densidade ótica e pH para a água de maceração de milho, estão apresentados na Tabela 18. O pH da solução de água de maceração de milho era de 4,09.

Tabela 17. Análise de variância para a leitura de densidade ótica após o pré-tratamento para o melão

| Fontes de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 2,822 | 2 | 1,411 | 5,91 |
| Resíduos | 1,909 | 8 | 0,238 | |
| Falta de ajuste | 1,841 | 6 | | |
| Erro puro | 0,068 | 2 | | |
| Total | 4,731 | 10 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

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

Coeficiente de correlação: $R=0,77$

Tabela 18. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de leitura de densidade ótica e pH da AMM

| Ensaio | Carvão (%) | Temp. (°c) | Tempo (h) | DO (600nm) | pH |
|--------|------------|------------|-----------|------------|------|
| 1 | 4 (-1) | 60 (-1) | 1 (-1) | 0,1331 | 4,50 |
| 2 | 8 (1) | 60 (-1) | 1 (-1) | 0,2583 | 4,74 |
| 3 | 4 (-1) | 80 (1) | 1 (-1) | 0,1037 | 4,35 |
| 4 | 8 (1) | 80 (1) | 1 (-1) | 0,3073 | 4,63 |
| 5 | 4 (-1) | 60 (-1) | 2 (1) | 0,2304 | 4,48 |
| 6 | 8 (1) | 60 (-1) | 2 (1) | 0,1036 | 4,82 |
| 7 | 4 (-1) | 80 (1) | 2 (1) | 0,0838 | 4,43 |
| 8 | 8 (1) | 80 (1) | 2 (1) | 0,0801 | 4,63 |
| 9 | 6 (0) | 70 (0) | 1,5 (0) | 0,1320 | 4,60 |
| 10 | 6 (0) | 70 (0) | 1,5 (0) | 0,1440 | 4,58 |
| 11 | 6 (0) | 70 (0) | 1,5 (0) | 0,1573 | 4,56 |

A Tabela 19 apresenta os coeficientes de regressão, bem como o desvio padrão, e valores de t e p para os fatores que foram estatisticamente significativos. Nesta tabela verifica-se que a concentração de carvão e o tempo de contato são significativos ($p<0,05$), sendo que o primeiro influencia positivamente na densidade ótica e o segundo tem uma influência negativa.

A Tabela 20 apresenta a análise de variância para a leitura de densidade ótica da água de maceração de milho submetido a diferentes pré-tratamentos.

Tabela 19. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo para a leitura de densidade ótica após o pré-tratamento da AMM

| | Coef. de regressão | Desvio padrão | t (2) | p |
|-----------------------|--------------------|---------------|--------|--------|
| Média * | 0,158 | 0,0038 | 41,30 | 0,0005 |
| Carvão * | 0,024 | 0,0045 | 5,53 | 0,0031 |
| Tempo * | -0,038 | 0,0045 | -8,51 | 0,0135 |
| Temperatura | 0,0021 | 0,0045 | 0,46 | 0,1240 |
| Carvão x Temperatura* | 0,025 | 0,0045 | 5,63 | 0,0301 |
| Carvão x Tempo * | -0,057 | 0,0045 | -12,83 | 0,0060 |
| Temperatura x Tempo* | -0,024 | 0,0045 | -5,29 | 0,0338 |

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

Tabela 20. Análise de variância para a leitura de densidade ótica após o pré-tratamento da AMM

| Fontes de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 0,05239 | 5 | 0,010478 | 12,74 |
| Resíduos | 0,00411 | 5 | 0,000822 | |
| Falta de ajuste | 0,003790 | 3 | | |
| Erro puro | 0,000320 | 2 | | |
| Total | 0,0565 | 10 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro

$F_{0,95;5;5} = 5,05$

Coeficiente de correlação: $R = 0,93$

Analisando a Figura 8 observa-se que as três variáveis são relevantes nas faixas estudadas. Assim, foi definido um pré-tratamento igual para os dois substratos industriais (melaço e água de maceração de milho) para facilitar a operacionalização dos mesmos. Este pré-tratamento fixado foi de 8 % de carvão ativo, 1 hora de agitação em frascos aletados à 70 °C, no qual foram realizados alguns ensaios para verificar reprodutibilidade.

As concentrações de nitrogênio total e açúcares redutores totais no melaço e água de maceração de milho antes e após o pré-tratamento estabelecido, nas concentrações de 90g/L e 45 g/L respectivamente, estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Composições dos substratos industriais antes e após o pré-tratamento realizado

| | Melaço (90g/L) | | Água de maceração de milho (45 g/L) | |
|---------------------------------|----------------|--------|-------------------------------------|--------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois |
| Nitrogênio Total (%) | 0,5 | 0,3 | 3,0 | 2,8 |
| Açúcares redutores totais (g/L) | 54,0 | 36,0 | 1,3 | 0,8 |

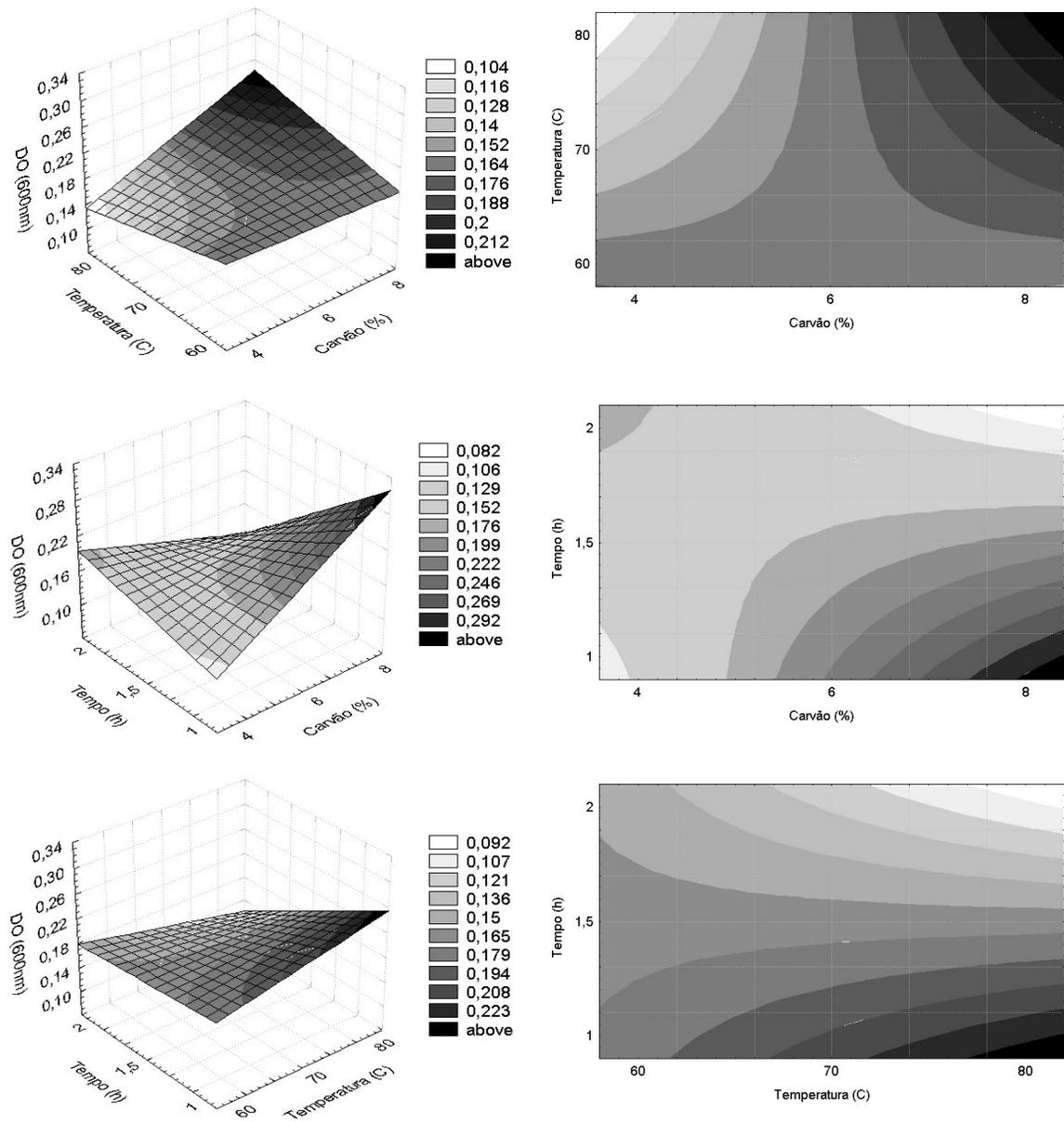


Figura 8. Superfícies de resposta e curvas de contorno da densidade ótica para a água de maceração de milho após o pré-tratamento: da temperatura e % de carvão, tempo e % de carvão, e do tempo e temperatura

4.4 Otimização da produção da inulinase em frascos agitados: Estudo da composição do meio de cultivo contendo melaço e água de maceração de milho pré-tratados e extrato de levedura

Após a definição das melhores condições de pré-tratamento, tornou-se necessário reajustar as concentrações dos substratos melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura, uma vez que a clarificação diminuiu a disponibilidade de substratos. Para a realização da otimização da produção da inulinase em frascos agitados foram realizados três planejamentos fatoriais seqüenciais.

4.4.1 Primeiro planejamento fatorial completo

No primeiro planejamento fatorial realizado, os níveis das variáveis melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura foram definidos após ensaios preliminares realizados, que demonstraram que as concentrações dos respectivos substratos deveriam ser aumentadas em decorrência do pré-tratamento realizado. A matriz deste primeiro planejamento e os respectivos resultados em termos de atividade enzimática está apresentada na Tabela 22, que mostra também os valores decodificados de cada nível utilizado. Para melhor visualização dos resultados pode-se analisar a Figura 9 com o acompanhamento da atividade enzimática em função do tempo de fermentação. É importante salientar que durante a realização dos planejamentos experimentais sempre foi feito em paralelo uma fermentação em triplicata com o meio controle (Tabela 22), sem o pré-tratamento, utilizando-se o mesmo inóculo.

Os cálculos para verificar os efeitos das variáveis na atividade enzimática foram feitos com auxílio do programa computacional Statistica versão 5.0.

Tabela 22. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de inulinase (AI U/mL) nas 24, 48 e 72h de fermentação, atividade enzimática prevista pelo modelo e o desvio relativo

| Ensaio | Melaço (g/L) | AMM (g/L) | Ext. de lev. (g/L) | AI 24h | AI 48h | AI 72h | AI prev 72h | Desvio (%) |
|--------|---------------|--------------|--------------------|--------|--------|--------|-------------|------------|
| 1 | 90 (-1) | 45 (-1) | 2 (-1) | 90 | 271 | 412 | 404 | 1,92 |
| 2 | 130 (+1) | 45 (-1) | 2 (-1) | 19 | 132 | 256 | 277 | -8,18 |
| 3 | 90 (-1) | 65 (+1) | 2 (-1) | 96 | 361 | 441 | 457 | -3,66 |
| 4 | 130 (+1) | 65 (+1) | 2 (-1) | 96 | 313 | 290 | 277 | 4,38 |
| 5 | 90 (-1) | 45 (-1) | 6 (+1) | 21 | 357 | 296 | 312 | -5,47 |
| 6 | 130 (+1) | 45 (-1) | 6 (+1) | 121 | 501 | 579 | 566 | 2,20 |
| 7 | 90 (-1) | 65 (+1) | 6 (+1) | 83 | 446 | 373 | 365 | 2,12 |
| 8 | 130 (+1) | 65 (+1) | 6 (+1) | 104 | 574 | 545 | 566 | -3,84 |
| 9 | 76,4 (-1,68) | 55 (0) | 4 (0) | 118 | 293 | 270 | * | |
| 10 | 143,6 (+1,68) | 55 (0) | 4 (0) | 90 | 542 | 588 | * | |
| 11 | 110 (0) | 38,2 (-1,68) | 4 (0) | 70 | 405 | 410 | * | |
| 12 | 110 (0) | 71,8 (+1,68) | 4 (0) | 88 | 465 | 573 | * | |
| 13 | 110 (0) | 55 (0) | 0,64 (-1,68) | 86 | 402 | 372 | * | |
| 14 | 110 (0) | 55 (0) | 7,4 (+1,68) | 90 | 401 | 549 | * | |
| 15 | 110 (0) | 55 (0) | 4 (0) | 93 | 427 | 421 | 403 | 4,22 |
| 16 | 110 (0) | 55 (0) | 4 (0) | 95 | 406 | 412 | 403 | 2,11 |
| 17 | 110 (0) | 55 (0) | 4 (0) | 92 | 412 | 410 | 403 | 1,59 |

* Estes ensaios não foram incluídos no modelo de primeira ordem

Analisando-se as respostas obtidas na Tabela 22, verifica-se que em 9 dos 17 ensaios não ocorreu queda da atividade enzimática após 72 horas de fermentação, tempo no qual os resultados foram analisados estatisticamente. Verifica-se ainda que as atividades alcançadas estão bastante abaixo do meio controle otimizado por Kabke (2002) que estão na Tabela 23. Na

Tabela 22 estão também os valores de atividade prevista pelo modelo de primeira ordem não linear, que se ajustou melhor aos dados experimentais e os desvios relativos entre as atividades enzimáticas obtidas experimentalmente e previstas pelo modelo. Nos ensaios 9 a 14, os resultados para as condições axiais não foram possíveis de serem previstas pelo modelo, já que o modelo quadrático não foi estatisticamente significativo.

Tabela 23. Resultados obtidos para o meio controle

| Atividade (U/mL) 24h | Atividade (U/mL) 48h | Atividade (U/mL) 72h |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 260 | 462 | 992 |
| 271 | 494 | 997 |
| 248 | 460 | 1002 |

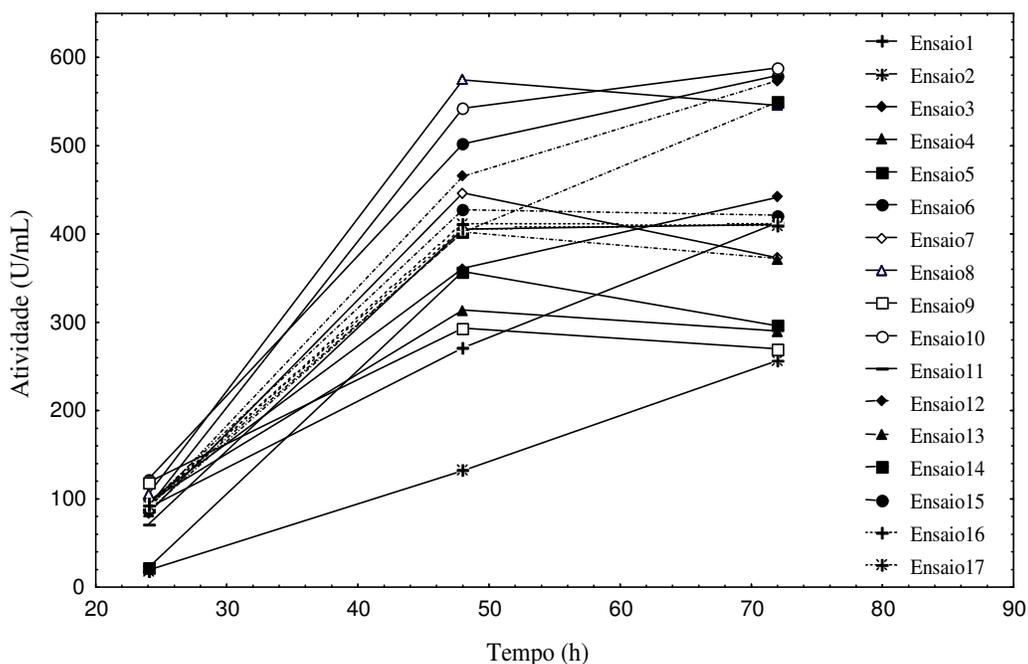


Figura 9. Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o primeiro planejamento fatorial completo

Em relação às interações entre os substratos, nota-se que o melaço e a água de maceração de milho interagem de forma negativa significativa a 95% de confiança e o melaço e o extrato de levedura interagem de forma negativa, já a

interação entre a água de maceração de milho e o extrato de levedura não se mostrou significativo, conforme mostra a Tabela 24. Estes resultados indicam que o aumento na concentração dos três componentes do meio pode acarretar em um incremento da atividade enzimática.

