

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

Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de
Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus.

Andrelina Maria Pinheiro Santos
Mestre em Engenharia de Alimentos - Unicamp.
Eng. Química, UFS

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Andrelina Maria Pinheiro Santos** aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de dezembro de 2002.

Campinas, 16 de dezembro de 2002.


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

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

Campinas, 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200306405

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP SA59s
V	EX
TOMBO BC/	52382
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	RS 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179769-5

BIB 10 279 802

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

Sa59s Santos, Andreлина Maria Pinheiro
Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* / Andreлина Maria Pinheiro Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

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

1. *Kluyveromyces marxianus*. 2. Oligossacarídeos. 3. Síntese.
4. Purificação. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

Banca Examinadora



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



Prof.ª Dra. Maria Isabel Rodrigues
Membro Titular- DEA/FEA/UNICAMP



Dra. Fátima Ap. de Almeida Costa
Membro Titular- DEA/FEA/UNICAMP



Prof.ª Dra. Telma Teixeira Franco
Membro Titular- FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Membro Titular- DEQ/UFU

Prof.ª Dra. Gláucia Pastore
Membro Suplente- DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
Membro Suplente-CPQBA/UNICAMP

“Que Deus me conceda serenidade para aceitar as coisas que não podem ser mudadas, coragem para mudar aquelas que posso modificar, e sabedoria para perceber a diferença entre elas”

(São Francisco de Assis)

*Aos meus pais (André e Socorro)
obrigada por ensinar a nunca desistir.*

Agradecimentos

Escrever a tese foi até fácil comparada com este momento...mas é um momento muito especial quando começo a lembrar das pessoas que estiveram e estão comigo durante todo este tempo.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Prof. Francisco pela orientação, confiança e constante aprendizado.

À Profa. Maria Isabel, Dra. Fátima Costa, Prof. Eloízio, Profa. Telma Franco, Prof. Silvio Andrietta e Profa. Gláucia Pastore pelas valiosas correções.

À Fapesp pelo auxílio financeiro.

Aos meus irmãos e grandes amigos (Edval, Socorro, Beth, Djanira, André e Anderson). por estarem sempre por perto em todos os momentos. Adoro vocês! Saudades!!!!

Cristiana Yoshida (Kity), como está sendo maravilhoso continuar compartilhando com você as transformações e a realização de mais um projeto de vida.

À Fifa e Eliana Setsuko, grandes amigas. Não existe espaço para pensar em desânimo quando podemos contar com vocês. Um carinho especial!!

Rose, que bom que você está por perto. É muito bom tê-la como amiga.

Hélder, quantas saudades!!!!!!

Flávio Vasconcelos, um carinho especial.

Márcio Geraldo, obrigada pela amizade. Trabalhar contigo foi um excelente aprendizado. Sempre será um amigo muito especial!!

Aos meus primos, Toninho e Célia (Cintia, Aroldo e Aldo)

Ao Luciano (best friend), Helen, Keli, Yemiko, Fernanda, Saartje, Clarissa, Daniel, Mirian Futakawa, Janaina, André, Bernardo, Carlos. Foi simplesmente maravilhoso compartilhar com vocês cada momento deste trabalho!!!

À família Costa, sempre presente, Obrigada! Vocês são especiais.

Ana e Ezequias, grandes amigos, saudades...

Beto e Sérgio Ricardo, de maravilhosos hóspedes a amigos fantásticos.

Nada Smigic (Jugoslávia) e Darija Vranesic (Croácia), cada dia compartilhado com vocês foi uma grande experiência. Este projeto também é de vocês, Obrigada!

Caco, um amigo muito especial!

Aos meus amigos que mesmo distante sempre estão por perto: Alvaro, Gabriel, Daniella, Vera, Simone, Zé Guilherme, Eliana Janet, Eduardo (Dú), Sílvia. É muito bom poder contar com amizade de vocês!!!

D. Mary (D. Maria) e Sr. Aparecido, muito obrigada!

Não posso terminar este agradecimento sem falar de duas pessoas que mesmo sem ter tido um contato tão diário, ou quase nenhum, mas a participação deles está além da compreensão... Maria Lúcia Pedroso Yoshida, obrigada pelo carinho e por demonstrar (através dos seus livros) que não adianta 'criar' obstáculos, mas enfrentá-los! E Frei José Carlos, sempre será especial e acima de tudo por ensinar que não devemos encerrar projetos sem começar novos. Vocês sempre estarão no meu coração!

E agora aos novos projetos.....

*Muito obrigada à todos,
Com carinho
Lia Pinheiro*

Índice

Índice de tabelas	xix
Índice de figuras	xv
Resumo	xx
Summary	xxi
1. Introdução	01
2. Revisão da literatura	05
2.1 Inulinases	05
2.1.1. Microrganismos produtores de inulinases	06
2.1.3. Caracterização das inulinases	08
2.1.3.1. Estabilidade com a temperatura e pH	08
2.1.3.2. Cinética enzimática	10
2.1.3.3. Efeito da temperatura na estabilidade e atividade da enzima	13
2.1.3.4. Efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima	15
2.2. Enzimas imobilizadas	16
2.2.1. Alginato de cálcio	17
2.2.2. Cinética das enzimas imobilizadas	18
2.3. Purificação de enzimas	19
2.3.1. Purificação de enzimas por cromatografia líquida	20
2.3.2. Classificação dos métodos cromatográficos	21
2.3.2.1. Cromatografia de troca iônica	21
2.3.2.2. Cromatografia de permeação em gel	23
2.4. Análise de carboidratos por cromatografia líquida	24
2.4.1. Cromatografia de íons – (HPLC- PAD)	25
2.5. Oligossacarídeos	27
2.5.1. Propriedades dos oligossacarídeos	28
2.5.2. Produção de oligossacarídeos	29
2.5.3. Classificação dos oligossacarídeos	29
2.6. Frutooligossacarídeos	30
2.6.1 Produção de frutooligossacarídeos	31
2.6.2. Aplicação industrial dos frutooligossacarídeos	32
2.6.3 Mecanismos da enzima	35

3. Material e Métodos	37
3.1. Produção da inulinase	37
3.1.1. Microrganismo	37
3.1.2. Manutenção do microrganismo	37
3.1.3. Preparo do meio do inóculo	37
3.1.4. Fermentação	37
3.2 Caracterização da enzima	37
3.3. Purificação da enzima	37
3.3.1. Recuperação com etanol	37
3.3.2. Estudo da capacidade de adsorção/dessorção da enzima pela resina	37
3.3.3. Estudo da influência do pH (5,5-7,5) na purificação da enzima	39
3.4. Caracterização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> livre e imobilizada em alginato de cálcio	39
3.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida da inulinase	39
3.4.2. Imobilização da inulinase em alginato de cálcio	40
3.4.3. Influência da concentração de CaCl ₂ na imobilização da inulinase	41
3.4.4. Estabilidade com o tempo	41
3.4.5. Efeito do pH na atividade da inulinase	41
3.4.6 Estabilidade com o pH	41
3.4.7. Efeito da temperatura na atividade da inulinase	41
3.4.8. Estabilidade com a temperatura	41
3.4.9. Microscopia eletrônica de varredura	42
3.5. Estudo cinético para inulinase nas formas livre e imobilizada	42
3.5.1. Influência da concentração inicial de sacarose na inulinase livre e imobilizada	42
3.5.2. Influência das concentrações de glicose e frutose na velocidade inicial da inulinase livre e purificada	42
3.6. Síntese de oligossacarídeos	43
3.6.1. Produção de oligossacarídeos	43
3.6.1.1. Planejamento experimental	43
3.6.2. Estudo da influência de aceptores (maltose, lactose, glicose e frutose) na síntese de oligossacarídeos	45
3.7. Síntese de oligossacarídeos com inulinase imobilizada	45
3.8. Metodologia Analítica	46
3.8.1. Atividade enzimática	46

3.8.2. Determinação de proteínas	47
3.8.3. Purificação por cromatografia de troca iônica – FPLC	47
3.8.4. Identificação e quantificação de carboidratos por cromatografia de íons – HPLC-PAD	48
4. Resultados e Discussão	51
4.1. Produção da enzima	51
4.2. Purificação da enzima por FPLC	56
4.2.1. Testes preliminares para purificação da enzima a diferentes valores de pH	56
4.2.2. Purificação da enzima em diferentes valores de pH (5,5-7,5)	58
4.3. Estudo comparativo da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> com as enzimas invertase e inulinase comerciais	64
4.4. Caracterização da inulinase nas formas livre e imobilizada	67
4.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	67
4.4.2. Estabilidade com o tempo	69
4.4.3. Microscopia eletrônica da esfera de alginato de cálcio	70
4.4.4. Estudo da otimização da inulinase imobilizada em alginato de cálcio	72
4.4.5. Influência do pH na atividade enzimática (pH Ótimo)	73
4.4.6. Influência do pH na estabilidade da enzima	77
4.4.7. Influência da temperatura na atividade enzimática	78
4.4.7.1. Modelagem da velocidade de reação em função da temperatura e tempo de reação	82
4.4.7.2. Estimativa da meia vida da enzima em função da temperatura	103
4.4.7.3. Temperatura de processo	105
4.5. Estudo Cinético	107
4.5.1. Modelo cinético para inulinase livre e imobilizada	121
4.6. Estudo da influência da glicose e sacarose na velocidade inicial da inulinase	124
4.6.1. Estudo cinético da inibição da glicose e frutose na velocidade inicial da inulinase	125
4.7. Síntese de frutooligossacarídeos a partir da inulinase	130
4.7.1. Produção de frutooligossacarídeos utilizando a técnica de planejamento experimental	131
4.7.2. Influência de aceptores (maltose, lactose, glicose e frutose) na produção de frutooligossacarídeos	134
4.7.3. Síntese de frutooligossacarídeos utilizando glicose ou frutose comoceptor	134
4.8. Síntese de frutooligossacarídeos com inulinase imobilizada	139

4.8.1. Síntese de frutooligossacarídeos com a inulinase imobilizada em reator de mistura	139
4.8.2. Síntese de frutooligossacarídeos com a inulinase imobilizada em reator tubular	141
5. Conclusão	145
6. Referências Bibliográficas	148
Anexo	159

Índice de tabelas

Tabela 01. Aplicação das Enzimas industriais e valor do Mercado Mundial : 1997-2002.	01
Tabela 02. Vantagens e limitações da cromatografia líquida de alta eficiência	24
Tabela 03. Valores de pK para carboidratos	27
Tabela 04. Composição do meio de cultivo para produção da Inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> .	37
Tabela 05. Tabela de níveis	44
Tabela 06. Matriz de planejamento fracionário.	45
Tabela 07. Condições da célula de detecção amperométrica (PAD).	50
Tabela 08. Composição do meio de cultivo para produção da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> .	51
Tabela 09. Resultados da atividade da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> em diferentes meios de fermentação.	53
Tabela 10. Valores reais e codificados usados no Planejamento Fatorial.	54
Tabela 11. Planejamento Experimental e Atividade enzimática após 72 horas de fermentação.	54
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para atividade inulinase.	55
Tabela 13. Resultados da purificação da inulinase em diferentes valores de pH apresentando atividade total (U), proteína total (mg), atividade específica (U/mg), fator de purificação, rendimento e S/I (caracterização da enzima).	63
Tabela 14. Estabilidade com o tempo da inulinase purificada de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> .	70
Tabela 15. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em diferentes concentrações de cloreto de cálcio.	72
Tabela 16. Atividade enzimática da inulinase purificada livre em função do pH, para enzima livre diluída em tampão acetato de sódio 0,1M.	74
Tabela 17. Atividade enzimática da inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio em função do pH. Atividade inicial: 0,8554 UI/mL.	75
Tabela 18. Atividade enzimática em função da temperatura, para inulinase livre purificada e atividade inicial : 11,44 UI/mL.	79

Tabela 19. Atividade enzimática em função da temperatura, para inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio.	81
Tabela 20. Atividade enzimática da inulinase livre, em função da temperatura.	84
Tabela 21. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 5,0 e T=50°C.	86
Tabela 22. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre diluída, a pH 5,0 e T=52,5°C.	87
Tabela 23. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, 0,1M a pH 5,0 e T=55°C.	88
Tabela 24. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 5,0 e T=57,5°C.	89
Tabela 25. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 5,0 e T=60°C.	90
Tabela 26. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 5,0 e T=65°C.	91
Tabela 27. Valores de K_d em função da temperatura para enzima livre.	92
Tabela 28. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, em função da temperatura. Atividade inicial: $v_0 = 1,2821$ UI/mL.	93
Tabela 29. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 40°C. Atividade inicial : $v_0 = 2,11$ UI/mL.	95
Tabela 30. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 42,5°C. Atividade inicial: $v_0 = 2,46$ UI/mL.	96
Tabela 31. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 45°C. Atividade inicial : $v_0 = 2,00$ UI/mL	97
Tabela 32. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 47,5°C. Atividade inicial: $v_0 = 1,69$ UI/mL.	98
Tabela 33. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 50°C. Atividade inicial : $v_0 = 2,00$ UI/mL.	99
Tabela 34. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 52,5°C. Atividade inicial : $v_0 = 2,3$ UI/mL	100
Tabela 35. Valores de K_d em função temperatura para enzima imobilizada.	101
Tabela 36. Valores dos parâmetros do modelo antes e após o ajuste por regressão não linear.	103

Tabela 37. Valores de meia-vida para inulinase livre.	104
Tabela 38. Valores de meia-vida para inulinase imobilizada.	104
Tabela 39. Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração de sacarose (S).	109
Tabela 40. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo de Michaelis-Menten para taxas iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_m$.	111
Tabela 41. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo cinético para velocidades iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_i$.	112
Tabela 42. Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração de sacarose (S).	114
Tabela 43. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo cinético para velocidades iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_i$.	115
Tabela 44. Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração de sacarose (S).	117
Tabela 45. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo de Michaelis-Menten para taxas iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_m$.	118
Tabela 46. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo cinético para taxas iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_i$.	119
Tabela 47. Parâmetros cinéticos para inulinase imobilizada em alginato de cálcio.	121
Tabela 48. Resultados do planejamento em porcentagem de frutooligossacarídeos produzidos.	132
Tabela 49. Efeitos estimados para síntese de frutooligossacarídeos no planejamento experimental fracionário.	132
Tabela 50. Resultados do planejamento em termos de produtividade de frutooligossacarídeos.	134
Tabela 51. Valores dos Oligossacarídeos em diferentes condições de síntese.	139
Tabela 52. Produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando inulinase imobilizada em alginato de cálcio em reator de mistura.	140
Tabela 53. Produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando inulinase imobilizada em alginato de cálcio, reator tubular.	142
Tabela 54. Produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando inulinase imobilizada em alginato de cálcio, reator de mistura.	142