Este comportamento pode ser explicado pelo fato do pré-tratamento retirar nutrientes indispensáveis para a produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571. Em vista disso, o próximo passo foi utilizar faixas maiores de concentração para os três substratos.

A Tabela 24 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a atividade da inulinase. Os três componentes do meio de fermentação apresentaram efeitos positivos significativos, com 5% de significância, na atividade enzimática individualmente, e as interações entre as variáveis podem ser melhor visualizadas pelas superfícies de resposta.

Tabela 24. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

| | Coef. de regressão | Desvio padrão | t (2) | p |
|--------------------|--------------------|---------------|--------|-------|
| Média * | 403,6 | 1,80 | 223,72 | 0,000 |
| (1) Melaço (L)* | 18,56 | 2,12 | 8,78 | 0,127 |
| (2)AMM (L)* | 13,26 | 2,12 | 6,27 | 0,024 |
| (3) Ext. lev. (L)* | 49,18 | 2,12 | 23,25 | 0,002 |
| 1L x 2L* | -13,26 | 2,12 | -6,27 | 0,024 |
| 1L x 3L* | 95,47 | 2,12 | 45,13 | 0,000 |
| 2L x 3L | -2,5 | 2,12 | -1,21 | 0,35 |

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

A Tabela 25 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,98, e o F calculado 8,4 vezes maior que o valor tabelado. Foi testado um modelo de segunda ordem incluindo os pontos axiais, no entanto o modelo de primeira ordem não linear ajustou-se melhor aos dados experimentais. O parâmetro estatisticamente não significativo foi eliminado do modelo e adicionado a falta de ajuste.

Tabela 25. Análise de variância para a atividade de Inulinase

| Fontes de Variação | Somas de Quadrados | Gráus de Liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 97831,7 | 5 | 19566,34 | 42,67 |
| Resíduos | 2292,8 | 5 | 458,56 | |
| Falta de ajuste | 2221,2 | 3 | | |
| Erro puro | 71,6 | 2 | | |
| Total | 100124,5 | 10 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro

$F_{0,95;5;5}=5,05$

Coefficiente de correlação: $R=0,98$

O modelo codificado obtido para descrever as superfícies de resposta da atividade da inulinase está expresso na equação 7.

$$\text{Atividade} = 403,6 + 18,56 \cdot \text{Melaço} + 13,26 \cdot \text{AMM} + 49,18 \cdot \text{Ext.Lev} - 13,26 \cdot \text{Melaço} \cdot \text{AMM} + 95,47 \cdot \text{Melaço} \cdot \text{Ext.Lev} \quad (\text{equação 7})$$

Através da análise da Figura 10 verifica-se que a atividade enzimática tende a um incremento quanto maior for a concentração dos três substratos que compõe o meio de fermentação.

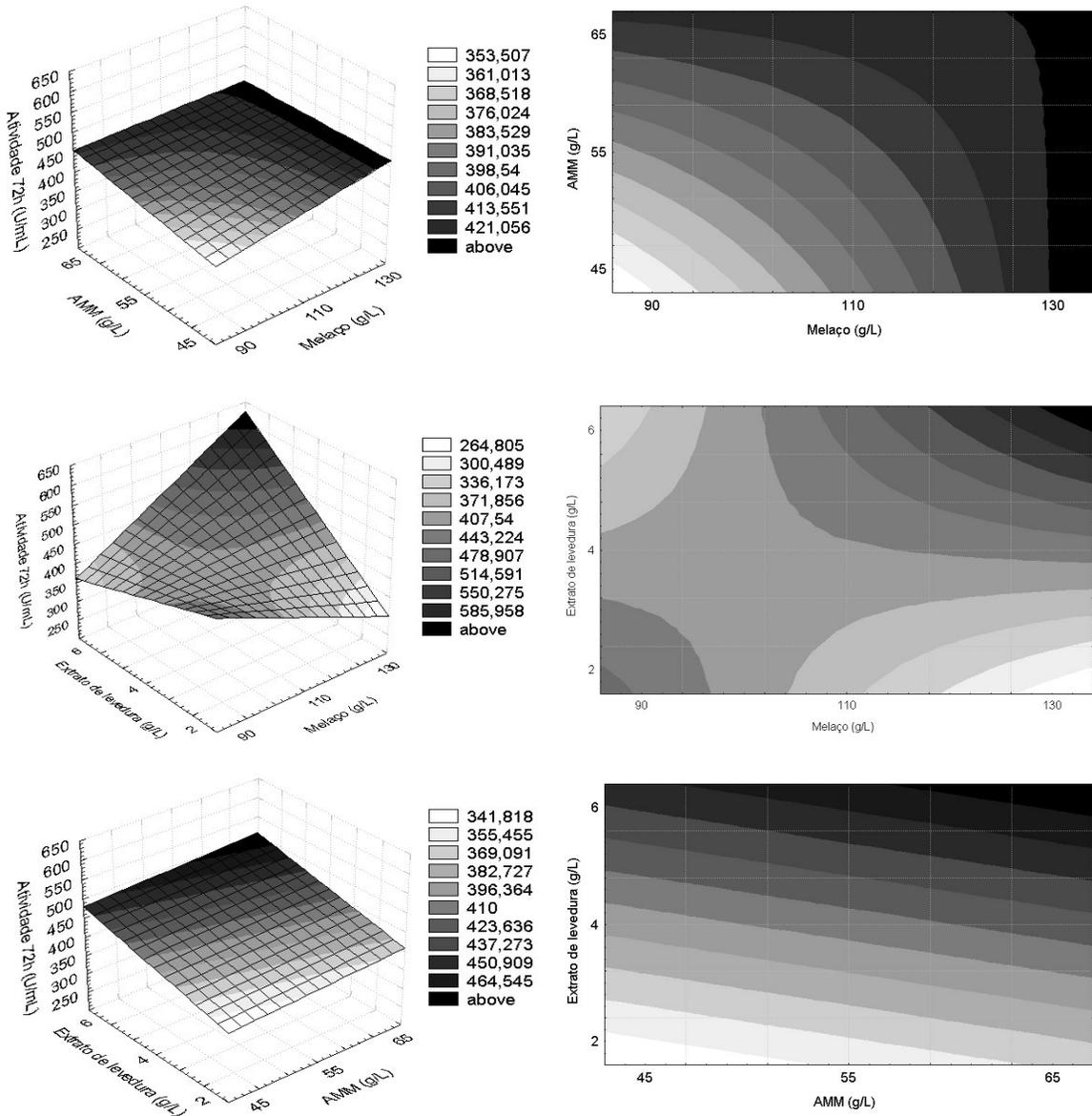


Figura 10. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase em função da concentração: da AMM e do melaço; do extrato e levedura e melaço e extrato de levedura e AMM para o primeiro planejamento realizado

4.4.2 Segundo planejamento fatorial completo

A Tabela 26 apresenta os valores reais e codificados do segundo planejamento, e as respostas para a atividade enzimática, na qual verifica-se que ocorreu um incremento nos valores, quando se compara com o primeiro planejamento, sendo que o máximo obtido foi de 1314 U/mL no ensaio de número 11, valor este que supera o meio controle.

Tabela 26. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com respostas da atividade de inulinase (AI U/mL) nas 24, 48 e 72h de fermentação atividade enzimática prevista pelo modelo e o desvio relativo

| Ensaio | Melaço (g/L) | AMM (g/L) | Ext. de Lev. (g/L) | AI 24h | AI 48h | AI 72h | AI Prev 72h | Desvio (%) |
|--------|--------------|------------|--------------------|--------|--------|--------|-------------|------------|
| 1 | 126,2 (-1) | 58,1 (-1) | 4,8 (-1) | 104 | 341 | 427 | 474 | -11,17 |
| 2 | 173,8 (+1) | 58,1 (-1) | 4,8 (-1) | 80 | 607 | 730 | 727 | 0,32 |
| 3 | 126,2 (-1) | 81,9 (+1) | 4,8 (-1) | 60 | 633 | 984 | 1026 | -4,28 |
| 4 | 173,8 (+1) | 81,9 (+1) | 4,8 (-1) | 57 | 771 | 991 | 995 | -0,34 |
| 5 | 126,2 (-1) | 58,1 (-1) | 7,2 (+1) | 64 | 799 | 758 | 756 | 0,30 |
| 6 | 173,8 (+1) | 58,1 (-1) | 7,2 (+1) | 29 | 643 | 961 | 1009 | -4,96 |
| 7 | 126,2 (-1) | 81,9 (+1) | 7,2 (+1) | 49 | 543 | 608 | 612 | -0,55 |
| 8 | 173,8 (+1) | 81,9 (+1) | 7,2 (+1) | 100 | 491 | 539 | 581 | -7,81 |
| 9 | 110 (-1,68) | 70 (0) | 6 (0) | 92 | 1024 | 820 | * | |
| 10 | 190 (+1,68) | 70 (0) | 6 (0) | 68 | 907 | 1077 | * | |
| 11 | 150 (0) | 50 (-1,68) | 6 (0) | 100 | 783 | 1314 | * | |
| 12 | 150 (0) | 90 (+1,68) | 6 (0) | 89 | 933 | 989 | * | |
| 13 | 150 (0) | 70 (0) | 4 (-1,68) | 102 | 902 | 889 | * | |
| 14 | 150 (0) | 70 (0) | 8 (+1,68) | 46 | 627 | 1006 | * | |
| 15 | 150 (0) | 70 (0) | 6 (0) | 62 | 623 | 830 | 772 | 6,92 |
| 16 | 150 (0) | 70 (0) | 6 (0) | 91 | 649 | 819 | 772 | 5,69 |
| 17 | 150 (0) | 70 (0) | 6 (0) | 69 | 636 | 850 | 772 | 9,12 |

*Estes ensaios não foram incluídos no modelo de primeira ordem

Os níveis de concentração estudados dos três substratos que compõe o meio de fermentação foram deslocados para valores superiores, conforme indicou a análise das respostas do primeiro planejamento, considerando que os efeitos dos três substratos foram positivos significativos com 5% de significância. Novamente foi realizada paralelamente uma fermentação em triplicata com o meio controle, sem o pré-tratamento. Os resultados estão na Tabela 27.

Tabela 27. Resultados obtidos para o meio controle

| Atividade (U/mL) 24h | Atividade (U/mL) 48h | Atividade (U/mL) 72h |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 264 | 482 | 998 |
| 281 | 471 | 1001 |
| 241 | 499 | 1005 |

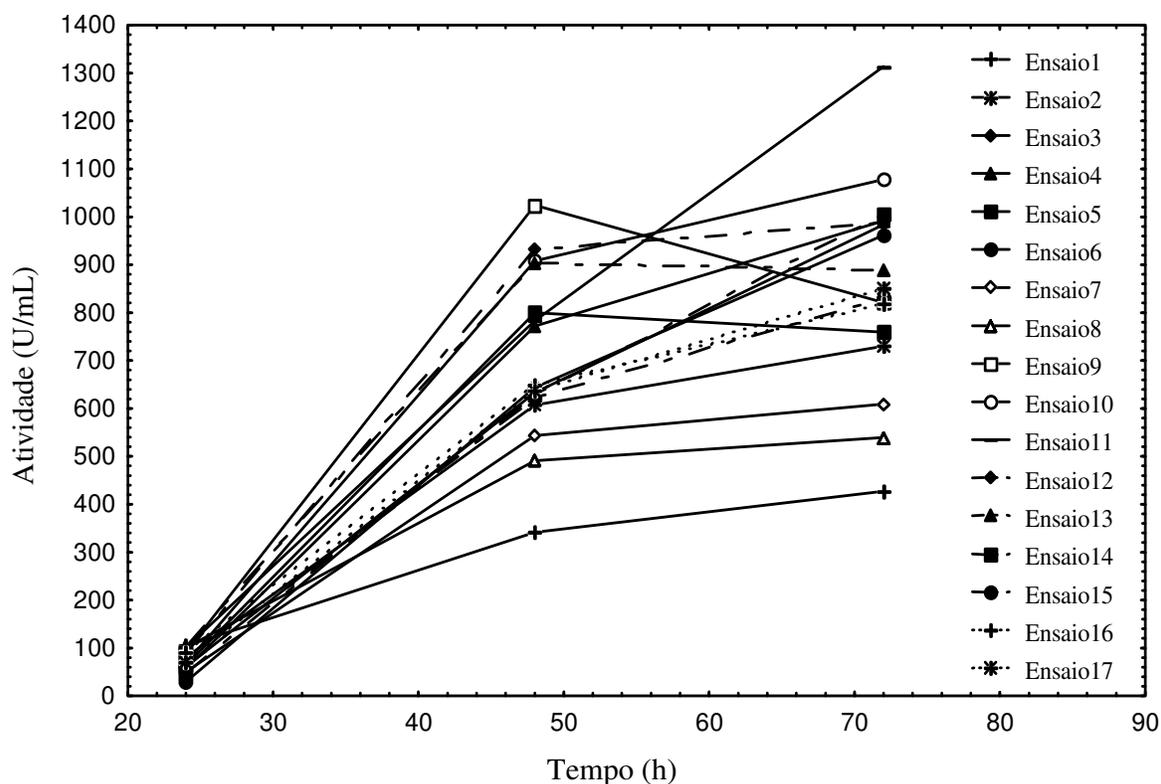


Figura 11. Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o segundo planejamento fatorial completo

Na Figura 11 observa-se que houve um aumento na atividade de inulinase com o passar das horas de fermentação na maioria dos ensaios do planejamento experimental.

A Tabela 28 apresenta os coeficientes de regressão, os desvios padrão e os limites de confiança para a atividade da inulinase, e a Tabela 29 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,94 e o F calculado foi 3,27 vezes maior que o valor tabelado. Estes valores permitem obter um modelo codificado (equação 8) que descreve as respostas em função das variáveis independentes analisadas. Obteve-se então, um modelo de primeira ordem não linear para a atividade enzimática. O parâmetro estatisticamente não significativo foi eliminado do modelo e adicionado à falta de ajuste.

$$\text{Atividade} = 772,98 + 55,49 \cdot \text{Melaço} + 30,68 \cdot \text{AMM} - 33,02 \cdot \text{Ext. lev.} - 71,00 \cdot \text{Melaço} \cdot \text{AMM} - 173,88 \cdot \text{AMM} \cdot \text{Ext.lev.} \quad (\text{Equação 8})$$

O melaço e a AMM apresentaram efeitos positivos sobre a atividade. No entanto, o extrato de levedura apresenta um efeito negativo, indicando que nesta faixa estudada o aumento de sua concentração no meio acarretou uma diminuição na atividade enzimática. É importante salientar que as interações entre os três substratos tiveram efeitos negativos, e ainda que estes valores foram bastante elevados, em especial a interação entre melaço e água de maceração de milho e entre a água de maceração de milho e o extrato de levedura. O fato do efeito de um substrato industrial isolado ser positivo e a interação entre eles ser negativa ocorre devido à composição destes substratos. Nenhum deles pode ser considerado como fonte de nitrogênio, carbono ou outros sais minerais ou vitaminas, pois o melaço e a água de maceração de milho possuem uma composição bastante complexa, que contém diversos nutrientes, que individualmente podem causar efeito positivo, porém a interação entre eles pode ocasionar um excesso em alguns destes nutrientes importantes para a fermentação e causar uma inibição indesejada.

A análise dos efeitos mostra que as concentrações do extrato de levedura devem ser diminuídas. Isto pode ser explicado pelo fato do extrato de levedura possuir em torno de 10,5% de nitrogênio, e assim, como foi aumentada a

concentração da AMM, bem como a concentração do extrato de levedura, a concentração do nitrogênio pode ter ficado em excesso.

Tabela 28. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

| | Coef. De regressão | Desvio padrão | t (2) | p |
|--------------------|--------------------|---------------|--------|-------|
| Média * | 772,98 | 4,73 | 163,53 | 0,000 |
| (1) Melaço (L)* | 55,49 | 5,54 | 10,10 | 0,009 |
| (2)AMM (L)* | 30,68 | 5,54 | 5,54 | 0,031 |
| (3) Ext. lev. (L)* | -33,02 | 5,54 | -5,96 | 0,027 |
| 1L x 2L* | -71,00 | 5,54 | -12,78 | 0,006 |
| 1L x 3L | -22,25 | 5,54 | -4,00 | 0,057 |
| 2L x 3L* | -174,00 | 5,54 | -31,31 | 0,001 |

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

Tabela 29. Análise de variância para a atividade de inulinase

| Fontes de variação | Somas de Quadrados | Graus de liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 323106,2 | 5 | 64621,24 | 16,47 |
| Resíduos | 19615,7 | 5 | 3923,14 | |
| Falta de ajuste | 19124,2 | 3 | | |
| Erro puro | 491,5 | 2 | | |
| Total | 342721 | 10 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro

$F_{0,95;5;5} = 5,05$

Coefficiente de correlação: $R = 0,95$

O modelo permitiu a construção da Figura 12. Analisando-se estas figuras nota-se que em relação ao melaço e a água de maceração de milho, um aumento na concentração do primeiro e diminuição na concentração do segundo ocasionaria um incremento na atividade enzimática, da mesma forma combinando o melaço e o extrato de levedura, um aumento na concentração do primeiro e diminuição na concentração do extrato de levedura acarretaria em um aumento na atividade enzimática.

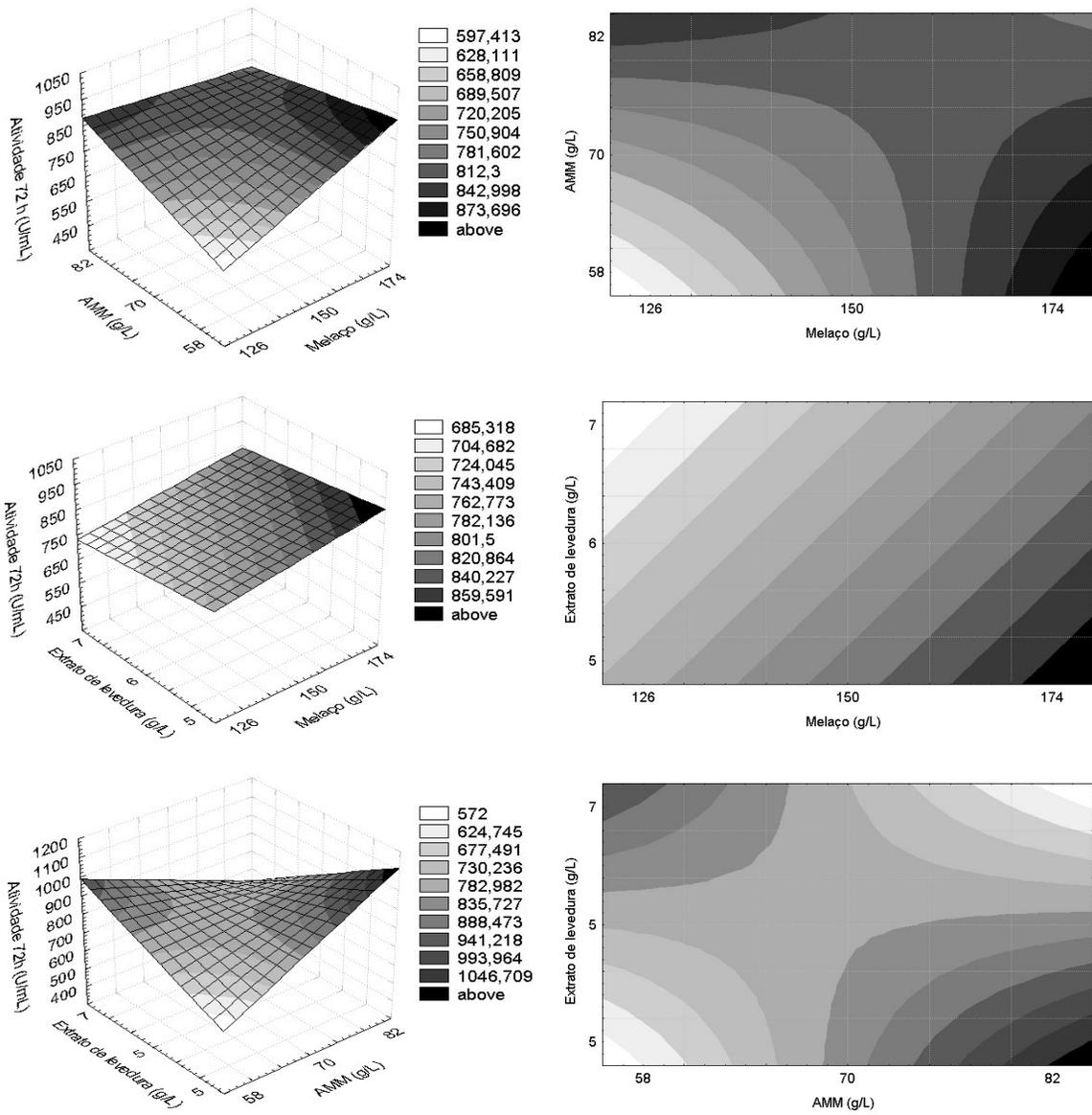


Figura 12. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase em função da concentração: da AMM e do melacha; extrato e levedura e melacha e extrato de levedura e AMM para o segundo planejamento realizado

4.4.3 Terceiro planejamento fatorial completo

Após a análise dos dois planejamentos anteriores, realizou-se um terceiro planejamento experimental fatorial completo apresentado na Tabela 30.

Tabela 30. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de inulinase (AI U/mL) nas 24, 48 e 72h de fermentação, atividade enzimática prevista pelo modelo e o desvio relativo

| Ensaio | Melaço (g/L) | AMM (g/L) | Ext. de Lev. (g/L) | AI 24 h | AI 48 H | AI 72 h | AI Prev 72 h | Desvio (%) |
|--------|--------------|------------|--------------------|---------|---------|---------|--------------|------------|
| 1 | 126,2 (-1) | 38,1 (-1) | 4,8 (-1) | 101 | 406 | 791 | 725 | 8,34 |
| 2 | 173,8 (+1) | 38,1 (-1) | 4,8 (-1) | 101 | 369 | 640 | 492 | 23,16 |
| 3 | 126,2 (-1) | 61,9 (+1) | 4,8 (-1) | 121 | 499 | 930 | 819 | 11,89 |
| 4 | 173,8 (+1) | 61,9 (+1) | 4,8 (-1) | 83 | 297 | 524 | 586 | -11,88 |
| 5 | 126,2 (-1) | 38,1 (-1) | 7,2 (+1) | 100 | 399 | 860 | 765 | 10,97 |
| 6 | 173,8 (+1) | 38,1 (-1) | 7,2 (+1) | 59 | 385 | 480 | 532 | -10,98 |
| 7 | 126,2 (-1) | 61,9 (+1) | 7,2 (+1) | 152 | 697 | 803 | 860 | -7,12 |
| 8 | 173,8 (+1) | 61,9 (+1) | 7,2 (+1) | 99 | 419 | 612 | 627 | -2,45 |
| 9 | 110 (1,68) | 50 (0) | 6 (0) | 115 | 615 | 878 | 979 | -11,48 |
| 10 | 190 (1,68) | 50 (0) | 6 (0) | 112 | 487 | 606 | 588 | 3,01 |
| 11 | 150 (0) | 30 (-1,68) | 6 (0) | 99 | 324 | 536 | 660 | -23,21 |
| 12 | 150 (0) | 70 (1,68) | 6 (0) | 91 | 650 | 861 | 819 | 4,89 |
| 13 | 150 (0) | 50 (0) | 4 (-1,68) | 89 | 312 | 451 | 579 | -28,46 |
| 14 | 150 (0) | 50 (0) | 8 (1,68) | 59 | 521 | 694 | 648 | 6,63 |
| 15 | 150 (0) | 50 (0) | 6 (0) | 112 | 798 | 1291 | 1289 | 0,18 |
| 16 | 150 (0) | 50 (0) | 6 (0) | 110 | 751 | 1289 | 1289 | 0,01 |
| 17 | 150 (0) | 50 (0) | 6 (0) | 102 | 712 | 1301 | 1289 | 0,94 |

Neste planejamento diminui-se a faixa de estudo da água de maceração de milho (30 a 70 g/L) e manteve-se as mesmas faixas para a concentração de melaço e extrato de levedura. A Tabela 30 apresenta os valores reais, codificados e as respostas para a atividade enzimática para 24, 48, e 72h neste planejamento, bem como a atividade prevista pelo modelo à 72h de fermentação e o desvio relativo para cada ensaio.

Novamente foi feito em paralelo uma fermentação em triplicata com o meio controle, sem o pré-tratamento, utilizando-se o mesmo inóculo. Estes resultados

estão apresentados na Tabela 31. Para melhor visualização dos resultados é apresentada a Figura 13, que representa o desenvolvimento da atividade enzimática em função do tempo de fermentação.

Tabela 31. Resultados obtidos para o meio controle

| Atividade (U/mL) 24h | Atividade (U/mL) 48h | Atividade (U/mL) 72h |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 282 | 484 | 999 |
| 291 | 489 | 992 |
| 278 | 471 | 999 |

Observando os resultados obtidos neste planejamento, verifica-se que os ensaios que apresentaram uma maior atividade enzimática foram os ocorridos em 72h de fermentação. Além disso, esses pontos correspondem aos pontos centrais do meio de cultura para a produção de inulinase. A Tabela 32 apresenta a análise da variância (ANOVA).

A equação 9 apresenta o modelo codificado otimizado para a produção da inulinase em meio industrial pré-tratado, o qual foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 32. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,95) e o F calculado (3,6 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 14, que mostram que a atividade enzimática da inulinase em meios industriais pré-tratados foi otimizada.

$$\text{Atividade} = 1289,04 - 116,47 \cdot \text{Melaço} - 179,07 \cdot \text{Melaço}^2 + 47,19 \cdot \text{AMM} - 194,58 \cdot \text{AMM}^2 + 20,36 \cdot \text{Ext.Lev.} - 239,18 \cdot \text{Ext.Lev.}^2 \quad (\text{equação 9})$$

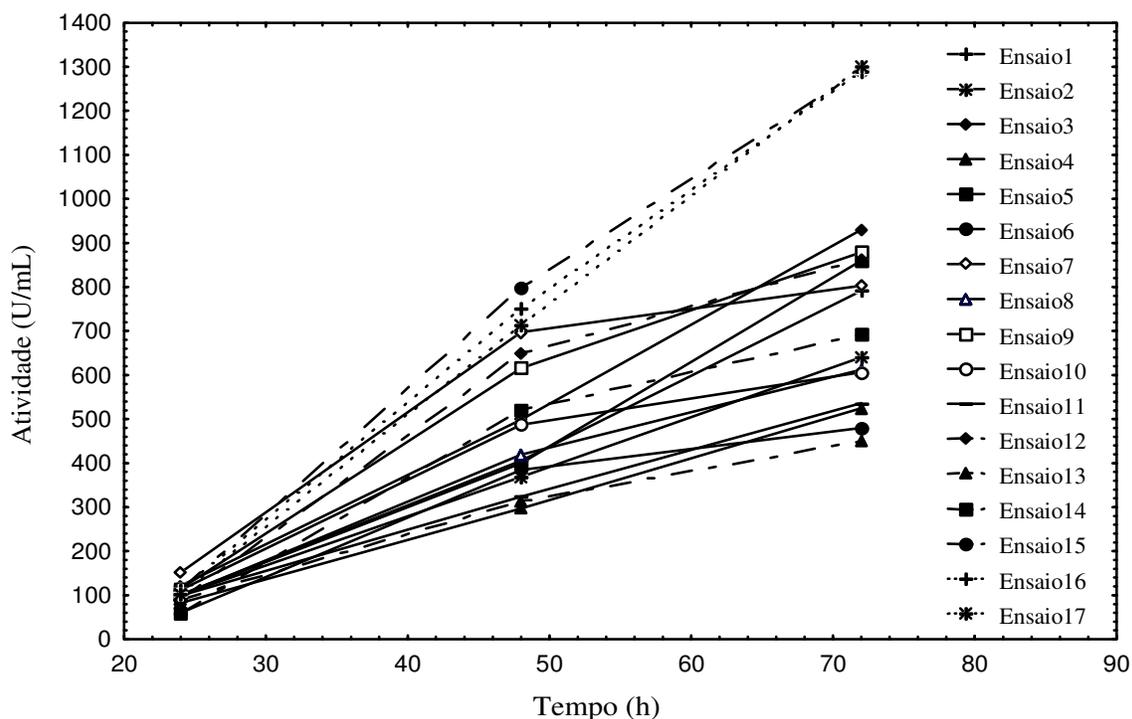


Figura 13. Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o terceiro planejamento fatorial completo

Tabela 32. Análise de Variância para a atividade de inulinase

| Fontes de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 1137029 | 6 | 189504,8 | 18,18 |
| Resíduos | 104206 | 10 | 10420,6 | |
| Falta de ajuste | 104124 | 8 | | |
| Erro puro | 82 | 2 | | |
| Total | 1241235 | 16 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