Índice de figuras

Figura 01. Cinética enzimática de: a) formação de produto (dP/dt) e b) consumo de substrato ($-dS/dt$).	11
Figura 02. Esquema do mecanismo de troca iônica.	22
Figura 03. Microflora intestinal antes e após o consumo de oligossacarídeos.	28
Figura 04. Frutooligossacarídeos: Kestose (GF_2), nistose (GF_3) e 1- β -fructosilnistose (GF_4).	33
Figura 05. Esquema do processo de imobilização de inulinase em alginato de cálcio.	40
Figura 06. Esquema da síntese de oligossacarídeos com inulinase imobilizada em alginato de cálcio.	46
Figura 07. Síntese de frutooligossacarídeos com inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> obtida por fermentação em meio de 30 g/L de sacarose.	52
Figura 08. Síntese de frutooligossacarídeos com inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> obtida por fermentação em meio de 14 g/L de sacarose.	52
Figura 09. Evolução atividade enzimática produção enzimática por <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> em diferentes meio de fermentação.	53
Figura 10. Superfície de Resposta para a atividade enzimática em função da temperatura e pH.	55
Figura 11. Produção da Inulinase por fermentação a diferentes valores de temperatura e pH 3,4.	56
Figura 12. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca catiônica SP-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão acetato de sódio 0,02M a pH 4,0.	57
Figura 13. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca catiônica SP-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e Gradiente salino com NaCl 1M em tampão acetato de sódio 0,02M a pH4,5.	57
Figura 14. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 6,5.	58

Figura 15. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorvância (280nm), atividade em sacarose e em inulina e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 5,5.	59
Figura 16. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorvância (280nm), atividade em sacarose e em inulina e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH6,0.	60
Figura 17. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorvância (280nm), atividade em sacarose e em inulina e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 6,5.	61
Figura 18. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorvância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH7,0.	62
Figura 19. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorvância (280nm), atividade em gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH7,5.	62
Figura 20. Perfil cromatográfico da invertase e inulinase comercial em coluna de permeação em gel.	65
Figura 21. Perfil cromatográfico da invertase e inulinase comercial e da inulinase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> em coluna de permeação em gel .	65
Figura 22. Perfil cromatográfico da inulinase purificada de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , a pH 6,0 em coluna de permeação em gel.	66
Figura 23. Espectro do gel de eletroforese SDS dos padrões de baixo peso molecular (LMW kit Calibration Pharmacia).	68
Figura 24. Espectro do gel de eletroforese SDS em gel poliacrilamida da inulinase bruta de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .	68
Figura 25. Espectro do gel de eletroforese SDS em gel de poliacrilamida da inulinase purificada de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .	69
Figura 26. Microscopia eletrônica da esfera de alginato de cálcio sem enzima.	70
Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura da esfera fraturada de alginato de cálcio (a) sem enzima e (b) com enzima encapsulada.	71
Figura 28. Perfil da atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em diferentes concentrações de cloreto de cálcio.	72
Figura 29. Atividade enzimática da inulinase livre em função do pH, em tampão acetato de sódio 0,1M.	74

Figura 30. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em função do pH, em tampão acetato de sódio 0,1M.	76
Figura 31. Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase livre de <i>Kluyveromyces marxianus var. marxianus</i> .	77
Figura 32. Atividade enzimática em função do tempo e pH da inulinase imobilizada em alginato de cálcio.	78
Figura 33. Efeito da temperatura na atividade da inulinase livre purificada de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> .	80
Figura 34. Efeito da temperatura na atividade da inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio.	81
Figura 35. Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase purificada e livre de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> , para o cálculo da energia de ativação.	85
Figura 36. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 50°C.	87
Figura 37. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 52,5°C.	88
Figura 38. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 55°C.	89
Figura 39. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 57,5°C.	90
Figura 40. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 60°C.	91
Figura 41. Determinação da energia de ativação da reação de desnaturação da enzima (E_d).	92
Figura 42. Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase imobilizada, para o cálculo da energia de ativação.	93
Figura 43. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (K_d) a 40°C.	95
Figura 44. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (K_d) a 42,5°C.	96
Figura 45. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (K_d) a 45°C.	97
Figura 46. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (K_d) a 47,5°C.	98

Figura 47. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (K_d) a 50°C.	99
Figura 48. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (K_d) a 52,5°C.	100
Figura 49. Determinação da energia de ativação da reação de desnaturação da enzima (E_d), para a enzima imobilizada.	101
Figura 50. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo para atividades da enzima livre.	102
Figura 51. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo para atividades da enzima imobilizada.	102
Figura 52. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo matemático para valores de meia-vida para enzima livre.	104
Figura 53. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo matemático para valores de meia-vida para enzima livre.	105
Figura 54. Perfil da temperatura em função da meia-vida e atividade enzimática da enzima livre para determinação da $T_{processo}$	106
Figura 55. Perfil da temperatura em função da meia-vida e atividade enzimática da enzima imobilizada para determinação da $T_{processo}$	106
Figura 56. Velocidade de reação da inulinase livre a $T=50^{\circ}C$, em função da concentração de substrato.	110
Figura 57. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para inulinase purificada de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> , a $T=50^{\circ}C$, $S \gg K_i$.	111
Figura 58. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para inulinase purificada de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> , a $T=50^{\circ}C$, $S \gg K_m$.	112
Figura 59. Cinética enzimática da inulinase purificada livre, a $T=50^{\circ}C$, $S \gg K_m$, para determinação de K_i .	115
Figura 60. Velocidade de reação da inulinase imobilizada em alginato de cálcio a $T=50^{\circ}C$, em função da concentração de substrato.	118
Figura 61. Velocidade de reação da inulinase imobilizada em alginato de cálcio a $T=50^{\circ}C$, em função da concentração de substrato.	119
Figura 62. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para inulinase purificada de <i>Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus</i> , a $T=50^{\circ}C$, $S \gg K_m$.	120
Figura 63. Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S)$ para a enzima livre, a 50°C.	122

Figura 64. Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S)$ para a enzima imobilizada em alginato de cálcio a 50°C.	123
Figura 65. Velocidades iniciais de reação para sacarose (5, 10 e 20 g/L) e (a) frutose (5, 10 e 20 g/L) e (b) glicose (5, 10 e 20 g/L).	124
Figura 66. Gráfico aplicado para as taxas iniciais de reação para a inulinase na presença de (a) frutose e (b) glicose em baixas concentrações de sacarose.	126
Figura 67. Gráfico aplicado para as taxas iniciais de reação para a inulinase na presença de (a) frutose e (b) glicose em baixas concentrações de sacarose.	127
Figura 68. Velocidades iniciais de reação para sacarose (150, 300 e 500g/L) e (a) frutose (25, 50 e 75 g/L) e (b) glicose (25, 50 e 75 g/L).	129
Figura 69. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 50 g/L de frutose.	135
Figura 70. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 50 g/L de glicose.	135
Figura 71. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 150 g/L de frutose.	136
Figura 72. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 150 g/L de glicose.	136
Figura 73. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 200 g/L de frutose.	137
Figura 74. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 200 g/L de glicose.	137
Figura 75. Produção de frutooligossacarídeos a partir de uma de solução com 50% sacarose. A síntese foi realizada a pH 5,0 a 50°C.	141
Figura 76. Perfil da produção de frutooligossacarídeos utilizando enzima livre, enzima imobilizada em alginato de cálcio em reator de mistura e tubular.	144

Resumo

Oligossacarídeos são considerados como novos ingredientes funcionais dos alimentos, sendo denominados como prebióticos, devido as suas características fisiológicas e tecnológicas. Podem ser produzidos a partir da sacarose, matéria prima abundante no Brasil, pela ação de enzimas. A inulinase tem como principal característica a atividade hidrolítica frente à inulina, mostrando em certas condições, atividade de transfrutossilacção, como demonstrado em trabalhos recentes realizados com a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, caracterizada pela formação de frutooligossacarídeos (kestose, nistose e 1-frutossilnistose). Baseando-se nestes estudos, este trabalho teve como objetivo principal estudar a atividade de transfrutossilacção desta enzima.

Inicialmente produziu-se da enzima por fermentação em frascos agitados, obtendo uma máxima atividade de 301 UI/mL no pH 3,4 e temperatura 23°C. Em seguida, estudou-se a otimização do processo de purificação utilizando resinas trocadoras de íons, sendo a resina aniônica Q-Sepharose FF a que apresentou melhores resultados, tanto em relação ao fator de purificação (23 vezes em relação ao caldo bruto), quanto ao de recuperação (70%).

A partir da enzima purificada determinou-se o pH 4,4 como sendo o ótimo de reação para a enzima na forma livre e 4,8 para a enzima imobilizada em alginato de cálcio. Quanto ao pH de estabilidade obteve-se para a enzima livre o melhor resultado a pH 4,8, correspondendo à uma meia vida de aproximadamente 10 dias, a 50°C, enquanto que para a enzima imobilizada o melhor pH foi 4,6, com uma meia vida de aproximadamente 6 dias, a 45°C. A temperatura ótima de reação foi de 60°C e 57,5°C para a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

No estudo cinético, observou-se que a equação de Michaelis-Menten com termo de inibição pelo substrato ajustou-se bem aos dados experimentais e obtendo-se os seguintes valores para as constantes cinéticas: $K_m = 0,0389$ e $0,1070$ M, $V_{max} = 86,96 \cdot 10^{-9}$ e $36,90 \cdot 10^{-9}$ mol/min.L, $K_i = 0,5857$ e $1,3548$ M, para as enzimas livre e imobilizada respectivamente. Estudando os efeitos inibitórios da concentração de glicose e frutose, verificou-se que, em baixas concentrações de sacarose (5 a 20 g/L), o aumento da concentração de frutose e glicose diminui a atividade da enzima, denotando inibição pelos produtos. Por outro lado, em altas concentrações de sacarose (150 a 500 g/L), onde se verifica uma forte inibição pelo substrato, houve um aumento na atividade enzimática na presença de glicose e frutose a 75 g/L.

Para o estudo da síntese de frutooligossacarídeos utilizou-se a técnica de planejamento experimental, obtendo-se a melhor condição a pH 6,0, temperatura de 50°C, 450 g/L de sacarose e 4 UI/mL de atividade enzimática final no reator, obtendo-se uma conversão de 12,65 %. A máxima produção de oligossacarídeos foi de 82 g/L, obtida com a adição de 200 g/L de glicose como acceptor e 500 g/L de sacarose. Também foi feito um estudo comparativo de síntese, com a enzima imobilizada em reator de leito fixo e de mistura e na forma livre. Em todos os casos foram obtidos 50 g/L de frutooligossacarídeos.

Summary

Oligosaccharides have great potential as new functional ingredients for foods. They have been denominated as prebiotic, due to their physiological and technological characteristics. They can be produced from sucrose, an abundant raw material in Brazil, by the enzyme inulinase. This enzyme has as its main characteristic the hydrolytic activity of inulin. However, it also shows, in certain conditions, an activity of transfructosilation, as demonstrated in recent studies carried out with inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, characterized by the formation of fructooligosaccharides (kestose, nystose and 1-frutosil nystose). Based in these studies, this work has as main goal to study the activity of transfructosilation of this enzyme.

Initially, the optimization of the production of the enzyme by fermentation with *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 was carried out, led to a maximum activity of 301 UI/mL at pH 3.4 and 20°C. Subsequently, the optimization of the purification process was studied using ion exchange resins. Q-Sepharose FF anionic resin was shown to be the most appropriate resin, leading to a 23 fold purification factor, and 70% recovery.

Optimum pH reactions were shown to be 4.4 and 4.8 for free and calcium alginate immobilized enzyme. However, better enzyme stability was observed at pH 4.8 for free enzyme, corresponding to a half-life of about 10 days, at 50°C, whereas it was pH 4.6, with a half-life of about 6 days, at 45°C. The optimum reaction temperature was 60°C and 57.5°C for immobilized the free enzyme, respectively.

Michaelis-Menten equation with substrate inhibition fitted well the experimental data with the following kinetic constants: $K_m = 0.0389$ and 0.1070 M, $V_{max} = 86.956 \cdot 10^{-9}$ and $36.90 \cdot 10^{-9}$ mol/min.L, $K_i = 0.5857$ and 1.3548 M, for enzymes free and immobilized respectively. The inhibition effects of the glucose and fructose were studied and it has been shown that, in low concentrations of sucrose (5 to 20 g/L), the increase in the fructose and glucose concentrations led to a decrease in the enzymatic activity. On the other hand, at high concentrations of sucrose (50 up to 500 g/L), where a strong inhibition by the substrate is observed, an increase in the enzyme activity was observed when fructose and glucose concentrations were 75 g/L.

The synthesis of fructooligosaccharides was optimized using the technique of experimental design, led to the following optimal conditions: pH 6.0, temperature of 50°C, sucrose 450 g/L and 4 UI/mL enzymatic activity in the reactor, giving a conversion of about 13 %. The maximum production of oligosaccharides (82 g/L) was reached when 200 g/L of glucose was used as acceptor, with 500 of g/L of sucrose. In a comparative study with immobilized enzyme in fixed bed and mixture reactors the production of about 50 g/L of fructooligosaccharides was obtained in all cases.