$F_{0,95;6;10}=3,22$

Coefficiente de correlação: $R=0,95$

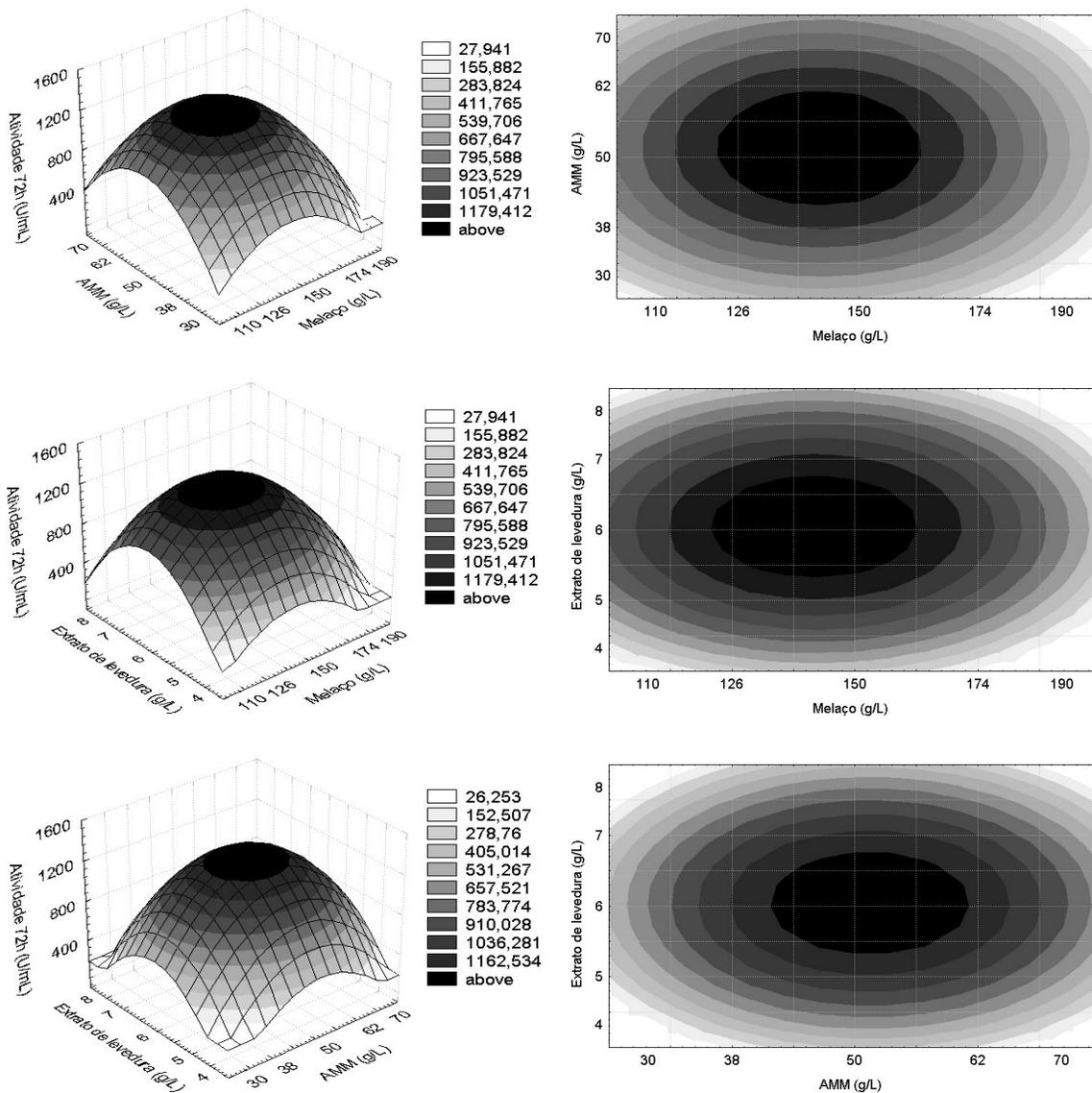


Figura 14. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: da AMM e do melaço; extrato de levedura e melaço e extrato de levedura e AMM para o terceiro planejamento realizado

Sendo possível obter as superfícies de resposta e estudá-las, verificou-se que as condições que levam à maior atividade enzimática são: a concentração de melaço na faixa de 125 a 160g/L, água de maceração de milho entre 40 e 60g/L e o extrato de levedura de 5,5 a 6,5g/L.

Outra análise que pode ser feita, através da derivação parcial da equação 9 em relação a cada uma das variáveis estudadas, pelo método de cálculo diferencial para obtenção do ponto de máximo, é possível obter a condição otimizada exata do meio de cultura, apresentados na Tabela 33. Estes valores são praticamente iguais as concentrações na condição do ponto central do Planejamento Experimental: 150 g/L de melação, 50 g/L de água de maceração de milho e 6 g/L de extrato de levedura.

Tabela 33. Resultados da aplicação do método de cálculo diferencial do ponto de máximo na equação 9

| Substrato | Valores Codificados das Concentrações Ótimas Calculadas | Valores Reais das Concentrações Ótimas Calculadas (g/L) |
|--------------|---|---|
| Melaço | -0,3252 | 142,26 |
| AMM | 0,1213 | 51,44 |
| Ext. de lev. | 0,0426 | 6,05 |

Caso os valores codificados das concentrações, obtidos no cálculo dos pontos de máximo das superfícies de resposta, sejam substituídos na equação 9, obtém-se o valor da atividade enzimática máxima para as condições estudadas. Este valor calculado é de 1311 U/mL, o que confere com a faixa de respostas obtidas experimentalmente nas 72h de fermentação nas condições do ponto central descritas na Tabela 30, nos ensaios 15, 16, 17, apresentando atividade média igual a 1294 U/mL, ou seja, um desvio de 1,3%, valor este dentro do erro experimental de análise de atividade enzimática.

4.4.4 Cinética de fermentação do meio otimizado em frascos agitados

Após a otimização da inulinase em frascos agitados, foi realizada uma cinética de fermentação. O acompanhamento cinético pode ser verificado na Tabela 34 e Figura 15. Observa-se que a concentração de açúcares redutores

totais (ART) tem um grande decréscimo na sua concentração no início do tempo de fermentação e a atividade enzimática tem seu incremento após o consumo quase total do ART.

Tabela 34. Cinética da produção da inulinase no meio otimizado em frascos

| Tempo (h) | pH | Massa Seca (g/L) | ART (g/L) | Atividade enzimática (U/mL) |
|-----------|------|------------------|-----------|-----------------------------|
| 0 | 5,1 | 6,0 | 59,2 | 0 |
| 12 | 6,1 | 12,4 | 6,3 | 42 |
| 24 | 6,24 | 23,8 | 5,1 | 108 |
| 36 | 7,02 | 20,1 | 2,4 | 403 |
| 48 | 7,12 | 18,2 | 2,0 | 760 |
| 60 | 7,01 | 18,0 | 1,8 | 1005 |
| 72 | 7,04 | 18,5 | 1,2 | 1285 |

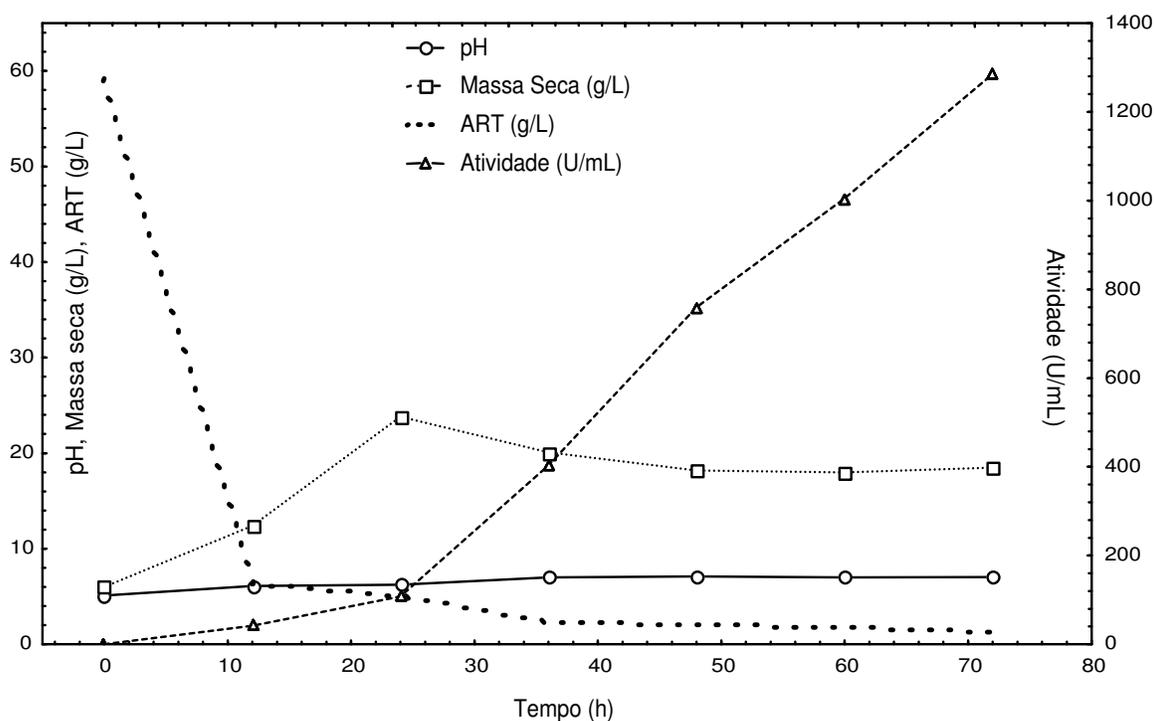


Figura 15. Cinética da fermentação em Frascos Agitados

4.5 Ensaio de purificação da enzima inulinase

Após a otimização do meio de cultivo industrial pré-tratado foram realizados experimentos para verificar a viabilidade de estudos de recuperação e purificação da enzima diretamente com o caldo bruto (com células) em leite expandido.

A enzima a ser purificada foi obtida em fermentação com *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 nas condições otimizadas no item anterior. Nos ensaios de purificação foi utilizada a enzima obtida no ponto central do terceiro planejamento experimental realizado em frascos agitados, caracterizando a enzima produzida nas condições otimizadas dentro da faixa estudada. O caldo bruto foi diluído na proporção de 1:3 com intuito de diminuir a densidade do meio fermentado e também manter a enzima em contato com a resina por mais tempo para que favoreça a adsorção da enzima pela resina. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl em degrau. A Figura 16 apresenta a diferença no caldo fermentado com e sem o pré-tratamento principalmente em relação aos precipitados formados que impediam sua purificação direta em leite expandido. Os resultados obtidos na purificação estão apresentados na Tabela 35. As atividades foram medidas apenas nas frações de eluição com solução salina onde apresentaram hidrólise da sacarose, nas frações em que foram eluídas com a solução salinas de 0,5 M não apresentaram hidrólise.

A recuperação em relação a quantidade da enzima alimentada foi de 25%, e as duas frações com as maiores atividade somam 12% de recuperação, é um valor bem abaixo do esperado, porém convém salientar que com meio industrial sem o pré-tratamento não foi possível a purificação direta do caldo bruto fermentado, pois ocorriam entupimentos na resina, inclusive ocasionando impossibilidade posterior de recuperação da mesma. Portanto, sugere-se um estudo detalhado da purificação da enzima inulinase produzida em meios industriais pré-tratados com o intuito de otimizá-la, visto que se verificou a viabilidade de purificação direta do caldo bruto fermentado sem necessidade de etapas intermediárias.

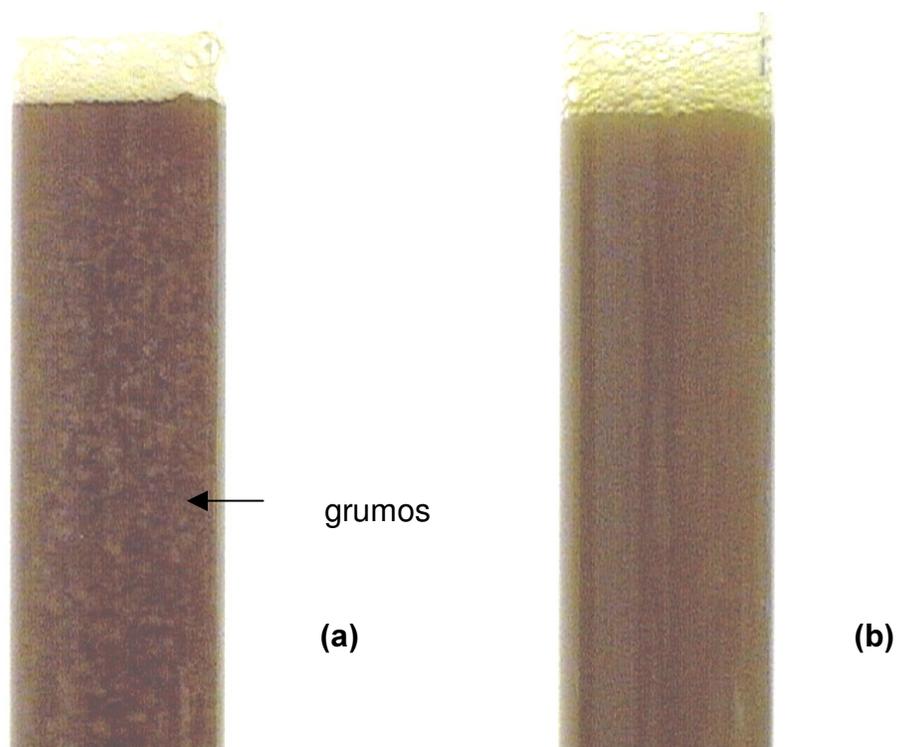


Figura 16. (a) Caldo fermentado em meio industrial controle após 72h de fermentação; (b) Caldo fermentado em meio industrial pré-tratado após 72h de fermentação

Tabela 35. Purificação em leite expandido

| Fração | U/mL | U Total | Prot. Total | U/mg | FP* |
|-----------|--------|---------|-------------|--------|------|
| Caldo | 217,51 | 65253 | 1145 | 56,99 | 1 |
| Fração 18 | 72,42 | 3621 | 9 | 402,33 | 7,06 |
| Fração 19 | 81,90 | 4095 | 19 | 215,53 | 3,78 |

*FP = Fator de recuperação em relação ao caldo bruto

4.6 Caracterização parcial da enzima

Após a purificação da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados diretamente a partir do caldo bruto fermentado em leite expandido, esta enzima foi caracterizada.

4.6.1 Temperatura ótima e pH ótimo

A determinação dos valores de temperatura e pH ótimo foi feita através da realização de um planejamento fatorial 2^2 completo com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, e a matriz do planejamento experimental bem como os resultados de atividade enzimática obtidos estão apresentados na Tabela 36. Observando-se os resultados de atividade enzimática obtida, verifica-se que o valor máximo encontra-se no ensaio 5, o qual corresponde a um pH de 4,5 e temperatura de 55°C. É importante ressaltar que as atividades enzimáticas são baixas porque o extrato enzimático obtido na purificação em leite expandido foi diluído para que toda a caracterização pudesse ser realizada a partir de um mesmo ensaio de purificação.

Em relação ao pH ótimo, Pessoa e Vitolo (1999) caracterizaram a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* e encontraram um valor de 5,0. Um resultado similar foi obtido por Xiao *et al.* (1989), sendo que a temperatura ótima para a inulinase obtida foi de 55°C. Manzoni e Cavazzoni (1988) estudaram a caracterização de inulinase de quatro leveduras (*Candida kefir*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces cicerisporus* e *Kluyveromyces fragilis*) e encontraram um pH ótimo de 4,7 e uma temperatura ótima de 60°C para todas as leveduras estudadas. Barthomeuf *et al.* (1991) estudaram a inulinase de *Penicillium rugulosum*, encontrando um pH ótimo entre 5,5 e 5,6. Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 foi encontrado um pH e temperatura ótima de 5,0 e de 50°C, respectivamente (Cruz-Guerrero *et al.*, 1995). Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a máxima atividade obtida foi no pH 4,0

(Rouwenhorst *et al.*,1988). A máxima atividade obtida por Santos (2002) para a enzima inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 foi obtida em pH 4,8 e temperatura de 63°C.

Tabela 36. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de inulinase

| Ensaio | pH | Temperatura (°C) | Atividade enzimática (U/mL) |
|--------|-------------|------------------|-----------------------------|
| 1 | 4,64 (-1) | 44,4 (-1) | 19,46 |
| 2 | 5,36 (1) | 44,4 (-1) | 11,84 |
| 3 | 4,64 (-1) | 65,6 (+1) | 23,93 |
| 4 | 5,36 (1) | 65,6 (+1) | 17,66 |
| 5 | 4,5 (-1,41) | 55 (0) | 47,16 |
| 6 | 5,5 (+1,41) | 55 (0) | 12,42 |
| 7 | 5 (0) | 40 (-1,41) | 6,61 |
| 8 | 5 (0) | 70 (+1,41) | 7,82 |
| 9 | 5 (0) | 55 (0) | 26,41 |
| 10 | 5 (0) | 55 (0) | 24,70 |
| 11 | 5 (0) | 55 (0) | 25,16 |

Tabela 37. Análise de variância para a atividade de inulinase

| Fontes de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 1182,13 | 5 | 263,43 | 10,07 |
| Resíduos | 117,32 | 5 | 23,46 | |
| Falta de ajuste | 115,75 | 3 | | |
| Erro Puro | 1,57 | 2 | | |
| Total | 1299,45 | 10 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

$F_{0,95;5;5}=5,05$

Coeficiente de correlação: $R = 0,95$

A Tabela 37 apresenta a análise de variância para a atividade enzimática obtida nos níveis estudados. Verifica-se que o coeficiente de correlação e o F calculado permitiram a validação do modelo codificado apresentado na equação 10.

Este modelo possibilitou a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentada na Figura 17.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = 25,42 - 7,88 \cdot \text{pH} + 2,14 \cdot \text{pH}^2 + 1,50 \cdot \text{Temperatura} - 9,22 \cdot \text{Temperatura}^2 \quad (\text{Equação 10})$$

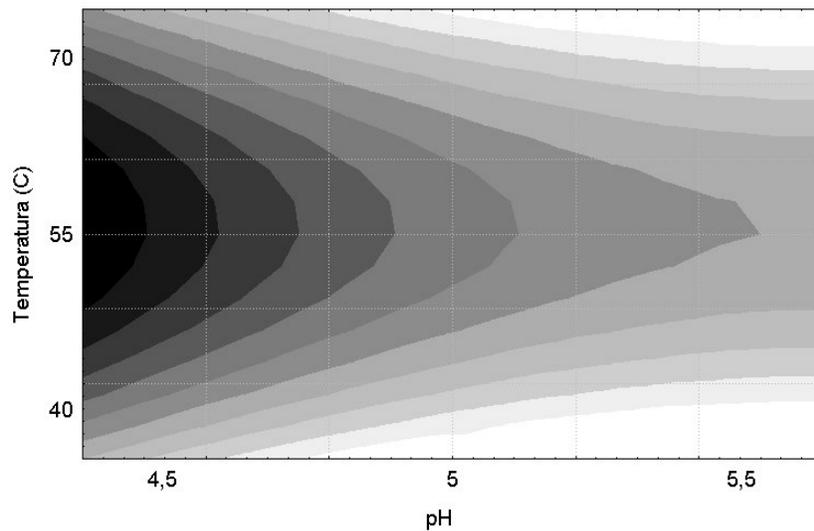
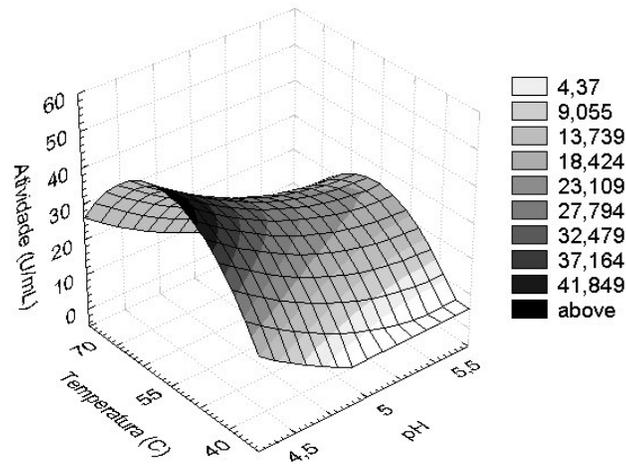


Figura 17. Atividade enzimática em função da temperatura e pH

4.6.2 Influência da temperatura de estabilidade para a enzima inulinase

Os resultados obtidos de atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas, de 50 a 60°C, estão

apresentados nas Tabela 38 a Tabela 42. Estas mostram o decréscimo da atividade enzimática com o tempo, a diferentes temperaturas.

Tabela 38. Acompanhamento da atividade da inulinase na temperatura de 50°C

| Tempo (h) | Atividade (U/mL) | Ln (A/Ao) |
|-----------|------------------|-----------|
| 1,5 | 6,84 | -0,0260 |
| 4 | 6,19 | -0,1258 |
| 6 | 5,94 | -0,1671 |
| 8 | 5,74 | -0,2013 |
| 11 | 5,62 | -0,2224 |
| 22 | 5,23 | -0,2944 |
| 31 | 4,78 | -0,3843 |
| 46 | 4,08 | -0,5427 |

Tabela 39. Acompanhamento da atividade da inulinase na temperatura de 52,5°C

| Tempo (h) | Atividade (U/mL) | Ln (A/Ao) |
|-----------|------------------|-----------|
| 1 | 13,62 | -0,0261 |
| 2 | 13,02 | -0,0711 |
| 4 | 12,89 | -0,0812 |
| 6 | 12,37 | -0,1224 |
| 7 | 10,54 | -0,2825 |
| 8 | 9,61 | -0,3748 |
| 9 | 9,01 | -0,4393 |
| 10 | 8,82 | -0,4606 |
| 11 | 7,12 | -0,6747 |
| 12 | 6,54 | -0,7597 |

Tabela 40. Acompanhamento da atividade da inulinase na temperatura de 55°C

| Tempo (h) | Atividade (U/mL) | Ln (A/Ao) |
|-----------|------------------|-----------|
| 0,5 | 12,02 | -0,1511 |
| 1,5 | 10,76 | -0,2618 |
| 2 | 10,54 | -0,2825 |
| 2,5 | 7,12 | -0,6747 |
| 4 | 6,26 | -0,8034 |
| 6 | 4,1 | -1,2266 |
| 8 | 3,64 | -1,3456 |

Tabela 41. Acompanhamento da atividade da inulinase na temperatura de 57,5°C

| Tempo (h) | Atividade (U/mL) | Ln (A/Ao) |
|-----------|------------------|-----------|
| 0,33 | 9,34 | -0,1046 |
| 0,67 | 7,01 | -0,3916 |
| 1 | 4,67 | -0,7978 |
| 1,33 | 2,79 | -1,3129 |
| 1,67 | 2,28 | -1,5147 |

Tabela 42. Acompanhamento da atividade da inulinase na temperatura de 60°C

| Tempo (h) | Atividade (U/mL) | Ln (A/Ao) |
|-----------|------------------|-----------|
| 0,25 | 9 | -0,1417 |
| 0,5 | 6,55 | -0,4595 |
| 0,75 | 1,94 | -1,6762 |
| 1 | 0,91 | -2,4332 |
| 1,25 | 0,17 | -4,1109 |

Através dos resultados encontrados para a temperatura de estabilidade para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 observou-se que a temperatura de maior estabilidade é a de 50°C dentro da faixa estudada.

Santos (2002) apresentou a temperatura de 50°C como a de maior estabilidade para a enzima livre de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045. Öngen-Baysel *et al.*, (1994), verificaram que a enzima inulinase de *Aspergillus niger* apresentava uma estabilidade máxima a 50°C.

Os dados obtidos experimentalmente foram graficados em $\ln A/A_0$ vs tempo e desses gráficos, obteve-se um valor de K_d (constante de desativação térmica) para cada temperatura, como mostra a Tabela 43. Com estes valores, graficou-se o $\ln K_d$ em função de $1/T$ (K) para o cálculo de E_d (energia de ativação para a reação de desnaturação), mostrado na Figura 18.

Tabela 43. Valores de desativação térmica para cada temperatura estudada

| T (°C) | T (K) | Kd Experimental | 1/T (K) | Ln Kd |
|--------|--------|-----------------|----------|---------|
| 50 | 323,15 | 0,009 | 0,003095 | -4,7105 |
| 52,5 | 325,65 | 0,0655 | 0,003071 | -2,7257 |
| 55 | 328,15 | 0,1732 | 0,003047 | -1,7533 |
| 57,5 | 330,65 | 1,1194 | 0,003024 | 0,1128 |
| 60 | 333,15 | 3,9649 | 0,003002 | 1,3775 |

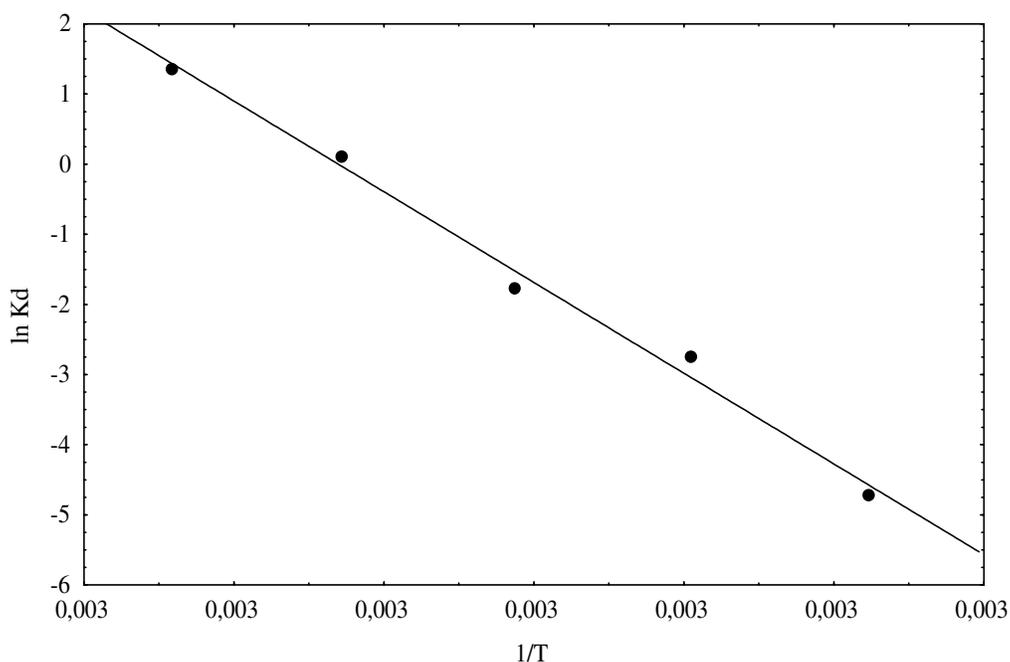


Figura 18. Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius

Com os valores de Kd em função da temperatura graficou-se Ln Kd em função do inverso da temperatura (Figura 18) para o cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação (Ed).

$$\ln Kd = \ln Kdo - Ed/RT$$

A partir da inclinação da reta obtêm-se o valor de Ed, que é 128503,26 cal/mol.

A expressão para determinar os valores de Kd é:

Kd (teórico) = Kdo * exp(-Ed/RT), sendo T = temperatura em Kelvin.

Os valores dos tempos de meia vida (min) foram calculados de acordo com a equação 11, para as temperaturas estudadas, como mostra a Tabela 44. A Figura 19 apresenta os valores de Kd teórico e experimental.

$$t_{1/2} = -\ln 0,5 / K_d \quad (\text{Equação 11})$$

Tabela 44. Valores de Kd e tempos de meia vida, teóricos e experimentais, estimados para enzima livre

| T(k) | Kd teórico | t _{1/2} (h) teórico | Kd experimental | t _{1/2} (h) experimental |
|--------|------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| 323,15 | 0,0104 | 66,9151 | 0,0090 | 77,0164 |
| 325,65 | 0,0481 | 14,3972 | 0,0655 | 10,5824 |
| 328,15 | 0,2186 | 3,1710 | 0,1732 | 4,0020 |
| 330,65 | 0,9700 | 0,7146 | 1,1194 | 0,6192 |
| 333,15 | 4,2092 | 0,1647 | 3,9649 | 0,1748 |
| 323,15 | 0,0104 | 66,9151 | 0,0090 | 77,0164 |
| 325,65 | 0,0481 | 14,3972 | 0,0655 | 10,5824 |

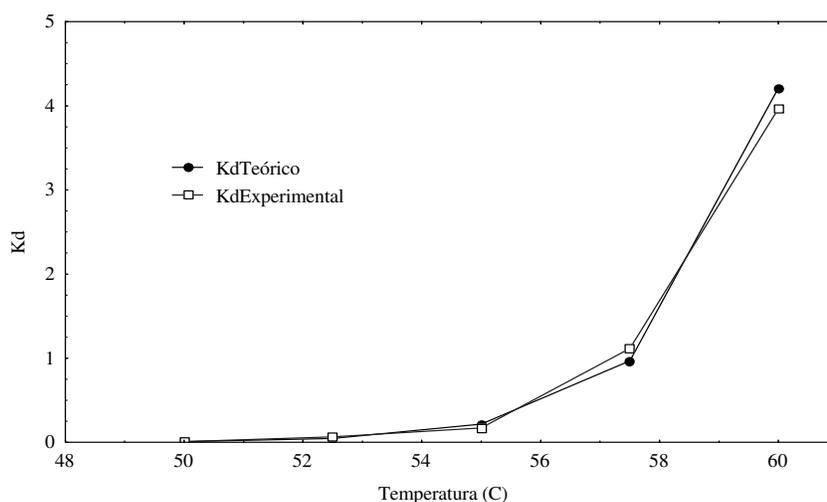


Figura 19. Gráfico do Kd teórico e experimental versus temperatura

4.6.3 Influência do pH no estudo da estabilidade da enzima inulinase

A estabilidade da inulinase foi verificada incubando-a em diferentes valores de pH (4,0 – 5,6) em tampão acetato de sódio 0,1M a 50°C. Os resultados estão apresentados na Tabela 45 e graficados na Figura 20. A análise dos resultados

demonstra que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 apresenta uma maior estabilidade em pH 4,4 e 4,8. Santos (2002) verificou que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* também apresentou maior estabilidade em valores de pH 4,4 e 4,8. A inulinase de *Penicillium* sp. TN-88 apresentou uma faixa de maior estabilidade entre 5,0 e 7,0 (Nakamura *et al.*, 1997) e 5,0 e 6,0, em tampão citrato-fosfato para inulinase de *Aspergillus niger* (Öngen-Baysel *et al.*, 1994). Barthomeuf *et al.* (1991) encontraram para inulinase de *Penicillium rugulosum* uma maior estabilidade no intervalo de pH 4,0 até 6,5 com 24 horas de incubação.