1. Introdução

O comércio de enzimas industriais tem crescido significativamente devido aos avanços tecnológicos de produção e purificação das enzimas, além do surgimento de novos campos de aplicação. Nos últimos tempos, enzimas produzidas por microrganismos modificados geneticamente com o objetivo de melhorar e otimizar a produtividade dos produtos desejados tem tido uma ampla aplicação industrial. Um estudo realizado pela Business Communications Company Inc. sobre o crescimento do mercado mundial de enzimas, mostrou que em 1997 o mercado de enzimas apresentou um crescimento de 1,5 bilhões de dólares, estimando-se para 2002 a cifra de 1,8 bilhões de dólares. Representando um crescimento anual de 4,0%, os maiores crescimentos foram verificados nas indústrias de: polpa e papel (6,9% ao ano), detergentes/alvejantes (4,8% ao ano) e alimentos e alimentação animal (3,5% ao ano). Na Tabela 01 estão apresentadas as principais aplicações industriais das enzimas e o mercado mundial envolvido em sua comercialização (Magnani, 1997).

Tabela 01: Aplicação das Enzimas industriais e valor do Mercado Mundial: 1997-2002
(Magnani, 1997).

Aplicação Industrial	1997 (US\$)**	1998 (US\$)**	2002 (US\$)**	AAGR* (%) (1997-2002)
Alimentos e Alimentação animal	705,00	729,70	833,10	3,50
Têxtil/ couro	161,00	164,20	197,70	2,00
Detergentes/ alvejantes	475,20	498,00	600,90	4,80
Polpa e papel	97,60	104,30	136,00	6,90
Fabricação química	59,20	60,80	67,60	2,70
Total	1.4 98,00	1.557,00	1.820,30	4,00

*Média do crescimento anual, ** valores expressos em milhões de dólares

Recentemente uma das aplicações de enzimas que apresentou crescimento significativo foi na produção de oligossacarídeos, que de acordo com suas propriedades físico-químicas e bioquímicas vêm sendo aplicados principalmente na indústria de alimentos, em produtos utilizados para alimentação humana (bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil), animal (ração animal como inibidor de salmonella) e como aplicação medicinal (cosméticos, produtos, farmacêuticos e produtos para

diabéticos). Entretanto, o principal interesse de oligossacarídeos está no estímulo da produção de bifidobactérias (fator bifidus), sendo assim classificado como prebiótico (Playne & Crittenden, 1996).

Os oligossacarídeos são classificados como prebióticos, porque além de não serem hidrolisados e nem absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal, eles promovem de uma forma seletiva o crescimento e/ou estimulam a atividade metabólica de bactérias benéficas à saúde, sendo o crescimento de bifidobactérias considerado o principal objetivo dos prebióticos (Carraro, 2000). Os prebióticos são amplamente comercializados no Japão e na Europa como adoçantes funcionais e também são utilizados como ingredientes na produção de bebidas lácteas, balas, doces, chocolates, biscoitos, geléias, pudins e goma de mascar. Em relação ao consumo é recomendado de 8 a 10g/dia, pois de acordo com estudos realizados, consumos superiores ao recomendado pode provocar diarreia (Ferreira & Teshima, 2000).

A inclusão de oligossacarídeos na dieta acarreta vários benefícios à saúde humana, mas a contribuição mais importante destes açúcares está associada a uma melhoria na composição da flora intestinal e ao aumento do número de bifidobactérias. Devido às características fermentativas especiais que os oligossacarídeos apresentam ao organismo humano, estes compostos são considerados como um alimento funcional, que de acordo com a Portaria nº 389, de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil, é definido como todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Desta forma pode-se verificar que os alimentos funcionais deverão fazer parte da alimentação cotidiana, dentro de uma dieta saudável e balanceada, podendo seu uso regular trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente salutar (Muller, 2001).

Os efeitos benéficos à saúde obtidos pela ingestão de oligossacarídeos não digestíveis também se assemelham àqueles atribuídos à fibra na dieta, pois aumentam o bolo fecal, reduzem o trânsito gastrointestinal, aumentam o volume de lúmen intestinal e podem melhorar a digestão e absorção de nutrientes no intestino. Oligossacarídeos são encontrados na natureza na maioria dos vegetais (frutas e legumes), em leite e mel na forma

livre ou combinada. Sua utilização como alimentos funcionais é proposta desde 1980 (Crittenden & Playne., 1996).

Dentre os oligossacarídeos podemos citar como exemplos os frutooligossacarídeos, que também são utilizados como ingredientes alimentar, logo são considerados prebióticos. Devido a ampla aplicação dos frutooligossacarídeos, inúmeras pesquisas vem sendo realizadas sobre seleção e isolamento de microrganismos produtores de enzimas com atividade de transfrutossilção, estudo cinético do processo e aplicação de enzimas imobilizadas com o objetivo de melhorar a produtividade.

Estudos recentes com microrganismos da linhagem *Kluyveromyces sp.* (*Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*) mostraram que a enzima inulinase obtida destes microrganismos apresentava tanto atividade hidrolítica quanto atividade de transfrutossilção, sendo que dentre os microrganismos estudados a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* apresentou uma melhor produção de frutooligossacarídeos (Santos, 1998).

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 complexo (Treichel, 2001; Makino *et al.*, 2002 e Kabke, 2002). Além disso, estes microrganismos pertencem ao grupo GRAS ('Generally Recognized as Safe') e são aceitos pela FDA (Food and Drug Administration, EUA) para usos farmacêuticos e alimentícios.

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o potencial de síntese de frutooligossacarídeos a partir da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Para o desenvolvimento deste projeto as seguintes etapas foram realizadas: 1. Produção da inulinase por fermentação; 2. Estudo e otimização das condições de purificação por um sistema de cromatografia líquida (FPLC) com uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF e catiônica SP-Sepharose FF; 3. Caracterização da enzima tanto na forma livre como na forma imobilizada em função do pH e temperatura ótimos, pH e temperatura de estabilidade, cálculo da energia de ativação da reação e da energia de ativação da reação de desnaturação e meia-vida; 4. Estudo cinético com o cálculo das constantes de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima (V_{max}) e constante de inibição (K_i), 5. Influência da glicose e frutose na atividade enzimática, 6. Síntese de oligossacarídeos, onde foi verificada

a influência de aceptores (lactose, maltose, glicose e frutose) e 7. Estudo comparativo da síntese de oligossacarídeos utilizando a enzima livre e imobilizada.

2. Revisão da literatura

Recentemente, o uso de enzimas como catalisadores tem crescido significativamente em diversos campos de interesse industrial, tais como processamento de alimentos, têxtil, polpa e papel, detergentes e síntese orgânica (Carrea & Colombo, 2000).

Em função da facilidade de produção, muitas 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 substratos normalmente de baixo custo. Neste contexto podemos citar as inulinases (Schneider, 1996; Kalil, 2001; Makino *et al.*, 2001 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 (2-1- β -D-frutano frutanohidrolase, EC 3.2.1.7) são enzimas que atuam sobre ligações 2-1- β de inulina (um polímero de frutose formado por ligações 2,1- β), formando frutose por hidrólise, produzindo assim um xarope rico em frutose, em uma única etapa. O alto poder adoçante da frutose leva à produção de alimentos e bebidas com teores calóricos mais baixos (produtos dietéticos), indicados no controle de peso em obesos. Além disso, a frutose é menos cariogênica que a sacarose, pode mascarar o sabor amargo deixado pela sacarina e pode também ser utilizada por diabéticos. A frutose é mais solúvel e higroscópica do que a sacarose, conseqüentemente, mais difícil de cristalizar (Vandamme & Derycke, 1983; Schneider, 1996; Wei *et al.*, 1998).

Outra importante aplicação da frutose é na formulação de outros açúcares, complementando o poder adoçante, conferindo um poder adoçante maior que o obtido por outros açúcares individualmente. Assim sendo, há uma ampla aplicabilidade da frutose cristalina em produtos como cereais, bebidas carbonatadas ou não, produtos de panificação, iogurtes, achocolatados, confeitarias, gelatinas, entre outros (Schneider, 1996).

A atividade de inulinase tem sido encontrada em uma larga variedade de fungos (Xiao *et al.*, 1989; Barthomuef *et al.*, 1991; Efstahiou *et al.*, 1986; Onodera & Shiomi, 1992; Ettalibi & Baratti, 1987; Nakamura *et al.* 1997), leveduras (Hensing *et al.* 1994;

Rouwenhorst *et al.* 1990; Manzoni & Cavazoni, 1992; Pessoa Junior & Vitolo, 1997; Gupta *et al.*, 1994) e bactérias (Kim *et al.*, 1997). São também encontradas em raízes e tubérculos de plantas que contêm inulina (p.ex. alcachofra de Jerusalém, chicória ou dália) (Nakamura *et al.*, 1997).

As enzimas hidrolíticas são classificadas de acordo com o mecanismo de atuação. As inulinases são classificadas em endo-inulinases e exo-inulinases. As exo-inulinases desempenham importante papel na hidrólise da inulina, quebrando as ligações β -(2 \rightarrow 1) e separando as moléculas de frutose a partir do terminal não redutor da cadeia de inulina. As endo-inulinases além de liberar frutose, elas também são capazes de liberar oligofruetosídeos. A liberação da frutose durante a reação ocorre segundo um mecanismo em cadeia, numa ampla faixa de pH e temperatura (Vandamme & Derycke, 1983, Ettalibi & Baratti, 1987).

Nas inulinases microbianas observou-se uma atividade hidrolítica ao utilizar a sacarose como substrato, assemelhando-se desta forma à invertase. Entretanto, as invertases não apresentam atividade ou apresentam uma baixa atividade sobre polímeros de frutose. A diferença entre as duas enzimas pode ser observada pela relação S/I, que corresponde à atividade relativa sobre sacarose (S) e inulina (I), que pode ser determinada da seguinte forma:

$$\frac{S}{I} = \frac{\text{Unidades totais de atividade de invertase}}{\text{Unidades totais de atividade de inulinase}}$$

Para altos valores de S/I, a enzima obtida é a invertase. Para baixos valores de S/I (S/I < 50), inulinase (Vandamme & Derycke, 1983).

2.1.1. Microrganismos produtores de inulinases

A seleção de microrganismos produtores de inulinases dependerá da sua acessibilidade genética e de suas características fisiológicas. Podemos citar como exemplos de microrganismos produtores de inulinase: *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* (Vandamme & Derycke, 1983, Hewitt & GrootWassink, 1984, Santos, 1998). Entretanto as leveduras, principalmente as do gênero *Kluyveromyces* são as que apresentam uma melhor produtividade, além de pertencerem ao grupo GRAS (“Generally Recognized as Safe”) e

serem aceitas pelo FDA (“Food and Drug Administration”, EUA) para produtos farmacêuticos e alimentícios (Schneider,1996).

Na produção contínua de inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, em meio com limitação de carbono, Kushi *et al.* (1996) verificaram que com o aumento da taxa de diluição, a fração da enzima encontrada no sobrenadante diminui com um conseqüente aumento da fração ligada à parede celular. A fração da enzima ligada à célula também diminui à medida que a taxa de diluição aumenta. A atividade total diminui com o incremento da taxa de diluição. Este fato sugere que a síntese de inulinase em fermentação contínua é regulada pela concentração de açúcar residual no meio de cultura.

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

Santos (1998) trabalhou com três meios distintos para obtenção de inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045. O meio contendo 30 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 5,0 g/L de K₂HPO₄, pH 3,5 a 30°C foi selecionado por apresentar uma melhor reprodutibilidade nos resultados, atingindo uma atividade final de 7,54 UI/mL.

Santisteban-Silva (2001) estudou a agitação, aeração e tipo de agitador para otimização da produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em fermentadores de bancada, utilizando o meio otimizado por Kalil (2000). Foi verificado que

velocidades de agitação superiores a 450 rpm e 1 vvm implicava num decréscimo da atividade de inulinase. Em relação ao tipo de agitador, dentre os estudados (Rushton, hélice naval e “pitched blade”), o “pitched blade” apresentou melhores resultados, atingindo uma atividade de 176,2 UI/mL.

Treichel (2001) otimizou a produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* 16045 em frascos agitados utilizando meios alternativos. A máxima atividade atingida foi 113 UI/mL com o meio composto de melaço (80g/L), água de maceração de milho (50 g/L) e Prodexlac® (Indústria Prodesa, Campinas-SP) (4,5g/L), pH 3,5 e 30°C. O custo final da enzima e do meio utilizando as condições otimizadas por Treichel (2001) ficava em torno de R\$ 0,0025/UI de enzimas. Comparando estes valores com os preços da inulinase comercial da Megazyme (exo-inulinase de *Aspergillus niger* US\$120/5000 UI e endo-inulinase de *Aspergillus niger* US\$100/200 UI) (Megazyme, 2002) 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 atividade enzimática quando comparada com as linhagens já citadas na literatura. A melhor linhagem foi *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 com uma máxima atividade de 900 UI/mL após 72 horas de fermentação. Kabke (2002) otimizou a produção de inulinase em meio industrial utilizando as linhagens de *Kluyveromyces* sp. selecionadas por Makino *et al.* (2002) como melhores produtores de inulinase. De acordo com os resultados obtidos a máxima atividade de inulinase foi obtida com *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 a pH 5,0 e temperatura de 36°C (2660 UI/mL). A análise de custo realizada por Kabke (2002) demonstrou que a inulinase apresentava um custo final de R\$ 0,00014/1000 UI de atividade de inulinase.

2.1.3. Caracterização da inulinase

2.1.3.1. Estabilidade com a temperatura e 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 Vandamme & Derycke (1983) 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 inulina e sacarose e observaram que o pH ótimo foi de 5,0 para ambos os substratos e a temperatura ótima foi 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 inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 verificaram que a enzima apresentou uma temperatura ótima para a atividade enzimática sobre a sacarose de 70°C 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 (1996) verificou que a inulinase de *K. 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.

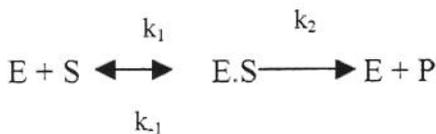
Vários estudos foram realizados sobre a influência da temperatura na atividade da inulinase. Öngel-Baysal *et al.* (1994) estudaram a influência da temperatura na atividade da inulinase de *Aspergillus niger* e verificaram que a enzima apresentava uma máxima estabilidade a 50°C. Nagamura *et al.* (1997) 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 na inulinase purificada foi realizado por Xiao *et al.* (1989), onde frações com atividade inulinolítica, denominadas de F2 e F3, apresentaram uma temperatura ótima em torno de 55°C, em tampão fosfato 0,05 M e pH 4,6. Para a inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 a temperatura ótima para hidrólise da sacarose foi 70°C e 50°C para inulina.