Tabela 45. Valores das atividades enzimáticas versus os valores de pH estudados

| Tempo (h) | pH = 4,0 | pH = 4,4 | pH = 4,8 | pH = 5,0 | pH = 5,2 | pH = 5,6 |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1,5 | 6 | 6,56 | 6,84 | 5,39 | 6,08 | 6,27 |
| 4 | 5,6 | 6,24 | 6,19 | 5,09 | 5,68 | 4,83 |
| 6 | 4,81 | 5,78 | 5,53 | 4,21 | 5,14 | 4,47 |
| 8 | 4,53 | 5,73 | 5,46 | 3,71 | 4,47 | 4,18 |
| 11 | 4,47 | 5,72 | 5,35 | 3,47 | 4,44 | 3,22 |
| 22 | 4,24 | 5,71 | 5,23 | 3,43 | 4,40 | 2,01 |
| 31 | 4,01 | 5,52 | 4,78 | 3,41 | 3,80 | 0,92 |
| 46 | 2,11 | 4,22 | 4,08 | 3,38 | 2,85 | 0,45 |
| 58 | | 3,80 | 3,18 | 2,42 | | |
| 82 | | 3,33 | 3,12 | | | |

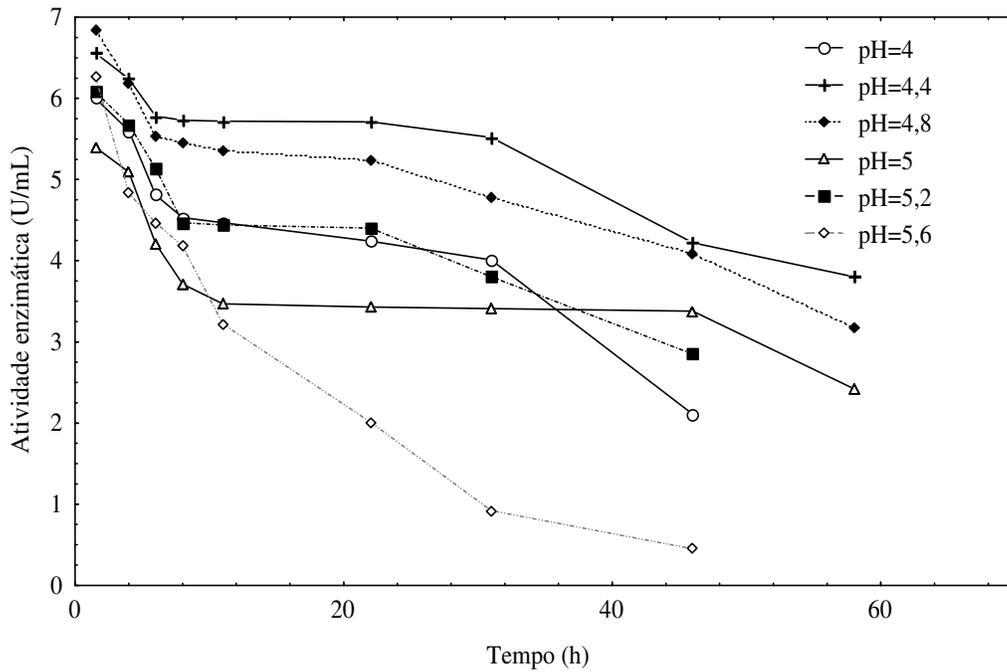


Figura 20. Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase

4.6.4. Determinação de Km e Vmáx

Na Tabela 46 e na Figura 21 estão apresentados os valores das atividades enzimáticas (U/mL) utilizando uma faixa de concentração de substrato sacarose de 0,5 a 35 g/L.

Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Para a determinação dos parâmetros utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a Equação 12:

$$v = \frac{v_{máx} * [S]}{Km + [S]} \quad \text{(Equação 12)}$$

Através da linearização temos a equação 13:

$$\frac{1}{v} = \frac{Km}{v_{máx}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{máx}} \quad \text{(Equação 13)}$$

Tabela 46. Atividade enzimática em função da concentração de sacarose [S]

| S (g/L) | S (mol/L) | AI (U/mL) | 1/S (L/mol) | 1/AI |
|---------|-----------|-----------|-------------|------|
| 0,5 | 0,001 | 1,02 | 684,93 | 0,98 |
| 0,75 | 0,002 | 1,47 | 456,62 | 0,68 |
| 1 | 0,002 | 2,14 | 342,47 | 0,47 |
| 1,5 | 0,004 | 3,04 | 228,31 | 0,33 |
| 2 | 0,005 | 3,92 | 171,23 | 0,26 |
| 3 | 0,008 | 5,55 | 114,03 | 0,18 |
| 4 | 0,011 | 5,15 | 85,54 | 0,19 |
| 5 | 0,014 | 5,54 | 68,45 | 0,18 |
| 10 | 0,029 | 5,64 | 34,25 | 0,18 |
| 15 | 0,043 | 7,17 | 22,83 | 0,14 |
| 20 | 0,058 | 7,11 | 17,12 | 0,14 |
| 25 | 0,073 | 7,87 | 13,68 | 0,13 |
| 30 | 0,087 | 8,42 | 11,42 | 0,12 |
| 35 | 0,102 | 7,73 | 9,78 | 0,13 |

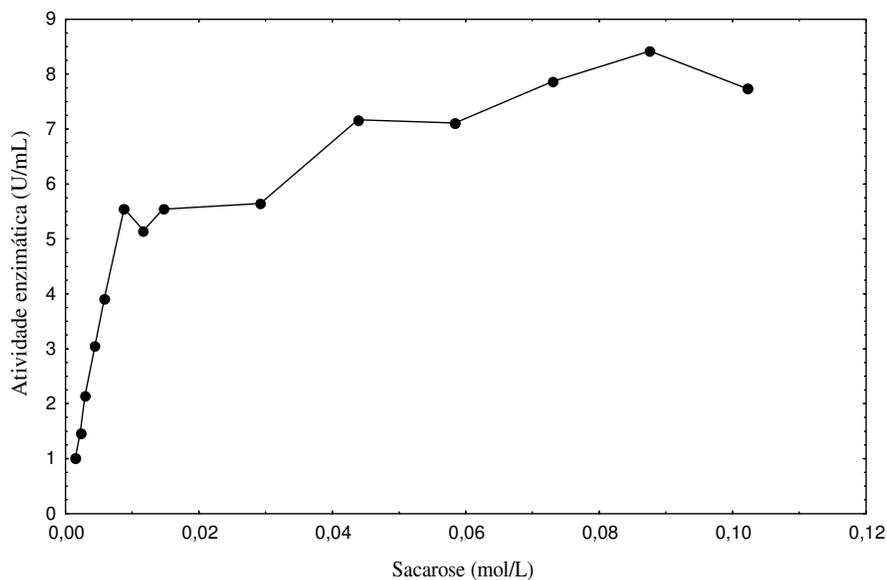


Figura 21. Velocidade de reação da inulinase (atividade enzimática) a temperatura de 50°C em função da concentração de substrato

Graficando-se $1/[S]$ versus $1/A$, conforme a Figura 22, obtem-se K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

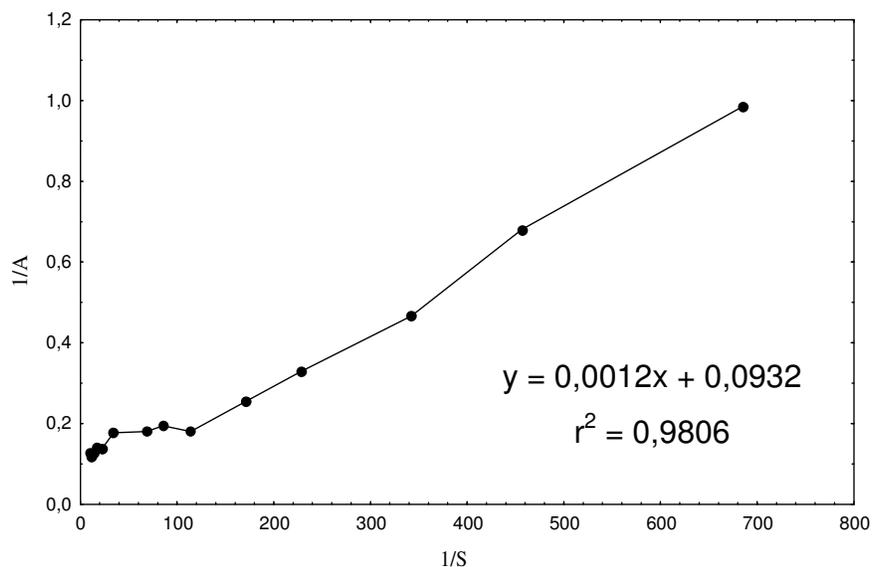


Figura 22. Gráfico linearizado para determinação dos parâmetros cinéticos Km e V_{máx}

Pela equação do gráfico linearizado, obtem-se os valores de Km e V_{máx}. A equação foi a seguinte:

$$1/v = 0,0012 (1/[S]) + 0,0932 \text{ com } R^2 = 0,98$$

Os valores de Km e V_{máx} calculados neste estudo encontram-se na Tabela 47.

Tabela 47. Parâmetros cinéticos Km e V_{máx}

| | Km (M) | V _{máx} (Mol/min.L) |
|---|--------|------------------------------|
| 1 | 0,0129 | 10,72 |
| 2 | 0,024 | 11,064 |

1. Inulinase purificada em coluna de leito expandido, produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meio industrial pré-tratado (neste trabalho)
2. Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* (Contieiro, 1992).

4.7 Otimização da produção de inulinase em fermentador de bancada

4.7.1 Ensaio preliminares

Ensaio preliminar 1 – Meio otimizado em frascos agitados, sem pré-tratamento conduzido em fermentador de bancada a 200 rpm e 1 vvm

O primeiro ensaio preliminar realizado consistiu em utilizar o meio industrial otimizado em frascos agitados sem o pré-tratamento com carvão ativo, para que fosse possível verificar o comportamento da produção de inulinase. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 48 e Figura 23. A produção da enzima em frascos agitados com o pré-tratamento atingiu valores de atividade na ordem de grandeza de 1200 a 1300 U/mL para 72 horas de fermentação. No entanto, no fermentador de bancada com o mesmo meio otimizado em frascos agitados, porém sem o pré-tratamento, a atividade atingiu 425 U/mL após 55 horas e em 72 horas estava a 350 U/mL.

Tabela 48. Resultados de atividade enzimática em função do tempo para o ensaio preliminar 1

| Tempo (h) | AI (U/mL) | Tempo (h) | AI (U/mL) |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 12 | 212 | 55 | 425 |
| 24 | 340 | 63 | 403 |
| 40 | 418 | 72 | 350 |
| 48 | 418 | --- | --- |

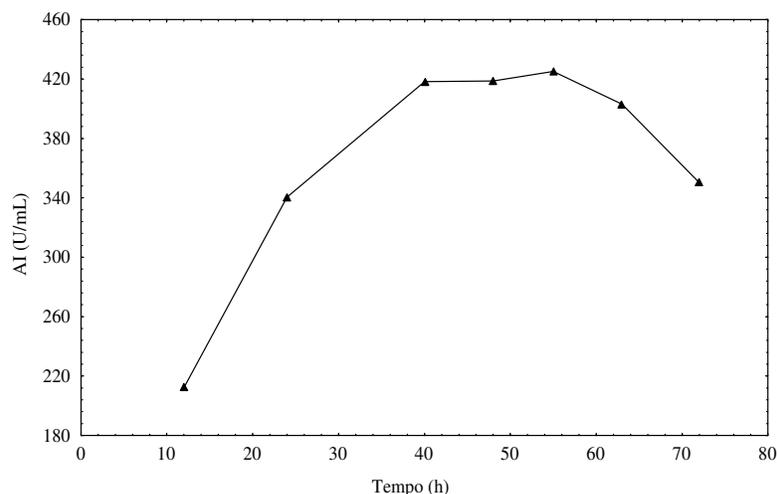


Figura 23. Acompanhamento da atividade enzimática em meio industrial sem o pré-tratamento

Ensaio preliminar 2 – Idem Ensaio preliminar 1, porém com meio pré-tratado

No ensaio preliminar 2 a agitação foi de 200 rpm e a aeração de 1 vvm, porém as concentrações dos substratos foram mantidas nos mesmos valores daqueles otimizados em frascos agitados, 6 g/L extrato de levedura; 50 g/L AMM e 150 g/L melação.

O valor de atividade enzimática máxima conseguido em fermentador de bancada no ensaio preliminar 2 foi de 400 U/mL após 48 horas, ficando ainda muito abaixo dos valores obtidos nos frascos agitados (1200 – 1300 U/mL). Os resultados alcançados para esse ensaio preliminar estão na Tabela 49 e na Figura 24.

Tabela 49. Resultados de atividade enzimática em função do tempo para o ensaio preliminar 2

| Tempo (h) | AI (U/mL) | Tempo (h) | AI (U/mL) |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 12 | 210 | 55 | 375 |
| 24 | 280 | 63 | 350 |
| 40 | 345 | 72 | 245 |
| 48 | 400 | --- | --- |

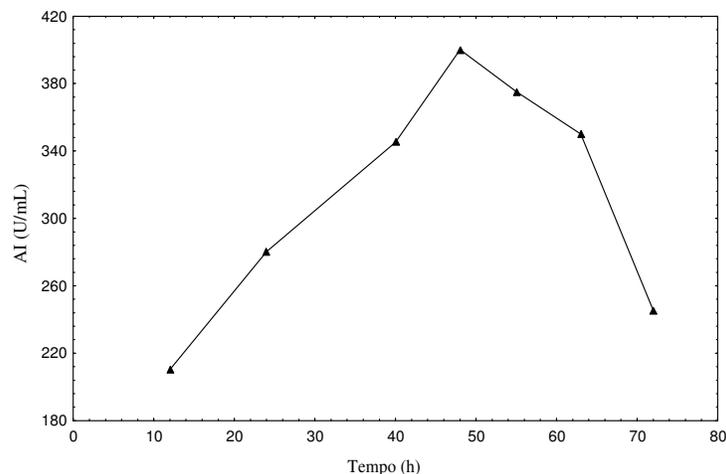


Figura 24. Acompanhamento da atividade enzimática em meio industrial pré-tratado e com condições 1vvm e 200 rpm

Ensaio preliminar 3 - Meio otimizado em frascos agitados, com pré-tratamento conduzido em fermentador de bancada a 300 rpm e 1,5 vvm

Como no ensaio preliminar 2 os valores de atividade enzimática atingidos foram inferiores aos atingidos em frascos agitados, o ensaio preliminar 3 foi realizado aumentando-se os níveis de agitação e aeração para 300 rpm e 1,5 vvm, respectivamente. Novamente as concentrações dos substratos foram mantidas as mesmas.

Os resultados obtidos (Tabela 50 e Figura 25) mostram que houve um incremento na atividade enzimática que atingindo um máximo de 622 U/mL em 48 horas de fermentação. No entanto esse valor ainda permaneceu muito abaixo do atingido em frascos agitados (1200 – 1300 U/mL).

Tabela 50. Resultados de atividade enzimática em função do tempo para o ensaio preliminar 3

| Tempo (h) | AI (U/mL) | Tempo (h) | AI (U/mL) | Tempo (h) | AI (U/mL) |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 5 | 202 | 24 | 466 | 48 | 622 |
| 10 | 256 | 30 | 479 | 52 | 598 |
| 13 | 320 | 33 | 485 | 64 | 521 |
| 16 | 390 | 40 | 502 | 69 | 449 |
| 18 | 444 | 45 | 592 | 72 | 300 |

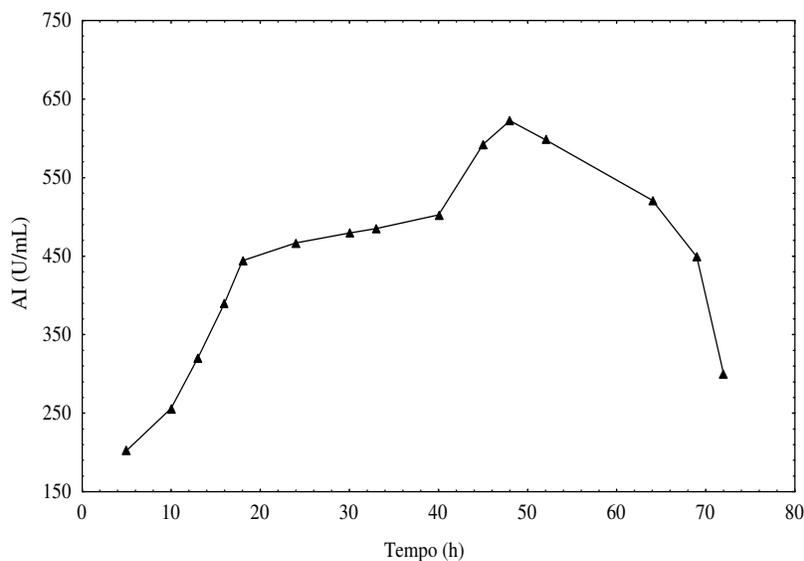


Figura 25. Acompanhamento da atividade enzimática em meio industrial pré-tratado e com condições 1,5vvm e 300 rpm

4.7.2 Planejamento experimental do tipo Plackett Burman

Como os ensaios preliminares de variação de aeração e agitação no fermentador com meio pré-tratado apresentaram resultados inferiores aos obtidos com frascos agitados, decidiu-se incluir no planejamento experimental não só as variáveis operacionais (agitação e aeração), mas também as de composição do meio (concentração de AMM, melão e extrato de levedura) neste estudo de aumento de escala. Assim, realizou-se um planejamento do tipo Plackett Burman de 12 ensaios mais 3 pontos centrais, para que pudessem ser avaliados os efeitos principais de cada variável na resposta atividade enzimática. A Tabela 51 apresenta os valores reais, codificados e as respostas para a atividade enzimática neste planejamento, bem como a atividade prevista pelo modelo à 72h de fermentação onde se realizou a análise estatística dos resultados. A Figura 26 apresenta o acompanhamento da atividade enzimática ao longo das 72 horas de fermentação.

Verifica-se pela Tabela 51 que em alguns ensaios ocorre perda da atividade enzimática após 48 horas de fermentação, e que estes ensaios são os que correspondem as menores concentrações dos substratos industriais água de maceração de milho e melação estudados neste planejamento. Observa-se que nos ensaios 5 e 6 foram obtidas atividades de inulinase correspondentes àquelas atingidas com o meio otimizado em frascos agitados (1200-1300 U/mL), porém com concentrações superiores de água de maceração de milho e melação. Isto se justifica devido à clarificação do meio que tornou viável a recuperação e purificação da enzima, porém eliminou não só as impurezas, como também elementos necessários para a produção da inulinase. No entanto, mesmo com concentrações maiores de melação e AMM o meio ainda é muito mais econômico se comparado ao sintético.

A Tabela 52 mostra a estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na atividade enzimática a partir do planejamento do tipo Plackett Burman realizado.

Tabela 51. Matriz do planejamento experimental do tipo Plackett Burman (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de inulinase (AI – U/mL) em 72h de fermentação

| Ensaio | AMM (g/l) | Melaço (g/L) | Ext. de Levedura (g/L) | Agitação (rpm) | Aeração (vvm) | Atividade (72h) |
|--------|-----------|--------------|------------------------|----------------|---------------|-----------------|
| 1 | 70 (1) | 150 (-1) | 8 (1) | 300 (-1) | 1,5 (-1) | 399 |
| 2 | 70 (1) | 210 (1) | 6 (-1) | 500 (1) | 1,5 (-1) | 1001 |
| 3 | 50 (-1) | 210 (1) | 8 (1) | 300 (-1) | 2,5 (1) | 830 |
| 4 | 70 (1) | 150 (-1) | 8 (1) | 500 (1) | 1,5 (-1) | 400 |
| 5 | 70 (1) | 210 (1) | 6 (-1) | 500 (1) | 2,5 (1) | 1110 |
| 6 | 70 (1) | 210 (1) | 8 (1) | 300 (-1) | 2,5 (1) | 1198 |
| 7 | 50 (-1) | 210 (1) | 8 (1) | 500 (1) | 1,5 (-1) | 998 |
| 8 | 50 (-1) | 150 (-1) | 8 (1) | 500 (1) | 2,5 (1) | 310 |
| 9 | 50 (-1) | 150 (-1) | 6 (-1) | 500 (1) | 2,5 (1) | 305 |
| 10 | 70 (1) | 150 (-1) | 6 (-1) | 300 (-1) | 2,5 (1) | 345 |
| 11 | 50 (-1) | 210 (1) | 6 (-1) | 300 (-1) | 1,5 (-1) | 997 |
| 12 | 50 (-1) | 150 (-1) | 6 (-1) | 300 (-1) | 1,5 (-1) | 300 |
| 13 | 60 (0) | 180 (0) | 7 (0) | 400 (0) | 2,0 (0) | 601 |
| 14 | 60 (0) | 180 (0) | 7 (0) | 400 (0) | 2,0 (0) | 640 |
| 15 | 60 (0) | 180 (0) | 7 (0) | 400 (0) | 2,0 (0) | 629 |

Tabela 52. Estimativa dos efeitos para a atividade da inulinase

| Variável | Efeito (U/mL) | Desvio padrão | t (2) | p |
|------------------|---------------|---------------|--------|----------|
| Média* | 671,13 | 5,20 | 128,93 | 6,01E-05 |
| AMM* | 118,89 | 11,63 | 10,21 | 0,009447 |
| Melaço* | 679,21 | 11,63 | 58,35 | 0,000294 |
| Ext. de levedura | 12,79 | 11,63 | 1,09 | 0,386374 |
| Agitação | 9,17 | 11,63 | 0,78 | 0,513117 |
| Aeração | 0,44 | 11,63 | 0,03 | 0,973177 |

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

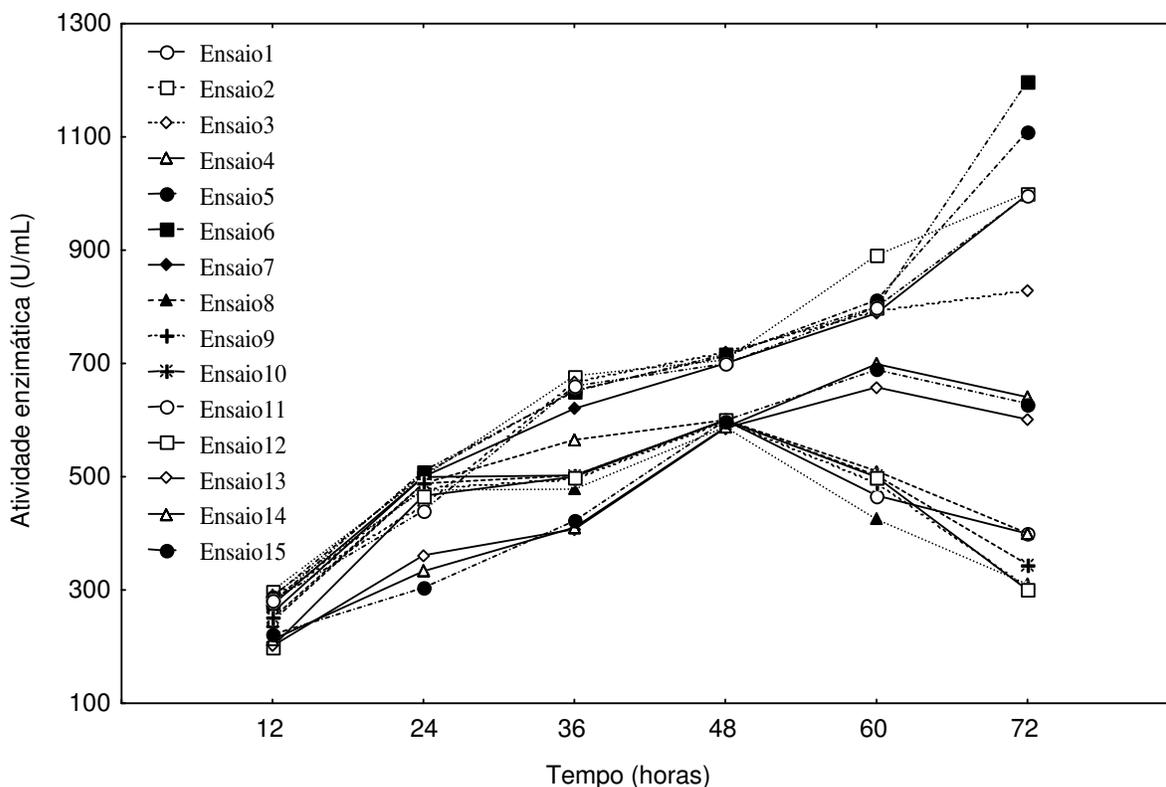


Figura 26. Acompanhamento da atividade enzimática durante as 72 horas de fermentação em reator de bancada

Pela análise da Tabela 52, verifica-se que as variáveis água de maceração de milho e melaço apresentam efeitos significativos positivos ($p < 0,05$), o que indica que um deslocamento dos níveis de concentração das mesmas para valores superiores acarretaria num incremento nos valores de atividade enzimática. Estes resultados sugerem a necessidade de realização de um

planejamento fatorial completo, sendo as variáveis de estudo a concentração de melaço e de água de maceração de milho, objetivando assim, a otimização da produção da inulinase em meio industrial pré-tratado. A concentração extrato de levedura, a agitação e a aeração não foram estatisticamente significativas dentro da faixa estudada. Assim, a concentração de extrato de levedura foi fixada em 6 g/L e a agitação e a aeração foram fixadas em 300 rpm e 1,5 vvm, respectivamente.

4.7.3 Planejamento experimental completo para otimização da produção de inulinase em fermentador de bancada

Nesta etapa foram estudadas as variáveis concentração de melaço e concentração de água de maceração de milho através de um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes) visando a otimização da produção da inulinase em fermentador de bancada nos mesmos níveis de atividade enzimática obtidos em frascos agitados. A matriz do planejamento experimental realizado, com os níveis codificados e reais, bem como as respostas de atividade enzimática obtidas encontram-se na Tabela 53.

A Figura 27 apresenta o acompanhamento da cinética da atividade enzimática de todos os ensaios do planejamento experimental completo de 12 em 12 horas. Observando os resultados obtidos neste planejamento, verifica-se que os ensaios que apresentaram uma maior atividade enzimática foram os ocorridos em 72h de fermentação, correspondendo aos pontos centrais do meio de cultura para a produção de inulinase.

A Tabela 54 apresenta a análise da variância (ANOVA) para a otimização da produção da inulinase dentro das faixas de concentração de melaço e água de maceração de milho estudadas.

Tabela 53. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da atividade de inulinase (AI) após 72h de fermentação

| Ensaio | Melaço (g/L) | AMM (g/L) | AI 72h (U/mL) |
|--------|--------------|-------------|---------------|
| 1 | 200 (-1) | 69 (-1) | 612 |
| 2 | 300 (1) | 69 (-1) | 830 |
| 3 | 200 (-1) | 101 (+1) | 512 |
| 4 | 300 (1) | 101 (+1) | 712 |
| 5 | 180 (-1,41) | 80 (0) | 480 |
| 6 | 320 (+1,41) | 80 (0) | 501 |
| 7 | 250 (0) | 50 (-1,41) | 989 |
| 8 | 250 (0) | 110 (+1,41) | 400 |
| 9 | 250 (0) | 80 (0) | 1380 |
| 10 | 250 (0) | 80 (0) | 1320 |
| 11 | 250 (0) | 80 (0) | 1250 |

Tabela 54. Análise de Variância para a atividade de inulinase

| Fontes de Variação | Soma de Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | F calculado |
|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 1.208.445 | 3 | 402.815 | 25,1 |
| Resíduos | 112.164 | 7 | 16.023 | |
| Falta de ajuste | 103.697 | 5 | | |
| Erro puro | 8.467 | 2 | | |
| Total | 1.320.609 | 10 | | |

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro

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

Coefficiente de correlação: $R = 0,93$

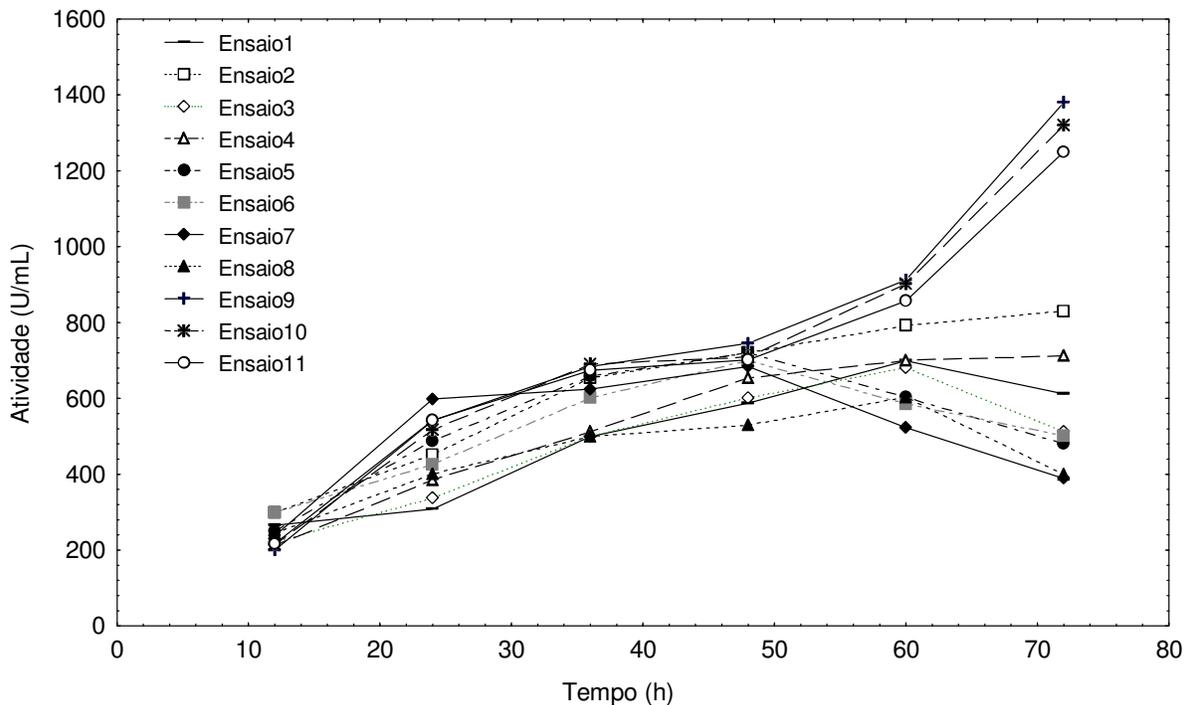


Figura 27. Cinética da atividade enzimática para a o planejamento experimental da otimização da produção da inulinase

A Equação 14 apresenta o modelo codificado otimizado para a produção da inulinase em meio industrial pré-tratado, o qual foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 54 . Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,93) e o F calculado (5,8 vezes maior que o valor tabelado) validaram o modelo que permitiu construir a superfície de resposta apresentada na Figura 28 que mostram a atividade enzimática da inulinase em meios industriais pré-tratados otimizada em fermentador de bancada.