2.1.3.2. Cinética enzimática

A cinética enzimática estabelece uma relação entre a velocidade da reação enzimática e as concentrações de substrato (S) e de enzima (E), assim como a influência de certos fatores, tais como pH, temperatura, presença de aceptores, atividade de água, entre outros.

As enzimas funcionam como catalisadores diminuindo a energia de ativação, além de ter propriedades específicas devido a sua natureza protéica tornando-a superior em relação aos outros catalisadores. Um dos fatores mais importantes no processo de catálise enzimática é o aumento parcial das concentrações dos substratos com relação à fase aquosa, que é obtida pela ligação dos substratos ao sítio ativo.

Tomando-se a seguinte equação representativa de uma reação enzimática



Onde:

E= concentração da enzima

S= concentração do substrato

ES= complexo enzima-substrato

P= produto de reação

A enzima E se combina com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato (E.S), também denominado de “*Complexo de Michaelis*”. O complexo ES é rompido, formando o produto ou produtos P e a enzima livre.

Como a diminuição da concentração do substrato (S) correspondendo a um aumento da concentração do produto (P), pode-se medir tanto o aumento de (P) como a diminuição de (S). Assim,

$$v = -\frac{d(S)}{dt} \quad \text{ou} \quad v = \frac{d(P)}{dt}$$

Onde a velocidade de reação é o quociente diferencial da concentração do substrato ou dos produtos pelo tempo.

Na Figura 01 são apresentados os perfis de concentração de substrato e de produto, numa reação enzimática.

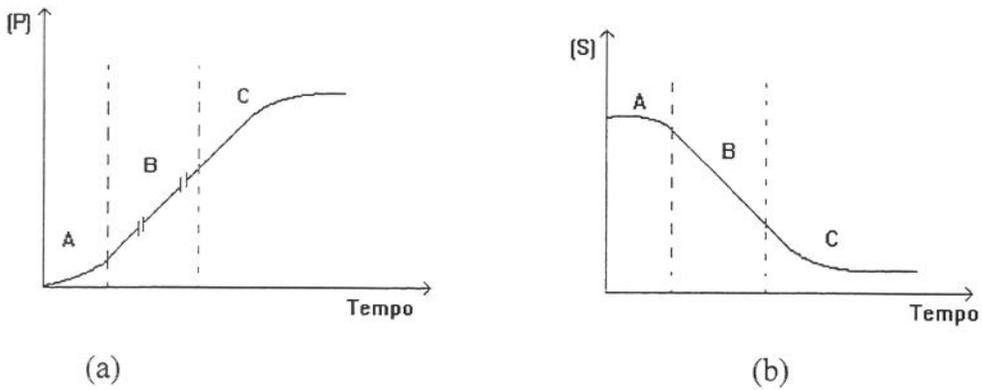


Figura 01. Cinética enzimática de: a) formação de produto (dP/dt) e b) consumo de substrato ($-dS/dt$).

Teoria de Michaelis-Menten

O modelo cinético de Michaelis-Menten é um dos mais aceitos para explicar a influência da concentração do substrato na cinética de uma reação enzimática.

A teoria admite que, inicialmente, enzima e substrato reagem reversivelmente, formando um composto intermediário denominado complexo enzima-substrato, que se decompõe ou reage com outra substância regenerando a enzima e formando os produtos da reação.

A cinética pode ser descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, conforme Equação 1:

$$-\frac{dS}{dt} = v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad (1)$$

V_{\max} = velocidade máxima de reação

K_m = constante de Michaelis-Menten

v = velocidade de reação

S = concentração do substrato

Para reações que ocorrem em baixas concentrações de substrato (0,3 mol/L, aproximadamente), tendo como base a sacarose, a cinética segue o modelo de Michaelis-Menten. Entretanto, para soluções de sacarose mais concentradas ocorre a inibição pelo

substrato. A relação entre a taxa de reação e a concentração do substrato é dada pela Equação 2

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2)$$

Experimentalmente, o modelo de inibição pelo substrato não é suficiente para descrever o comportamento de inibição para reações de hidrólise de sacarose. As velocidades iniciais de reação observadas em altas concentrações de sacarose são inferiores às taxas previstas pelo modelo. Bowski *et al.*, (1971) estudaram o comportamento deste desvio, considerando como correção do modelo, os efeitos da mudança do coeficiente de difusão molecular da sacarose, viscosidade e concentração de água livre. O ajuste do modelo cinético foi obtido quando se considerou um fator de correção em termos de água livre sobre o modelo de inibição por excesso de substrato. Cabral (1989) estudando o efeito da inibição pelo substrato utilizando sacarose com invertase comercial, ajustou seus dados experimentais de velocidades iniciais através do modelo de inibição pelo substrato corrigido por um fator $f(S)$, definido pela Equação 3.

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_0} \quad (3)$$

Onde: $D(S)$ = difusividade molecular da sacarose à concentração S .

D_0 = difusividade molecular da sacarose à diluição infinita.

Desta forma o modelo de inibição pelo substrato poderá ser escrito na Equação 4:

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \cdot f(S) \quad (4)$$

A relação $D(S)/D_0$ foi derivada a 40 e 50°C baseando-se em dados experimentais de $D(S)$, obtidos por English & Dole (Citato por Cabral, 1989), em que $D(S)$ decresce linearmente com o aumento da concentração de sacarose.

Desta forma, as velocidades iniciais de reação observadas experimentalmente (v_{obs}), podem ser relacionadas com aquelas previstas pelo modelo (v^*) e aplicadas no modelo de inibição pelo substrato (Equação 4) e a constante de inibição K_i pode ser determinada.

2.1.3.3. Efeito da temperatura na estabilidade e atividade da enzima

A velocidade de reação da maioria das reações catalisadas por enzimas aumenta com o aumento da temperatura, até atingir uma temperatura ótima, conferindo uma maior energia cinética às moléculas dos reagentes, ocasionando assim um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. Este aumento da velocidade de reação é verificado até atingir uma temperatura ótima, a partir da qual a velocidade de reação começa a diminuir devido à desnaturação das enzimas.

As constantes de velocidade de reação variam com a temperatura de acordo com o modelo de Arrhenius dado pela Equação 5.

$$k = A' e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (5)$$

Onde:

k= constante da taxa de reação

A'= fator de frequência para a reação

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

T= temperatura (K)

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 (Levenspiel, 1972).

As enzimas são moléculas complexas, e suas atividades catalíticas provêm de uma estrutura terciária precisa e ordenada, de modo a formar sítios estéricos específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. As ligações que mantêm as estruturas terciárias são fracas, de modo que ao receber energia podem ser rompidas pelo aumento das vibrações e a enzima sofrer uma desnaturação (Contieiro, 1992). Assim, o que se verifica numa reação enzimática é que a atividade aumenta até uma determinada temperatura (temperatura ótima), depois começa a decrescer rapidamente até desnaturar.

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 (Cabral, 1989).

Normalmente uma cinética de desativação térmica de primeira ordem é suficiente para descrever o comportamento da atividade enzimática com o tempo de operação, conforme modelo descrito a seguir::

$$-\frac{dE}{dt} = k_d \cdot v \quad (6)$$

$$-\frac{1}{E} \cdot \frac{dE}{dt} = k_d \quad (7)$$

Onde,

E= concentração da enzima ativa no tempo t

k_d = constante de desativação

Integrando a equação 7, para as condições iniciais de $t=0$ e $E=E_0$, temos:

$$-\ln \frac{E}{E_0} = k_d t \quad (8)$$

Onde,

E_0 = concentração inicial da enzima ativa

t= tempo

Para determinar os valores de k_d , pode-se construir diferentes curvas de $\ln v/v_0$ em função da temperatura utilizando a Equação 8. Uma outra maneira de expressar a estabilidade térmica é a meia vida, que é definida como o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja: $E/E_0 = 0,5$. A meia-vida ($t_{1/2}$) pode ser relacionada com a constante de desativação k_d , através da Equação 9, que é obtida substituindo-se E por $E_0/2$ na Equação 8.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d} \quad (9)$$

Logo, k_d varia com a temperatura segundo a equação de Arrhenius (Equação 5). Desta forma é possível a determinação de E_d (energia de ativação para a reação de desnaturação da enzima), com o gráfico de $\ln k_d$ em função de $1/T$.

Henley & Sadana (1985) classificam as curvas de desativação em duas grandes categorias: na primeira a atividade será sempre menor que a atividade inicial e na segunda, a atividade pode ser maior que a inicial em algum período de tempo. Dentre estas duas categorias, pode-se ainda distinguir 14 casos diferentes.

Para explicar o fato de ocorrer um aumento de atividade com o tempo, deve-se assumir um estado intermediário de desnaturação da enzima, no qual ela é mais ativa que a enzima nativa. Para tal, considera-se o seguinte mecanismo de desnaturação, denominado 'modelo em série'.

2.1.3.4. Efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima

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 (Contieiro, 1992)

De um modo similar à influência que a temperatura exerce na atividade enzimática, a enzima também apresenta um determinado valor de pH onde sua atividade é máxima (pH ótimo). Neste valor de pH verifica-se que a máxima quantidade da enzima está na sua forma ativa, acima deste valor de pH verifica-se um decréscimo da atividade enzimática, ocasionado pela desnaturação da enzima. 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 (Richard, 1984, Sant'Anna, 1989).

Fazendo uma comparação dos valores obtidos para o pH ótimo e de estabilidade a inulinase de *Aspergillus niger*, em tampão citrato-fosfato, Öngen-Baysal *et al.*, (1994) teve uma máxima atividade a pH 5,0. A faixa de estabilidade ficou entre o pH 5,0- 6,0. A endo-inulinase de *Penicillium sp.* TN-88 apresentou máxima atividade a pH 5,2 e o pH de estabilidade ficou entre 5,0-7,0, incubando a enzima durante 24 horas (Nagamura *et al.*, 1997).

Xiao *et al.* (1989), purificaram a inulinase de *Chrysosporium pannorum* e obtiveram duas frações de exo-inulinase (F2 e F3). No estudo para caracterização quanto ao pH, os

autores verificaram que a enzima apresentou um ótimo no pH 5,0 para F2 e 6,0 para F3. A estabilidade ficou entre 5,0-7,5 para F2 e 5,0-8,5 para F3.

2.2. Enzimas imobilizadas

Enzimas imobilizadas compreende ao sistema onde a enzima se encontra física ou quimicamente associada (ou contida) a um suporte ou a uma matriz, não sendo este sistema essencial para a atividade da mesma. Tal definição (proposta na 1^a Conferência de Engenharia Enzimática- não pressupõe, necessariamente, que o suporte seja um sólido insolúvel, e nem que a enzima não se encontre em solução dentro do sistema que a contém. Contudo, dentro de uma perspectiva tecnológica, são os suportes sólidos insolúveis que oferecem maiores possibilidades de utilização industrial. Apesar disto, é crescente o uso de enzimas solúveis contidas no interior de cápsulas ou fibras ocas em aplicações clínicas, como por exemplo, membranas semipermeáveis de ultrafiltração (Hartmeier, 1988, Baruque-Filho, 1991).

O sucesso da utilização industrial de enzimas imobilizadas depende diretamente da sua atividade inicial e estabilidade. Preparações altamente ativas com baixa estabilidade, podem ser toleradas apenas quando o suporte é barato e abundante, sendo descartado após um curto período de uso, ou quando o mesmo é facilmente regenerável, com alta estabilidade. Altas atividades e especialmente altas estabilidades são necessárias quando a enzima e/ou suporte são caros, e este não pode ser regenerado (Baruque Filho, 1992, Wong *et al.*, 2001)

A vantagem dos processos com enzimas imobilizadas quando comparados a processos com enzimas na forma livre, é a reutilização deste catalisador e a viabilização de processo contínuo, minimizando assim os custos com a enzima e custos operacionais. O uso de enzimas imobilizadas como catalisadores surge como uma solução para os processos industrial onde o emprego da enzima solúvel é pouco viável devido aos custos inerentes à produção, purificação, instabilidade operacional e dificuldade técnico-econômica de recuperação para reutilização após o término do processo (Baruque Filho, 1991; Cabral, 1989).

A imobilização sobre suporte insolúvel é freqüentemente acompanhado de um aumento da estabilidade da enzima, facilitando o emprego em reatores contínuos, funcionando por longos períodos, permitindo desta forma utilizar enzimas com um maior

grau de pureza, certamente mais caras, porém com maior especificidade, melhorando consideravelmente a qualidade dos produtos.

A escolha da enzima na forma solúvel ou imobilizada depende de uma avaliação econômica do processo, onde as vantagens e desvantagens serão analisadas de forma quantitativa, com o estudo sobre cinética e estabilidade das enzimas imobilizadas e livres, levando em consideração custos, propriedades físico-químicas, eficiência da imobilização e capacidade de carga do suporte.

Os métodos de imobilização os quais podem ser resumidos em: imobilização por ligação e por oclusão. O método de oclusão pode ser dividido em oclusão por géis, oclusão em fibras e microencapsulação em membranas. O método de oclusão em géis é feito a partir da retenção das moléculas da enzima no interior do gel, entre os interstícios do polímero. A enzima possuindo um alto peso molecular ficará impedida de difundir para o exterior, enquanto o substrato e produtos de reação, com peso molecular inferior poderão se difundir entre a solução externa e interna do gel (Cabral, 1989).

2.2.1. Alginato de cálcio

Alginato é um polímero linear composto de ligações 1-4- β -D ácido manurônico (M) e o epímero C5 ácido α -L gularônico. Estes monômeros podem ser agrupados em blocos de resíduos G (blocos G) e resíduos (M) consecutivos (Ertesvåg *et al*, 1998, Draget *et al*, 1997). A composição global e a seqüência de monômeros no polissacarídeo alginato variam conforme a origem (Mofodi *et al*, 2000). As esferas de alginato são formadas a partir das ligações cruzadas iônicas entre cálcio e o grupo carboxila sobre o segmento ácido poligularônico adjacente (Ortega *et al*, 1998, Stewart *et al*, 1993, Tanaka *et al*, 1984). Esta ligação dos cátions metálicos com o polímero ocorre na região G, portanto quanto maior for a concentração de blocos G na estrutura do gel maior será a sua estabilidade (Martinsen *et al*, 1989).