$$\text{Atividade} = 1316 - 396.\text{melaço}^2 - 131.\text{AMM} - 293.\text{AMM}^2$$

(Equação 14)

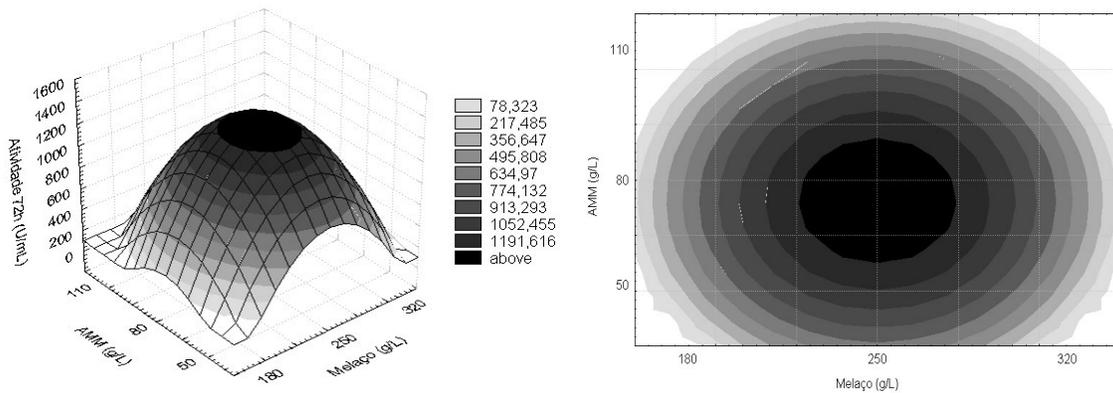


Figura 28. Atividade enzimática em função da concentração de melaço e de água de maceração de milho em fermentador de bancada

4.7.4 Cinética de fermentação do meio otimizado em reator de bancada

Após a otimização da inulinase em reator de bancada, foi realizado um estudo da cinética de fermentação. O acompanhamento cinético pode ser verificado na Tabela 55 e Figura 29. Observa-se que em reator de bancada é necessário uma concentração de açúcares redutores totais no início da fermentação superior, o que é explicado devido as diferenças existentes no processo como agitação, aeração, tipo de agitador, volume de meio, influenciando na transferência de massa do processo fermentativo. A atividade da inulinase nas primeiras horas de fermentação em reator de bancada também apresenta-se superior do que em frascos agitados, demonstrando que o açúcar presente no meio é convertido e consumido de maneira mais rápida.

Tabela 55. Cinética da produção da inulinase no meio otimizado em reator de bancada

| Tempo (h) | pH | Massa Seca (g/L) | ART (g/L) | Atividade enzimática (U/mL) |
|-----------|------|------------------|-----------|-----------------------------|
| 0 | 5,02 | 7,0 | 98,9 | 0 |
| 12 | 6,40 | 15,4 | 10,2 | 202 |
| 24 | 6,24 | 25,8 | 9,8 | 510 |
| 36 | 7,12 | 24,1 | 4,3 | 600 |
| 48 | 7,17 | 20,2 | 3,4 | 640 |
| 60 | 6,94 | 19,0 | 1,1 | 812 |
| 72 | 7,14 | 19,5 | 1,2 | 1348 |

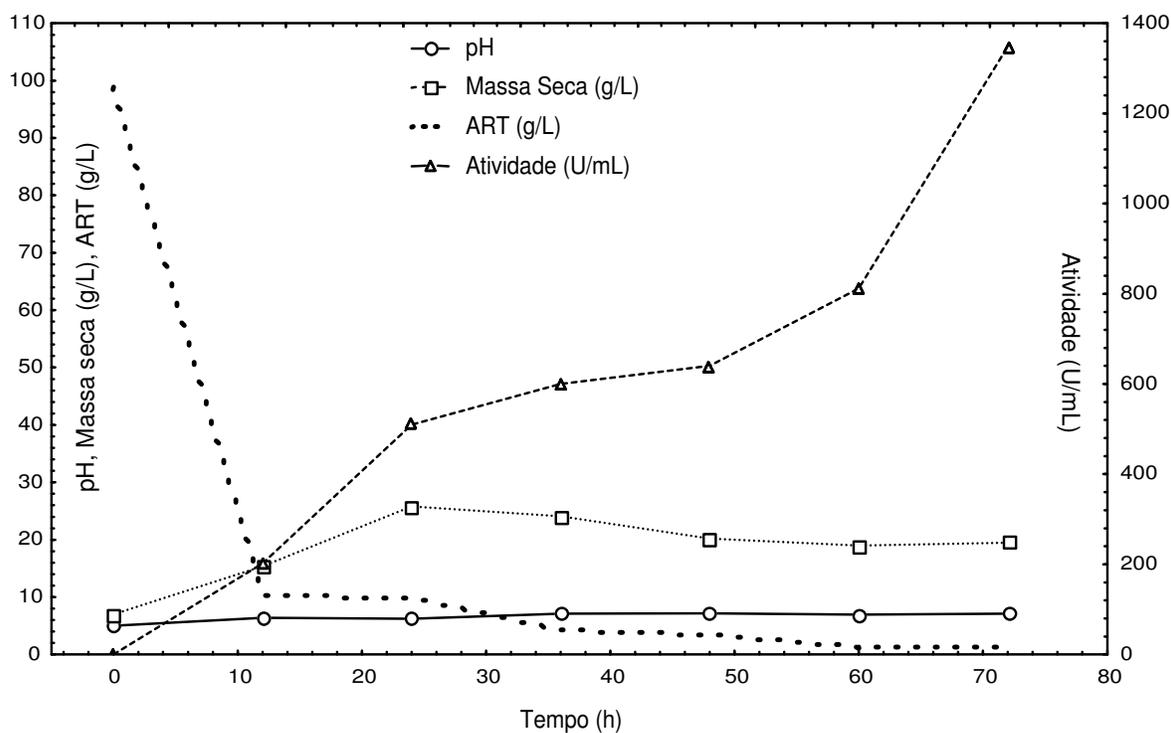


Figura 29. Cinética da Fermentação em reator de bancada

5. Conclusões

Neste trabalho propôs-se a otimização da produção da inulinase em meios industriais pré-tratados, de modo a serem realizados estudos desde a definição do pré-tratamento mais adequado para os meios industriais, otimização da produção da inulinase após definido o melhor pré-tratamento em frascos agitados, viabilidade de purificação da inulinase em leite expandido diretamente do caldo bruto fermentado, caracterização da enzima obtida e aumento de escala para fermentador de bancada. Neste contexto as conclusões obtidas foram:

1. O pré-tratamento mais adequado para os meios industriais melaço e água de maceração de milho foi com 8% de carvão ativo ANF – Carvorite, 1 hora de agitação em frascos agitados à 70 °C, com os substratos já nas concentrações que estarão no meio de fermentação.
2. Na otimização da produção da inulinase em meio industrial pré-tratado em frascos agitados, após a realização de três planejamentos fatoriais completos seqüenciais, verificou-se que a máxima atividade obtida foi de 1300 U/mL, nas concentrações de 150 g/L de melaço, 50 g/L de água de maceração de milho e 6 g/L de extrato de levedura.
3. Em ensaios preliminares em coluna de leite expandido para purificação da inulinase diretamente do caldo fermentado bruto utilizando-se meios industriais pré-tratados verificou-se a viabilidade, porém com baixos fatores de purificação, necessitando ainda de um estudo de processo mais detalhado.
4. Na caracterização parcial da enzima livre purificada concluiu-se que em relação a temperatura e pH ótimos os valores são 4,5 e 55 °C, respectivamente. A temperatura de maior estabilidade da inulinase obtida é 50 °C e o pH de estabilidade está na faixa de 4,4 - 4,8. Em relação aos parâmetros cinéticos calculados, determinou-se $K_m = 0,0129 \text{ M}$ e $V_{m\acute{a}x}$ de 10,72 Mol/min.L.

5. Na otimização da produção da inulinase em fermentador de bancada através de Planejamento Experimental do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) seguido por Planejamento Experimental Fatorial Completo verificou-se na condição otimizada dentro da faixa estudada uma atividade enzimática equivalente a obtida em frascos agitados (1300 U/mL), nas concentrações de 250 g/L de melaço, 80 g/L de água de maceração de milho, 6 g/L de extrato de levedura, 300 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração.

6. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Realizar a otimização do meio de fermentação pré-tratado em agitador orbital e fermentador de bancada, substituindo o extrato de levedura por um hidrolisado de levedura (por exemplo, Prodexlac[®] - Prodesa – Mogi Mirim/SP), com o intuito de redução de custo.
- Caracterizar os compostos que formam os precipitados no meio industrial durante a fermentação, que foram retirados com o processo de pré-tratamento utilizando carvão ativo.
- Otimizar a purificação da enzima em leite expandido, diretamente do caldo bruto fermentado.

7. Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16. Ed. Washington, 1995.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.72, n.6, p.491-494, 1991.

CABRAL, F. A. Estudo Cinético da Invertase Livre e Imobilizada em Alginato de Cálcio. **Dissertação de Mestrado**, FEA, UNICAMP, 1989.

CARR'ERE, H; BLASZHOW, F. Comparison of operating modes for clarifying lactic acid fermentation broths by batch cross-flow microfiltration. **Process Biochemistry**, 36 (2001) 751-756, 2000.

CHIEN, C; LEE, W.; LIN, T. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p. 252-257, 2001.

CONTIERO, J. Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*. **Tese de Doutorado** – FEA, UNICAMP, 1992.

CRUZ-GUERRERO, A.; GARCIA-PEÑA, I.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A Wild Inulinase Hyperproducing Strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n. 2, p. 159-163, 1995.

- ELYACHIOUI, M.; HORNEZ, J.P.; TAILLIEZ, R. General properties of Extracellular Bacterial Inulinase. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, n. 6, p. 514-519, 1992.
- 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.
- FLAMM, G.; GLINSMANN, W.; KRITCHEVSKY, D.; PROSKY, L.; ROBERFROID, M. Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A review of the evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 5, p. 353–362, 2001.
- FREJ, A. K. B.; HJORTH, R.; HAMMARSTRÖM, A. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, n. 8, p. 922-929, 1994
- GIBSON, G. R. ; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteridon the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, n.4, p.412-420, 1994.
- GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P. Efect 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.N.; DAVINDER, P.S.; KAUR, N. e SINGH, R. Production, Purification and Immobilization of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.59, p.377-385, 1994.
- 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
- JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A. Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p.5-11, 2003.
- KABKE, K. C. P. Otimização da produção da inulinase em meio industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus*. **Dissertação de Mestrado – FEA, UNICAMP, 2002.**
- KALIL, S.J. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. Campinas, 2001. 141p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.**
- KALIL, S.J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; Optimization of Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. **Applied Biochemical Biotechnology**, p.257-264, 2001.
- KASSEN, L. & KOKUGAN, T. The effect of Molasses Pretreatment by Ceramic Micro filtration Membrane on Ethanol Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol. 83, No. 6, 577-582, 1997.

- KIM,C.H.; RHEE,S.K. Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin, **Biotechnology Letters**, v.11,p.201-206, 1989.
- 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, S. J.; SHODA, M. Batch Decolorization of Molasses by Suspended and Immobilized Fungus of *Geotrichum candidum* Dec1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol.88, No. 5, 586-589, 1999.
- KUSHI, R.T.; HOJO, O.; TREVISAN, H.C.; MONTI, R.; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, São Carlos. **Anais XI SINAIFERM**, 1996, p. 309.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAKINO, Y. TREICHEL, H.; SCANAVINI, H. F. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Otimização de meio industrial para produção de inulinase por *Kluyveromyces*. **Anais do 14º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 25-28 de outubro, Natal – RN, 2002.

- MAKINO, Y. Produção e Purificação em leite expandido de inulinase obtida a partir das espécies de *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos. **Tese em andamento (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from four Yeast. **Lenbensm. – Wiss. U-Technology**, v.21, p. 271-274, 1988.
- MAUGERI, F. Apostila de Engenharia Bioquímica. FEA – UNICAMP, 2002.
- MEDEIROS, J.; KALIL, S.; COSTA, F.; NAKASHIMA, E. B.; CABRAL, A. S.; ZAVICKIS, F. P.; SILVA, J. A.; SISMOTTO, M.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Estudo da Influência da concentração de Substrato, pH e Temperatura na determinação da Atividade enzimática da Inulinase. **Anais do II Congresso de Engenharia de Processos do Mercosul**, Florianópolis – SC, 1999.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Ana. Chem**,v.31, p.426-428, 1959.
- MUNGUÍA, A . & RAMÍREZ, R. Aplicaciones en alimentos y medicina. **Tecnología Enzimática**. México: Dirección General de Publicaciones, 1987.
- NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S.; MATSUO, T.; SUIKO, M.; OHTA, K. Production, Purification and Properties of an Endoinulinase of *Penicillum* sp. TN-88 that liberates Inulotriose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 4, p. 313-318, 1997.

- ÖNGEN-BAYSEL, G.; SUKAN, S. S.; VASSILEV, N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 275-280, 1994.
- PESSOA A.; VITOLO, M.; HUSTEDT, H. Use of K_La as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. **Applied Biochemistry and Biothechnology**, v. 57(8), p. 669-709, 1996.
- PESSOA, A.; VITOLO, M.; Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 3, 1999.
- POORNA, V. & KULKARNI, P.R. A study of Inulinase Production in *Aspergillus niger* using Fractional Factorial Design. **Bioresource Technology**, v. 54, p.315-320, 1995.
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**. Vol.33, No. 8, pp.805-810, 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.
- RYAN, D.; JOHNSON, R. Dialyses and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement. **Separation and Purification Technology**. 22-23, 239-245, 2001.
- SANTISTEBAN-SILVA, B. O. Y. Efeito da agitação e da aeração na Produção de inulinase em Processo de Batelada simples por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. **Tese de Mestrado**, FEA, UNICAMP, 2001.

SANTOS, A.M.P. Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas, 1998. 91p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS, A. M. P.; SMIGIC, N.; MAUGERI, F. Production and Purification of inulinase by *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, ESBES4, Delft, Netherlands, p. 28-30, august, 2002.

SANTOS, A.M.P. Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. Campinas, 2002. 161p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHNEIDER, A.L.S. Estudo da Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Florianópolis, 1998. 102p. **Tese (Mestrado em Engenharia Química)** - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; PHOTHILANGKA, P.; OHMOMO, S. Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v.92, p. 31-39, 2004.

SNOW, U. Adsorbents reduce s primary unit operations for bioprocess recovery. **Genetic Engineering News**, v. 14, n. 3, p. 320-329, 1994.

TREICHEL, H. Estudo de meios industriais para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045. **Tese de Mestrado**, FEA, UNICAMP, 2001.

- VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. Fermentation Process, Properties and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p. 139-176, 1983.
- VRANESIC, D.; KURTANJEK, Z; SANTOS, A. M. P.; MAUGERI, F. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. **Food Technology Biotechnology**, v. 40, n. 1, p.67-73, 2002.
- WALFORD, S. N. Applications of ion chromatography in canesugar research and process problems. **Journal of Chromatography A**, 956 (2002) 187-199, 2002.
- XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Purification and Characteristics of two Exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n.5, p. 331-334, 1989.