As características do gel são baseadas na porosidade e resistência mecânica, necessárias para a eficiência do processo. A porosidade está intimamente ligada à capacidade do gel em reter a enzima e de alterar a difusividade efetiva do substrato. O alginato é bioquimicamente inerte e as células podem estar oclusas nos espaços

intersticiais, podendo utilizar um substrato de valor alimentício, pois durante o processo de imobilização não são utilizados reagentes tóxicos (Cabral, 1989).

Um estudo interessante realizado com o alginato foi quanto à capacidade de difusão de substratos de alto e baixo peso molecular. No trabalho realizado por Tanaka *et al.*, (1984), verificou-se que substratos de baixo peso molecular (substratos com peso molecular menores do que 2.10^4 , como por exemplo, glicose, L-triptofano e α -lactoalbumina) apresentaram uma alta difusão no gel de alginato, independente da concentração do gel e da solução de cloreto de cálcio. Entretanto, para substratos com alto peso molecular (albumina, $PM=6,9.10^5$, γ -globulina, $PM=1,54.10^5$, e fibronectina, $PM=3,41.10^5$), não foi verificado o mesmo efeito da difusão, o que se pode concluir que para substratos de alto peso molecular o efeito da concentração do gel é mais significativo do que a concentração de cloreto de cálcio.

Em relação aos métodos de imobilização de enzimas estudados recentemente, nenhum deles pode ser considerado como ideal ou universal, devido às grandes diferenças existentes na composição e características químicas das enzimas, bem como dos substratos e produtos. Cada método de imobilização possui limitações específicas e aplicações particulares. Na escolha do processo é importante considerar a facilidade de preparo, custo, atividade e estabilidade da enzima imobilizada (Cabral, 1989).

2.2.2. Cinética das reações com enzimas imobilizadas

As enzimas imobilizadas apresentam várias vantagens na sua aplicação quando comparadas às enzimas livres, porém são observadas mudanças nas suas propriedades físicas e químicas após o processo de imobilização, tais como: mudanças na atividade enzimática, estabilidade e cinética (Baruque-Filho, 1991).

O comportamento de uma enzima imobilizada pode ser bastante diferente quando comparado ao seu comportamento em solução. Este comportamento pode estar relacionado à variedade de enzimas, reações, matrizes sólidas (suportes) e tipos de imobilização. Considerando que a enzima esteja uniformemente distribuída no suporte e supondo um sistema isotrópico, as mudanças de comportamento enzimático associadas à imobilização num meio heterogêneo podem ser atribuídas a dois fatores: 1. Mudança na molécula da enzima ou na sua vizinhança imediata (resultante da ligação enzima-suporte) e 2.

Alterações locais no ambiente enzimático (ambiente heterogêneo), no qual as concentrações daqueles componentes presentes no seio líquido ('bulk'), onde a reação enzimática é monitorada, são diferentes daqueles do micro ambiente da enzima imobilizada (Sant'Anna, 1989).

O verdadeiro comportamento de uma enzima imobilizada seria representado pelos seus parâmetros cinéticos intrínsecos, se as concentrações das espécies fossem as mesmas no micro e macroambiente. Mesmo assim, os parâmetros intrínsecos não seriam iguais ao da enzima livre em solução, devido às mudanças conformacionais, aos impedimentos estéricos e às interações com a matriz. A velocidade de reação inerente seria observada na ausência de efeitos difusionais, isto é, quando a taxa de transferência das espécies fosse infinitamente alta. As diferenças entre as taxas intrínsecas e inerentes estão associadas à existência de efeitos de partição devido às cargas elétricas e outra interação entre a matriz-suporte e as espécies solúveis (Sant'Anna, 1989, Hartmeier, 1988).

A velocidade efetiva e os parâmetros cinéticos efetivos são observados quando ocorre limitação difusional na presença ou não de efeitos de partição. A velocidade efetiva é medida como uma taxa global em condições experimentais usuais.

A cinética de enzimas imobilizadas pode ser descrita em termos de parâmetros cinéticos aparentes ou efetivos. A determinação dos parâmetros cinéticos aparentes é realizada a partir da forma linearizada de Lineweaver-Burk utilizando os dados experimentais de velocidades iniciais de reação em função da concentração de substrato. Já na determinação dos parâmetros efetivos deve-se conhecer o perfil de concentração de substrato no interior da matriz. Inicialmente determina-se o coeficiente de transferência de massa na camada limite (K_L), com o objetivo de calcular a concentração na superfície da matriz. No caso de uma matriz porosa, o substrato difunde-se no interior da matriz, se transformando em produto pela ação da enzima que se encontra retida na matriz do gel (Cabral, 1989).

2.3. Purificação de Enzimas

Para purificação das enzimas, normalmente é utilizada uma seqüência de etapas de separação que resultará em um elevado grau de pureza e rendimento. O objetivo da purificação é aumentar a pureza ou a afinidade biológica da proteína, eliminando as proteínas inativas e elevando o rendimento desta proteína ao máximo (Lehninger, 1977).

O desenvolvimento de técnicas e métodos para separação e purificação de proteínas tem sido importante para o crescimento da biotecnologia. As melhorias encontradas em materiais (p.ex. resinas) e a utilização de equipamentos baseados em microprocessadores têm transformado o processo de separação de proteínas mais preditivos e controláveis, embora às vezes sejam considerados por muitos mais como uma arte do que uma ciência.

Várias técnicas são utilizadas nas etapas preliminares de purificação de proteínas. Uma delas é a precipitação de proteínas no ponto isoelétrico, onde o pH da mistura de proteínas é ajustado para o ponto isoelétrico de um de seus componentes. Nesta técnica a maior parte da proteína ou a totalidade daquele componente irá se precipitar, deixando em solução as proteínas cujo ponto isoelétrico se situa acima ou abaixo daquele pH. Outra técnica é a precipitação com solventes orgânicos, por exemplo, etanol.

Na purificação por cromatografia, uma larga variedade de materiais é utilizada para empacotamento das colunas cromatográficas, como por exemplo para técnicas de permeação em gel, trocadores iônicos, adsorventes para cromatografia de afinidade, fase reversa, adsorventes de interação hidrofóbicas. Estes materiais podem ser utilizados em meio de baixa pressão (90-100 μm de diâmetro da partícula), média pressão (30-50 μm , diâmetro da partícula) e alta pressão (5-10 μm , diâmetro da partícula) com o objetivo de satisfazer diferentes exigências de eficiência, capacidade e custo (Collins, 1998)

Diferentes processos são utilizados, sendo que em um deles, após a extração, o caldo enzimático ainda apresenta proteínas inativas que são indesejáveis e interferem na atividade enzimática. No caldo pré-purificado o teor de enzimas de interesse fica em torno de 0,1-50%. Observa-se que a um determinado pH, as proteínas podem diferir quanto a: solubilidade, distribuição de carga, densidade de carga, hidratação, tipo, forma, grupos reativos específicos, estabilidade relativa.

2.3.1. Purificação de enzimas por cromatografia líquida

Os custos referentes ao processo de bioseparação representam de 50 a 80% do custo de produção da enzima. Entre os processos existentes para purificação de proteínas os processos cromatográficos são um dos mais caros, representando pelo menos metade do custo total de produção de uma droga, proteína ou produto biológico (Knight, 1989; Spalding, 1991).

Para que a redução dos custos de produção ocorra é importante avaliar os equipamentos e otimizar o processo de recuperação e purificação da enzima. Para isso, é importante analisar melhor e ter um amplo conhecimento dos diferentes aspectos do produto envolvido no processo (Kalil, 2001).

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

2.3.2. Classificação dos métodos cromatográficos

Nos processos biotecnológicos, a cromatografia frequentemente significa selecionar proteína ou peptídeo de uma solução complexa, tal como caldo proveniente da fermentação. Os métodos cromatográficos são diversos e a maioria pode ser modificada para ajustar a um objetivo particular. As proteínas podem ser separadas da solução devido ao tamanho, forma, grupos hidrofóbicos e solubilidade. Proteínas também podem sofrer partição através de interações bioespecíficas. A cromatografia por afinidade, baseada no fenômeno superficial fornece uma purificação muito específica (Knight, 1989).

2.3.2.1. Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é baseada na ligação competitiva de íons de um tipo, neste caso a proteína, com outros tipos de íons, que tanto podem ser outras proteínas ou íons de sais de mesma carga, a um meio cromatográfico de carga oposta, o trocador iônico. A Figura 02 esquematiza claramente o princípio de cromatografia de troca iônica (Pharmacia, 1998).

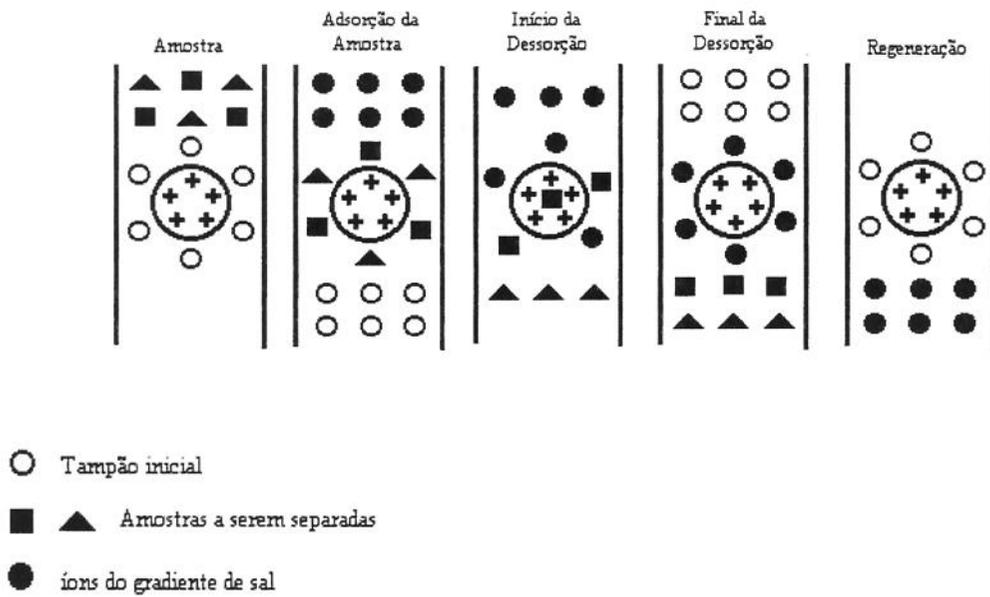


Figura 02: Esquema do mecanismo de troca iônica (Pharmacia, 1998).

A base dos processos por troca iônica é a ligação competitiva de íons de um tipo, neste caso a proteína, com íons de outro tipo, por exemplo outra proteína ou íons de sais de mesma carga, a um meio cromatográfico de carga oposta, o trocador iônico. A interação entre as proteínas e o trocador iônico depende de vários fatores: carga líquida, distribuição de carga na superfície da proteína, comprimento iônico e a natureza dos íons do solvente, pH (ou atividade de prótons). Quanto mais carregada estiver a proteína, mais forte será a ligação com o trocador iônico. Condições como pH que alteram a carga efetiva, ou na proteína ou no trocador iônico afetarão a interação e podem ser usadas para influenciar o processo de troca iônica. O pH é um dos parâmetros mais importantes que determinam as ligações com as proteínas bem como determina a carga efetiva da proteína e do trocador iônico. O controle do pH pela adição de sal tampão é essencial para obtenção de resultados reprodutíveis (Collins, 1995, Karisson *et al.*, 1989).

Em altas concentrações de íons de sais competitivos, as proteínas iniciarão o deslocamento do trocador iônico na ordem da força de ligação. Ligações mais fracas serão deslocadas e eluídas da coluna em primeiro lugar.

Na escolha do trocador iônico para a purificação da proteína com pI conhecido, deve-se levar em conta que:

- Se os componentes da amostra são mais estáveis abaixo do pI, deve-se usar um trocador catiônico.
- Se as proteínas são mais estáveis acima do pI, usa-se um trocador aniônico.

A utilização de métodos cromatográficos torna a purificação das enzimas mais eficiente. Os principais mecanismos de separação envolvidos nos processos cromatográficos, são baseados em: absorção, troca iônica, afinidade específica, permeação em gel ou interações hidrofílicas. O princípio da cromatografia consiste em adicionar uma solução tampão para equilibrar a coluna, sendo adicionada em seguida a solução enzimática. A eluição da enzima se dará com o auxílio de uma solução tampão com um gradiente ou ligante específico para a enzima desejada. O eluente que sai da coluna é coletado em frações e testado quanto à atividade enzimática (Whitaker, 1996).

A cromatografia de troca iônica é um dos métodos cromatográficos utilizados para purificação de enzimas, baseado na ligação competitiva dos íons da proteína ou íons de sais de mesma carga, a um meio cromatográfico de carga oposta (Collins, 1995).

2.3.2.2. Cromatografia de permeação em gel

Cromatografia de permeação em gel é um método cromatográfico que se baseia num processo físico, onde uma amostra adequadamente diluída é passada através de uma coluna empacotada com um meio cromatográfico que é um gel. A separação é o resultado do acesso limitado das moléculas grandes dentro da estrutura porosa do recheio. Assim as moléculas que difundem para dentro do gel (moléculas pequenas) são retardadas na sua passagem através da coluna, comparadas às moléculas grandes que não podem difundir dentro do gel e movem-se continuamente na coluna fluindo com o eluente. As moléculas com tamanho intermediário migram com velocidades entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada com seus tamanhos efetivos.

Este método primeiramente fornece a distribuição do volume de eluição, ou distribuição do tempo de retenção. O tempo de retenção das espécies moleculares é uma função de seu tamanho, de variáveis operacionais, tais como tipo de gel, solvente, temperatura, vazão e de outras variáveis que influenciam o alargamento da curva. O peso molecular das frações pode ser obtido relacionando o tempo de retenção ao peso molecular

quando padrões apropriados são utilizados para a construção da curva de calibração. O objetivo da calibração, contudo, é estabelecer uma expressão que relaciona o tempo de retenção ao tamanho molecular a valores operacionais e outras variáveis (Santos, 1996).

2.4. Análise de carboidratos por cromatografia líquida

A cromatografia líquida é uma das mais importantes técnicas de separação existentes atualmente e o seu emprego em laboratórios de pesquisas é considerada nos últimos tempos indispensável. Assim, é importante conhecer suas vantagens, limitações, componentes e os critérios de escolha entre as opções de equipamentos.

A cromatografia líquida é uma técnica que permite separações e análises qualitativas e quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em diferentes tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins, 1995).

Como qualquer técnica cromatográfica, a cromatografia líquida apresenta vantagens e limitações. Na Tabela 02, estão apresentadas algumas destas vantagens e desvantagens.

Tabela 02: Vantagens e limitações da cromatografia líquida de alta eficiência

Vantagens	Limitações
Menor tempo de análise	Alto custo da Instrumentação
Alta resolução	Alto custo de operação
Resultados quantitativos	Difícil análise qualitativa
Versatilidade	Falta de detector universal e sensível
Automação	Necessidade de experiência no seu manuseio

(Collins, 1998)

A separação por cromatografia líquida é realizada em colunas cromatográficas. Normalmente são construídas em metais e projetadas para trabalhar em pressões de até 500 atm. As dimensões das colunas dependem do processo, e podem ser classificadas em colunas analíticas e preparativas (Ciola, 1998).

As colunas analíticas são utilizadas para separação de pequenas quantidades de material, onde o principal objetivo é a análise qualitativa ou quantitativa. Os tubos das colunas analíticas são empacotados com a fase estacionária conveniente, geralmente sílica ou seus derivados de granulometria de 3, 5, 7 ou 10 micra. Dependendo da finalidade, as

colunas analíticas podem ter geralmente comprimento de 3 a 60 cm e diâmetro interno de 0,2 até 8 mm. Quanto às colunas preparativas, sua aplicabilidade está voltada a produção industrial de até 300 t/ano. A granulometria empregada como fase estacionária neste tipo de coluna é extremamente baixa (7 a 10 micra), porém as colunas são projetadas com diâmetros e vazões para grandes operações. As colunas preparativas atuais apresentam diâmetros de 10, 20 e até 80 cm e alturas de 1 até 4 metros, operando a pressões de algumas centenas de atmosferas. As modernas aplicações industriais da cromatografia preparativa são: 1. preparação e isolamento de compostos para fins de identificação, 2. preparação de padrões puros, 3. materiais de alto valor e de difícil purificação por outros métodos, como por exemplo: compostos opticamente ativos, derivados de isótopos ou isômeros de interesse científico, farmacêutico ou bélico (Ciola, 1998).

2.4.1. Cromatografia de íons – (HPLC- PAD)

A cromatografia de íons é definida como a técnica de separação e quantificação de cátions e ânions, empregando colunas com resinas trocadoras de íons ou seus equivalentes. Esta técnica cromatográfica permite a análise de íons em soluções aquosas, empregando como fase móvel soluções iônicas num valor de pH especificado. Para fins de aplicações a cromatografia de íons pode ser dividida em: 1. Cromatografia de ânions, 2. Cromatografia de cátions. Recentemente tem-se empregado o sistema de cromatografia de íons acoplado a um detector de pulso amperométrico para separação, identificação e quantificação de carboidratos (Weiss, 1995).

O avanço da técnica de cromatografia de íons ocorreu no final dos anos 80, revolucionando as análises de carboidratos. As principais vantagens da cromatografia de íons (HPLC-PAD) são: 1. velocidade nas análises (por exemplo: análises de monossacarídeos podem ser realizadas em 10 minutos; 2. alta resolução (separação de isômeros e anômeros de posição). Isto se deve ao tipo de resina empregada, correspondendo à resinas de película de microesferas onde pequenas esferas de resina de troca de ânions estão ligadas a uma grande esfera de resina de troca de cátions. Além disso, a sensibilidade obtida na faixa de sub-mol sem a necessidade de derivatização é possível devido à tecnologia de detecção de pulso amperométrica (PAD) (Lee, 1996 e Kunz *et al*, 1996).

Quanto às técnicas de cromatografia líquida, o sistema HPLC-IR é o método mais comum para identificação e quantificação de sacarídeos, entretanto apresenta algumas desvantagens, tais como: 1. técnica não seletiva, 2. pouca sensibilidade na separação dos compostos a serem identificados. Ao contrário do sistema HPLC-IR, o HPLC-PAD, é um sistema que oferece mais vantagens, principalmente em relação a sensibilidade do detector. Neste sistema é utilizado um detector de pulso amperométrico (PAD) equipado com eletrodo de ouro, aumentando desta forma a seletividade, onde este tipo de detector é específico para componentes contendo grupos funcionais ionizáveis como, por exemplo, hidroxilas, aminas e grupos sulfídicos. Ácidos carboxílicos e espécies inorgânicas não interferem neste tipo de detector. Atualmente a cromatografia líquida de íons é o sistema mais utilizado para carboidratos, pois são ácidos fracos com pK 's na faixa de 12-14, sendo mais facilmente separados por ânions pelo controle do pH (Weiss, 1995; Martens & Frankenberger, 1990).

Os carboidratos só podem ser detectados pelo método de amperometria de pulso em soluções de pH alto (acima de 11) sendo facilmente separados em colunas de troca de ânions com alta eficiência. Mesmo sendo considerado um método bastante poderoso para identificação de carboidratos, a detecção amperométrica de pulso pode sofrer interferência de aminas e sulfas, por ser uma técnica bastante seletiva e sensível (Lee, 1996).

Em altos valores de pH, os carboidratos podem ser oxidados eletrocataliticamente na superfície do eletrodo de ouro pela aplicação de um potencial positivo. A corrente gerada é proporcional a concentração do carboidrato, e por esta razão os carboidratos podem ser detectados e quantificados. Se somente um único potencial é aplicado para o eletrodo, pode ocorrer uma contaminação do eletrodo, perdendo a eficiência do mesmo. Para evitar esta perda de sinal, a superfície do eletrodo é limpa por uma série de potenciais que são aplicados em intervalos de tempos fixados após a detecção do potencial. Uma série de potenciais aplicados durante um período de tempo assemelha-se a uma 'waveform'. As repetições da aplicação das 'waveform' é a base da amperometria pulsada. Os potenciais de uma 'waveform' são denominados de $E_1, E_2, E_3, \text{etc.}$, onde E_1 é o potencial de detecção. Os outros potenciais são de limpeza e restauração do eletrodo para posteriores detecção. Os potenciais são mantidos por um período de tempo $t_1, t_2, t_3, \text{etc.}$ O período de tempo t_1 é subdividido em t_{del} e t_{det} . Onde t_{del} (tempo de atraso) é o tempo que permite a mudança de

corrente (produzida quando muda os potenciais) declinar assim que a corrente da oxidação do analítico é medida durante o período de detecção, t_{det} . (Dionex Corporation, TN21, 1994; Weiss, 1995).

Quanto ao tempo de retenção ele está diretamente relacionado com o valor do pK_a dos componentes existentes na amostra a ser analisada.

Na Tabela 03 estão apresentados os valores de pK_a para alguns exemplos de carboidratos.

Tabela 03. Valores de pK para carboidratos

Carboidratos	pK_a
Frutose	12,03
Manose	12,08
Xilose	12,12
Glicose	12,28
Galactose	12,39
Sacarose	12,51

Soga & Serwe (2000)

2.5. Oligossacarídeos

Oligossacarídeos são polímeros compostos de resíduos de monossacarídeos unidos por ligações hemiacetálicas, neste caso denominadas ligações glicosídicas, em número que variam de duas, até aproximadamente dez unidades. São compostos importantes na determinação de estruturas de polissacarídeos, podendo ser definidos como glicosídeos contendo de 3 a 10 unidades de monômeros de hexoses. Entretanto, muitos dissacarídeos possuem propriedades similares aos açúcares de moléculas maiores, e são freqüentemente os principais componentes de produtos de oligossacarídeos de grau alimentar (Schiweck *et al.*, 1995).

Os oligossacarídeos são utilizados como novos ingredientes funcionais dos alimentos, apresentando grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos, podendo ser encontrados em frutas, vegetais, leite e mel (Crittenden, 1996).

Recentemente um grande número de pesquisas sobre a produção e aplicação de oligossacarídeos e polissacarídeos tem surgido devido às suas propriedades fisiológicas e tecnológicas. Baseando-se em suas propriedades físico-químicas e bioquímicas, os

oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para alimentação humana (bebidas, adoçantes, formulação de leite em pó infantil), animal (ração animal como inibidor de salmonela) e aplicação medicinal (cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos). Entretanto o principal interesse na produção de oligossacarídeos não se encontra particularmente no seu uso como adoçante alternativo, mas sim no estímulo da produção de bifidobactérias (fator bifidus) (Playne & Crittenden, 1996).

As bifidobactérias são responsáveis pelos seguintes efeitos benéficos: 1. manutenção normal da microflora intestinal, 2. maior tolerância à lactose, 3. atividade anticariogênica, 4. estímulo ao sistema imunológico e 5. melhora do valor nutricional dos alimentos. Quanto às suas aplicações terapêuticas pode-se citar: 1. prevenção de infecções urogenitais; 2. alívio da constipação; 3. redução da diarreia induzida por antibióticos; 4. prevenção da osteoporose; 5. prevenção do câncer de cólon (O'sullivan *et al.*, 1992).

Na Figura 03 está representado o efeito do consumo de oligossacarídeos no crescimento de bifidobactérias.

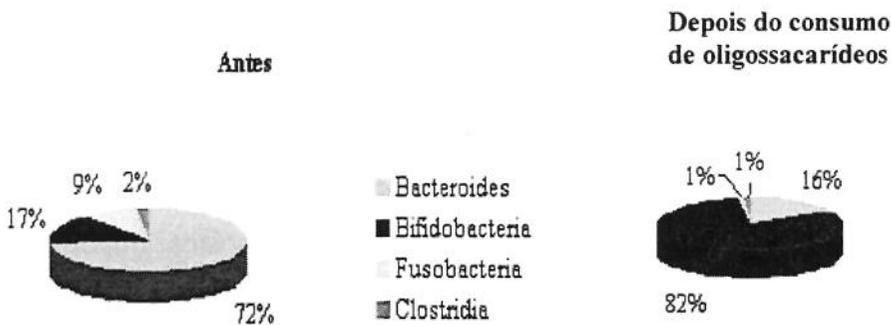


Figura 03: Microflora intestinal antes e após o consumo de oligossacarídeos (www.alimentos-funcionais.com).

2.5.1. Propriedades dos oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são solúveis em água e possuem um baixo poder adoçante, correspondente a aproximadamente 0,3 a 0,6 vezes em relação à sacarose. A doçura dos produtos contendo oligossacarídeos está diretamente relacionada com a estrutura química, a massa molecular e níveis de mono e dissacarídeos presentes na mistura. É importante

ressaltar que a doçura dos oligossacarídeos relativamente baixa torna-os bastante desejáveis como ingredientes em produtos onde existe necessidade de acentuar a textura, sabor e outras propriedades dos alimentos que apresentam uma doçura reduzida (Crittenden & Palyne, 1996).

Semelhante ao amido e açúcares simples, os oligossacarídeos de grau alimentar disponíveis atualmente não são utilizados pela microflora bucal para produção de ácidos e poliglucanos. Conseqüentemente estes oligossacarídeos são utilizados como substitutos do açúcar devido à baixa cariogenicidade. Muitos dos oligossacarídeos não são degradados pelas enzimas digestivas humanas, tornando-as desejáveis como adoçantes em alimentos de baixa caloria e podem ser consumidos pelos diabéticos. Por outro lado, podem também mascarar o sabor residual deixado pelos adoçantes mais intensos (Playne & Crittenden, 1996).

2.5.2. Produção de oligossacarídeos

Atualmente existem 12 tipos de oligossacarídeos com grau alimentar em produção comercial, com exceção de soja-oligossacarídeos (produzidos por extração direta) e lactulose (produzida por reação de catálise alcalina), os oligossacarídeos de grau alimentar podem ser produzidos quimicamente ou pelo uso de enzimas. Muitos são produzidos pela síntese enzimática a partir de açúcares simples, pela reação de transglicosilação de plantas ou de origem microbiológica (Ekhart & Timmermans, 1996).

Estes processos normalmente produzem uma faixa de diferentes oligossacarídeos, diferindo em seu grau de polimerização e algumas vezes na posição da ligação glicosídica. Substratos não consumidos e monossacarídeos estão presentes após a formação dos oligossacarídeos, sendo que a remoção destes açúcares contaminantes é feita por processos cromatográficos, obtendo-se oligossacarídeos com alto grau de pureza (Hidaka *et al.*, 1989; Yun *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1991).

2.5.3. Classificação dos oligossacarídeos

Dentre os oligossacarídeos produzidos comercialmente podemos citar como exemplos, os galacto-oligossacarídeos obtidos de lactose a partir da ação β -galactosiltransferase da enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23), observando uma predominância da reação de hidrólise a altas concentrações de lactose. A lactosacarose,

produzida a partir da mistura da lactose e sacarose usando a ação de transfrutossilacção da enzima β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26). A palatinose, também conhecida como isomaltulose produzida a partir da sacarose usando uma síntese da isomaltulose imobilizada (EC 4.5.4.99). A glicosil-sacarose é produzida a partir da maltose e sacarose sob ação da enzima glucanotransferase (EC 2.4.1.19). E os frutooligossacarídeos, que são obtidos a partir da sacarose pela ação de transfrutossilacção da enzima β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.126) ou pela β -frutosiltransferase (EC 2.4.1.9) (Playne & Crittenden, 1996, Crittenden & Playne, 1996, Yun, 1996).

2.6. Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos pertencem à classe de açúcares constituídos de um a três unidades de frutose ligada a uma molécula de sacarose na posição $\beta(2-1)$. Os principais componentes são kestose, nistose e 1-frutosilnistose. Frutooligossacarídeos são considerados como novos ingredientes funcionais dos alimentos, devido as suas características fisiológicas e tecnológicas. Sua aplicação é ampla, seja na indústria de alimentos (humana e animal) como na farmacêutica. Os frutooligossacarídeos possuem propriedades similares aos adoçantes alternativos (baixa caloria, baixa cariogenicidade) e podem ser utilizados por diabéticos. Dentre as propriedades mais importantes está o estímulo da bifidobactéria, que auxilia na manutenção de um bom funcionamento gastrointestinal (Yun, 1996; Spiegel *et al.*, 1994; Park & Almeida, 1991).

A mistura de frutooligossacarídeos é usada como adoçantes não digeríveis no intestino, mas metabolizadas como fibras dietéticas solúveis. No cólon elas são rapidamente fermentadas pela microflora benéfica, principalmente pela bifidobactérias. Estas inibem, especificamente, o crescimento de bactérias prejudiciais, tais como a *clostridia*. Tal alteração na composição da flora intestinal pode ser benéfica para a saúde intestinal e para a sensação de bem-estar (Yun, 1996).

Os frutooligossacarídeos apresentam propriedades físicas e fisiológicas que os tornam compostos de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São açúcares não digeridos pelo organismo humano, passando através do intestino delgado sem serem absorvidos, e vão direto para o intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bactérias na microflora intestinal (Mitsouka, 1990).

Normalmente podem ser obtidos por fontes de origem vegetal como chicória, alcachofra de Jerusalém, dália, cebola, alho, alho poró e trigo, ou por processos enzimáticos. As características mais importantes destes açúcares alternativos são: poder adoçante reduzido, não metabolizáveis pelo organismo humano, atuação similar às fibras solúveis e utilizáveis pelas bifidobactérias que inibem a produção de substâncias putrefativas (Schiweck *et al.* 1995).

2.6.1 Produção de frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos são obtidos a partir da sacarose sob ação da enzima β -frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) ou β -frutosiltransferase (E.C.2.4.1.9). Esta denominação dada às enzimas produtoras de frutooligossacarídeos está relacionada à ação de transfrutossilação da invertase sobre altas concentrações de sacarose (Park & Almeida, 1994; Patel *et al.*, 1994)

As enzimas que apresentam melhor potencial como produtora de frutooligossacarídeos são obtidas de fungos (*Aspergillus sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus japonicus*) (Chien *et al.*, 2001). Santos (1998), verificou que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* além de apresentar uma característica hidrolítica, possui também a capacidade de sintetizar oligossacarídeos. Trabalhando em meio aquosos atingiu-se níveis de até 51 g/L, utilizando uma solução de sacarose a 50% (p/v). Estes polímeros caracterizados como frutooligossacarídeos foram identificados como kestose, nistose e fructosilnistose (GF₂, GF₃ e GF₄) que apresentam os mesmos efeitos benéficos atribuídos aos oligossacarídeos.

A produção contínua de frutooligossacarídeos pode ocorrer tanto com a enzima na forma livre quanto na forma imobilizada. Atualmente, existem dois processos industriais de produção de frutooligossacarídeos realizados por duas indústrias de alimentos, uma japonesa e outra Coreana, ambos utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio (Chien *et al.*, 2001).

A produção de frutooligossacarídeos com alta produtividade pode ser realizada utilizando sacarose em altas concentrações e uma enzima com uma maior ação de transfrutossilação. O processo industrial foi desenvolvido a partir de uma solução de sacarose 50-60%, que passa por uma coluna com células de *Aspergillus niger*, onde ocorre

a transfructosilação, seguida por uma troca iônica para descoloração e dessalinização. O produto final corresponde a uma mistura de frutooligossacarídeos de cadeia curta, constituído por kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-fructosilnistose (GF₄) (Park & Almeida, 1994).

A reação de transfructosilação, responsável pela produção de frutooligossacarídeos é quantitativamente diferente entre as diferentes linhagens microbianas. O aumento da concentração do substrato favorece este tipo de reação. Durante a reação, observa-se uma competição entre a água e outros substratos pela transferência de radicais frutossil nas reações catalisadas pelas enzimas β -fructofuranosidases (Hidaka *et al.*, 1988; Hirayama *et al.*, 1989).

2.6.2. Aplicação industrial dos frutooligossacarídeos

O Japão produz comercialmente um novo tipo de adoçante alternativo conhecido como “neosugar”, que corresponde a uma mistura de frutooligossacarídeos, cujos principais componentes são kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-fructosilnistose (GF₄) (Figura 04). O “neosugar” foi desenvolvido pela indústria japonesa Meiji Seika Kaisha Ltd, a partir de um processo microbiológico tendo como substrato a sacarose, pela ação da enzima β -fructosiltransferase (Hidaka *et al.*, 1988).

O neosugar pode ser classificado em G e P. O “neosugar G” obtido pela reação enzimática de transfructosilação da sacarose, seguida do processo de descoloração e dessalinização. A composição final deste açúcar é de 35% de glicose e frutose, 10% de sacarose, 55% de frutooligossacarídeos (kestose, GF₂ = 25%, nistose, GF₃ = 25% e 1-fructosilnistose, GF₄ = 5%). O “neosugar P”, produzido a partir da remoção dos monossacarídeos e dissacarídeos, formado por 95% de frutooligossacarídeos (kestose, GF₂ = 45%, nistose, GF₃ = 45% e 1-fructosilnistose, GF₄ = 10%). Comparando o poder adoçante destes dois açúcares, observamos que o grau de doçura fica em torno de 60% e 30%, respectivamente, em relação à sacarose. São bastante estáveis em pH neutro e temperaturas acima de 140⁰C (Hidaka & Hirayama, 1991).

Frutooligossacarídeos (Fos)

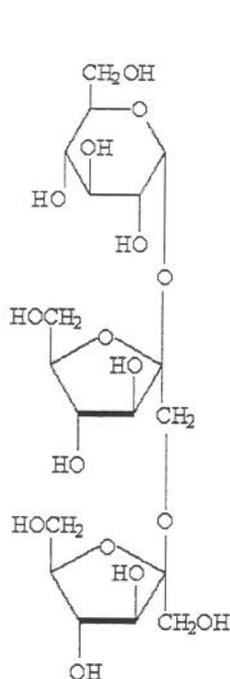
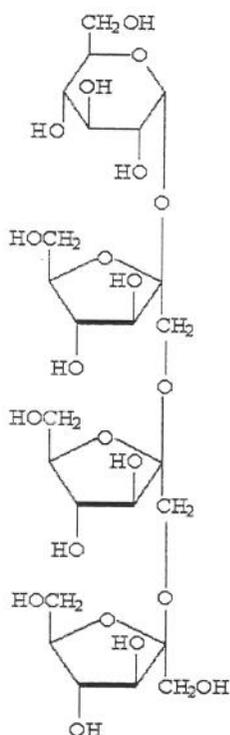
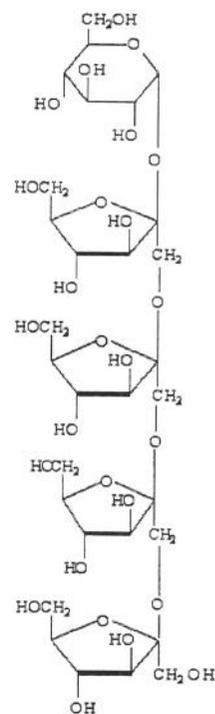
1-Kestose (GF₂)Nistose (GF₃)1-β-Fruto-FuranosilNistose (GF₄)

Figura 04. Frutooligossacarídeos: Kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-β-fructosilnistose (GF₄).

Os frutooligossacarídeos de origem microbiana têm sido particularmente estudados devido aos seus efeitos fisiológicos específicos em humanos, principalmente no estímulo ao crescimento benéfico das bifidobactérias no trato intestinal, alívio da constipação intestinal, indução à diminuição do colesterol do soro sanguíneo, melhorando o estado geral do indivíduo (Hidaka *et al.* 1986).

Ziesenitz *et al.*, (1987) observaram que, em virtude da nistose não ser completamente hidrolisada no intestino delgado, mas ser rapidamente convertida a ácidos pelas bactérias do ceco, seu valor energético para o hospedeiro seria certamente menos do que um tetrassacarídeo que fosse completamente digerido e absorvido no intestino delgado. Uma substância que passa pelo intestino delgado sem ser hidrolisada, mas é fermentada pela flora do ceco e cólon, é uma provável candidata à laxante, por razões osmóticas, portanto, a utilização da nistose como substrato em substituição a sacarose vem sendo sugerido. No processo metabólico não ocorre formação de frutose e glicose para o

organismo, tornando os frutooligossacarídeos um adoçante em potencial para diabéticos. A fermentação anaeróbia de nistose por microorganismo da placa dental e *Streptococcus mutans* NCTC 10449 foi cerca de 50% mais lenta do que a sacarose.

Estudos conduzidos por Spiegel *et al* (1994), e Modler (1994) constataram que apesar dos alimentos naturais conterem frutooligossacarídeos e considerando os hábitos alimentares usuais, torna-se difícil a ingestão da dose diária recomendada de oligossacarídeos, a partir de alimentos naturais, que é de aproximadamente 0,8 g/dia/130 libras de peso corpóreo, nos Estados Unidos. Portanto a ingestão de oligossacarídeos suplementares pode ser benéfica para idosos e pessoas que ocupam cargos estressantes que desejam manter o sistema digestivo saudável (Yun, 1996).

A adição de fatores bifidogênicos na dieta humana, normalmente favorece num aumento na ocorrência e no número de bifidobactérias isoladas do material fecal, sugerindo que a suplementação na dieta deveria ser implementada. Contudo, evidências mais definidas a respeito da eficácia destes compostos são requeridas. O ideal seria que as dietas possuíssem fatores bifidogênicos para estimular crescimento de bifidobactérias que são naturais ao hospedeiro. O consumo médio per capita de inulina na dieta européia varia de 2 a 12 g/dia, com um consumo, na Bélgica este valor fica em torno de 5-8 g/dia e 7-12 g/dia na Espanha (Modler, 1994).

Modler (1994) verificou que a adição de “neosugar” à dieta humana (15g/dia), provocou um acréscimo de 10 vezes na população de bifidobactérias do intestino grosso, bem como a ocorrência de bifidobactérias passou de 87% para 100%. Concomitantemente, houve uma redução de 0,3 unidades no pH intestinal e também um decréscimo na contagem de enterobactéria. Estudos similares realizados por Hidaka *et al* (1991) verificou-se que administrando 8 g/dia de “neosugar” aumentaria a produção de ácidos graxos.

Mckellar & Modler (1989) constataram que a bifidobactéria possui enzimas hidrolíticas conhecidas como inulinase (β -2,1-D-frutano-frutanohidrolase), que hidrolizam os frutooligossacarídeos, ao contrário das enzimas digestivas de humanos e animais. Linhagens das bifidobactérias animais metabolizam a inulina mais efetivamente do que as bifidobactérias de origem humana. As diferenças no metabolismo sugerem que a inulina é incapaz de atingir o sítio das enzimas das bifidobactérias humanas, ou então, um impedimento estérico poderia estar envolvido. Estudos realizados “in vitro” demonstraram

que a *Bifidobacterium longum* tem dificuldade de metabolizar polímeros de cadeia longa, tais como a inulina. *Bifidobacterium adolescentis* metabolizou inulina de forma mais eficaz do que o *Bifidobacterium longum*, mas o *Bifidobacterium thermophilum* apresentou melhor crescimento e atividade de inulinase. *Bifidobacterium infantis* utilizaram cadeias curtas de frutooligossacarídeos, porém são incapazes de metabolizar polímeros de cadeias longas, com grau de polimerização maior que 25.

2.6.3 Mecanismos da enzima

Um dos primeiros trabalhos que se tem conhecimento sobre uma enzima de *Aspergillus niger* que apresentava ação de transfrutossilação, considerou que o processo ocorria em duas etapas. Na primeira etapa, a enzima colidia com a molécula de substrato, formando um complexo frutosil-enzima (FR-E) relativamente estável. Na segunda etapa, o complexo frutosil-enzima (FR-E) se aproxima da molécula do co-substrato ocorrendo a transferência de unidades de frutose ao co-substrato, com a dissociação de novos oligossacarídeos do complexo (Pazur, 1952).

No mecanismo de transferência de frutose, admite-se a existência de dois sítios ativos sobre a β -frutosiltransferase para a sacarose. Um dos sítios agiria como doador e o outro como acceptor de unidades de frutosil. De acordo com o modelo proposto, a frutose seria transferida do sítio doador para a parte da frutose existente na molécula da sacarose para seu sítio acceptor, formando desta maneira kestose (GF₂). Em seguida, os resíduos de frutose provenientes da sacarose doadora seriam transferidos para uma molécula de sacarose acceptora ou para a glucofrutosana (FOS) e não mais para a água. Desta forma, o nucleotídeo atuaria como ponte de ligação entre os dois sítios ativos, agindo como um mecanismo regulador para ativar a enzima. Neste processo haveria dependência apenas do tipo de carboidrato disponível no meio para suprir a energia necessária ao organismo (Gupta & Bhatia, 1980).

A transferência de resíduos frutosil para a sacarose com uma concentração de 50% (w/v), catalisada pela enzima β -frutosiltransferase de *Aspergillus niger* ATCC 20611, favoreceu um aumento na produção de kestose e nistose. Foi constatado que a enzima β -frutosiltransferase em altas concentrações de sacarose favorece a ação de transfrutossilação, onde a conversão para frutooligossacarídeos ocorre rapidamente atingindo um total de 60%

de carboidratos formados após um período de 24 horas. Transcorrido este tempo de incubação, a produção de kestose e 1-frutossilnístose aumentou, confirmando assim o modelo proposto, no qual a produção de frutooligossacarídeos ocorre de uma forma desproporcional ($GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$) (Jung *et al.*, 1989, Duan *et al.*, 1994).

A partir do estudo cinético realizado, verificou-se que além da glicose, que inibe a reação de síntese na produção dos frutooligossacarídeos, a concentração de sacarose também interfere no tipo de ação da enzima, ou seja, em altas concentrações, favorece a ação de transfrutossilação e a baixas concentrações a ação hidrolítica é predominante (Jung *et al.*, 1989).

A eficiência na produção de frutooligossacarídeos está diretamente relacionada com uma alta proporção de U_t/U_h e alta produtividade enzimática apresentada pelos microrganismos produtores da enzima. A partir de dados experimentais de linhagens de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* foi verificado que estes são os microrganismos que melhor apresentam os parâmetros U_t/U_h , sendo mais eficientes na produção de frutooligossacarídeos (Jung *et al.*, 1987; Hirayama *et al.*, 1989; e Hidaka & Hirayama, 1991).

Em relação ao mecanismo de ação da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, verificou-se que a enzima apresentava uma atividade hidrolítica e de transfrutossilação. Nos processos de síntese em altas concentrações de sacarose (50%p/v) verificou-se o favorecimento da produção de oligossacarídeos, identificados como kestose e nístose. A máxima produtividade ocorria com o tempo de 4 a 5 horas de síntese (Santos, 1998).

3. Material e Métodos

3.1. Produção da inulinase

3.1.1. Microrganismo

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* 16045 (laboratório Engenharia de Bioprocessos-DEA-FEA-UNICAMP) foi utilizado para a produção da enzima inulinase.

3.1.2. Manutenção do microrganismo

Periodicamente o microrganismo era repicado em um meio sólido composto de extrato de levedura (3,0g/L), extrato de malte (3,0 g/L), peptona (5,0g/L), glicose (10,0 g/L) e agar (20,0 g/L). Sem ajuste de pH.

3.1.3. Preparo do meio do inóculo

O meio cultivo utilizado para o preparo do inóculo utilizado na etapa da fermentação foi composto de: sacarose (20,0 g/L), extrato de levedura (5,0g/L), K_2HPO_4 (5,0g/L), NH_4Cl (1,5g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,65 g/L) e KCl (1,15g/L) a pH 6,8.

Em frascos Erlenmeyers aletados de 500 mL, foram adicionados 100 mL do meio de cultura utilizado para o inóculo, esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em seguida os frascos foram inoculados com o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Após a inoculação o meio foi incubado a 30°C e 150 rpm em shaker PSYCROTHERM durante um período de 24 horas, tempo satisfatório para o crescimento do microrganismo.

3.1.4. Fermentação

A fermentação para a produção da inulinase foi conduzida sob condições ótimas definidas por Kalil (2001), conforme Tabela 04.

Tabela 04: Composição do meio de cultivo para produção da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

Meio de Cultivo	
Composição	Concentração (g/ L)
Sacarose	14
Extrato de Levedura	10
Peptona	20
K_2HPO_4	1
pH	3,5
T	30°C

3.2 Caracterização da enzima

Para a caracterização da enzima em invertase e inulinase, foi determinada a atividade enzimática utilizando o método colorimétrico DNS (Miller, 1959). Em seguida, foi calculada a razão de S/I, onde S corresponde a unidades totais de atividade de invertase e I corresponde a unidades totais de atividade de inulinase. Para valores de S/I maiores do que 50 a enzima é caracterizada como invertase, e para valores abaixo de 50 a enzima é caracterizada como inulinase (Vandamme & Derycke, 1983).

$$\frac{\text{Sacarose}}{\text{Inulina}} \left(\frac{S}{I} \right) = \frac{\text{Unidades totais de atividade de invertase}}{\text{Unidades totais de atividade de inulinase}}$$

3.3. Purificação da enzima

3.3.1. Recuperação com etanol

O caldo fermentado foi centrifugado a 10000g por 15 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada SORVALL® RC26 PLUS. O sobrenadante foi utilizado para a recuperação da enzima, descartando o precipitado.

Inicialmente, determinou-se a atividade enzimática do sobrenadante para o cálculo do rendimento. A recuperação ou precipitação da enzima foi realizada adicionando etanol até atingir a concentração de 70%. Todo o processo foi realizado a baixa temperatura (banho de gelo), sob agitação branda de maneira tal que não ocorresse uma desnaturação da enzima (Whitaker, 1996).

Após adição do etanol, a solução foi centrifugada a 10000g por 15 minutos a 5°C, em uma centrífuga refrigerada SORVALL® RC26 PLUS. O precipitado contendo a enzima foi ressuspensionado em tampão fosfato 0,05 M, pH 5,2. A atividade enzimática foi determinada para o cálculo do rendimento.

3.3.2. Estudo da capacidade de adsorção/dessorção da enzima pela resina

O estudo da capacidade de adsorção/dessorção e seleção da resina foi realizado com a inulinase obtida de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Nos ensaios com o pH 4,0 e 4,5 foi utilizada a resina SP-Sepharose FF de troca catiônica, onde a eluição foi realizada com tampão acetato de sódio 0,1M com gradiente linear salino de NaCl 1 M em tampão acetato de sódio 0,1 M. Para os testes com pH na faixa de 5,5-7,5 a resina utilizada foi Q-Sepharose FF de troca aniônica. A eluição da inulinase foi realizada com tampão fosfato de

sódio 0,05 M com gradiente salino linear de NaCl 1 M em tampão fosfato de sódio 0,05 M. Em ambas as resinas foi injetado 10 mL de amostra, e durante a eluição foram coletadas frações de 10 mL utilizando um coletor FRAC 100 (Pharmacia) para o cálculo da atividade enzimática, teor de proteínas, atividade específica, fator de purificação, rendimento e caracterização da enzima (S/I).

3.3.3. Estudo da influência do pH (5,5-7,5) na purificação da enzima

Nesta etapa, foram realizados estudos de adsorção/dessorção da enzima em diferentes valores de pH acima do ponto isoelétrico (4,7-5,2), já que a enzima não apresentou uma boa adsorção/dessorção em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico. Foi utilizada uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF (Pharmacia). Foram injetados 10 mL de amostra com o pH da enzima ajustado para o valor desejado. A eluição da enzima foi realizada com tampão fosfato de sódio 0,05M e um gradiente linear salino de NaCl 1 M em tampão fosfato de sódio 0,05 M. O pH das soluções de eluição foi ajustado para o valor desejado. Antes da injeção da amostra, a coluna foi lavada com uma solução de tampão fosfato de sódio 0,05 M, num volume equivalente a 5 vezes o volume da coluna, com o objetivo de equilibrar a coluna.

Durante a eluição da enzima foram coletadas frações de 10,0 mL no coletor de frações FRAC-100, para o cálculo da atividade enzimática, teor de proteína, atividade específica, fator de purificação, rendimento e caracterização da enzima (S/I).

3.4. Caracterização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* livre e imobilizada em alginato de cálcio

3.4.1. Eletroforese da inulinase em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi conduzida à temperatura ambiente (25°C) com uma voltagem constante de 80V por quatro horas, utilizando o sistema vertical Protean II-Bio Rd, seguindo o procedimento de Leaemli (1970).

As amostras (caldo bruto e enzima purificada) foram submetidas à desnaturação a temperatura 100°C por cinco minutos em solução tampão de pH 6,8 (β -mercaptaetanol, Tris-HCl 0,5M, glicina, SDS (10%) e azul de bromofenol). Na corrida foi utilizado o tampão (Tris-0,0025M, glicina-0,192M e SDS-0,1%) a pH 8,3. Os géis consistiam em: gel

de empilhamento 4,0% (acrilamida, Tris-HCl pH 8,8, água e TEMED) e gel de corrida 6,0% (acrilamida, Tris-HCl pH 6,8, água e TEMED).

A coloração do gel foi realizada utilizando Comassie Brilliant Blue G250 (Blakesley & Boezi, 1977). Para determinação do peso molecular foi utilizado o Kit de calibração de baixo peso molecular da Pharmacia (LMW Kit calibration) contendo as seguintes proteínas: fosforilase B (94 KDa), albumina (67 KDa), ovoalbumina (43 KDa), amidrase carbonica (30 KDa), inibidor de tripsina (20,1 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa).

3.4.2. Imobilização da inulinase em alginato de cálcio

Inicialmente foi pesado 1,5g de alginato de sódio e 40g de água destilada. Em seguida a mistura foi aquecida até atingir 80°C aproximadamente, para que ocorresse a dissolução total do alginato. Finalizada a dissolução do alginato, o gel foi resfriado a 40°C, e em seguida adicionado 10mL da solução enzimática. Obtendo-se um gel com uma concentração de 3,5% de alginato no final do processo

Para formação das esferas o gel de alginato foi bombeado lentamente, utilizando uma bomba peristáltica (Modelo: Masterflex acoplada com uma mangueira tamanho 13), sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,05M em tampão acetato 0,1M mantida sob agitação (Figura 05).

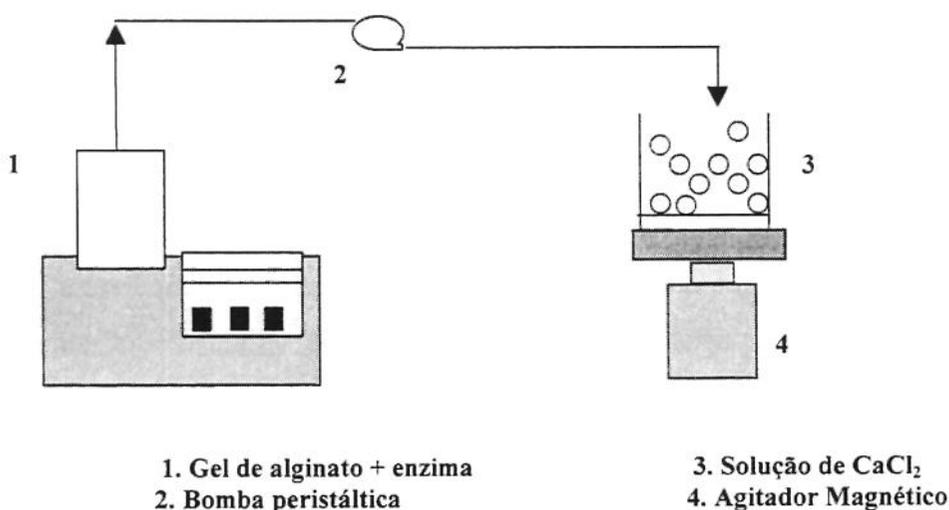


Figura 05. Esquema do processo de imobilização de inulinase em alginato de cálcio.

3.4.3. Influência da concentração de CaCl_2 na imobilização da inulinase

O preparo do gel foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.2 diferenciando apenas no preparo das esferas de alginato de cálcio. Para o preparo das esferas, o gel de alginato foi gotejado na solução de CaCl_2 , em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,15 e 0,2 M). Após a formação das esferas de alginato de cálcio, as esferas contendo a enzima encapsulada foram deixadas em repouso na geladeira. A atividade enzimática foi determinada em intervalos de tempos pré-determinados. O estudo da estabilidade foi realizado na temperatura de 50°C.

3.4.4. Estabilidade com o tempo

O caldo enzimático e a enzima purificada livre foram congelados e a atividade enzimática determinada em intervalos de tempo pré-determinados, utilizando o método colorimétrico DNS (Miller, 1959).

3.4.5. Efeito do pH na atividade da inulinase

As enzimas purificada livre e imobilizada foram incubadas em tampão acetato 0,1 M a diferentes valores de pH 3,6-5,6. Em seguida foram determinadas as atividades enzimáticas.

3.4.6 Estabilidade com o pH

As enzimas purificada livre e imobilizada foram incubadas em diferentes valores de pH (3,6-5,6) e a atividade enzimática foi determinada em intervalos de tempos pré-determinados utilizando-se o método colorimétrico DNS (Miller, 1959). O estudo foi interrompido quando verificou-se a perda da atividade enzimática.

3.4.7. Efeito da Temperatura na atividade da inulinase

As enzimas purificada livre e imobilizada foram incubadas em tampão acetato 0,1 M, no melhor valor de pH obtido, de acordo com o item 3.4.5, em diferentes temperaturas (20-70°C) e determinada à atividade enzimática.

3.4.8. Estabilidade com a temperatura

A estabilidade da inulinase purificada livre e imobilizada foi testada incubando a enzima em tampão acetato 0,1 M, com o melhor pH obtido, de acordo com o item 3.4.5, em

diferentes temperaturas (40-55°C), e a atividade enzimática determinada em intervalos de tempos pré-determinados. O estudo foi interrompido quando verificou-se a perda da atividade enzimática.

3.4.9. Microscopia eletrônica de varredura

As esferas de alginato com e sem enzima foram submetidas à secagem a baixa temperatura e em seguida fraturadas e mantidas em dessecadores. Após as amostras estarem totalmente secas, elas foram fixadas em suportes (stub) utilizando-se fitas de cobre condutivas recobertas com ouro (SPUTTER COATER BALZERS – SCD 050) a 25°C 2.10⁵ torr durante 180 segundos. As amostras recobertas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL SCANNING – JSM 5800 LV) a 10 KV.

3.5. Estudo cinético para inulinase nas formas livre e imobilizada

3.5.1. Influência da concentração inicial de sacarose na inulinase livre e imobilizada

Foram determinadas as velocidades iniciais de reação, em diferentes concentrações de sacarose (0,5-700 g/L). Considerando um modelo cinético de inibição pelo substrato, construiu-se um gráfico na forma linearizada de Lineweaver-Burk com os dados experimentais, para as faixas de baixas e altas concentrações de substrato. Com as taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato foram determinadas as constantes cinéticas aparentes (K_m , V_{max} e K_i).

3.5.2. Influência das concentrações de glicose e frutose na velocidade inicial da inulinase livre e purificada

Os experimentos com glicose e frutose foram realizados separadamente. O efeito inibidor de glicose e frutose foi determinado numa faixa de concentração de sacarose onde não fosse verificada a inibição pelo substrato. As concentrações de glicose e frutose estudadas foram 5, 10 e 15 g/L, respectivamente. E para cada uma destas concentrações foi variada a concentração de sacarose (5, 10 e 15 g/L).

Em seguida foram determinadas as velocidades iniciais em função da concentração inicial de sacarose, a diferentes concentrações de glicose e de frutose e analisadas através de gráficos de Lineweaver-Burk para caracterização do tipo de inibição e determinação dos parâmetros cinéticos.

Também foi estudada a influência da frutose e glicose (25, 50 e 75 g/L), na atividade e na síntese de oligossacarídeos, sendo que para cada uma destas foi utilizada sacarose numa faixa de concentração onde é verificada a inibição pelo substrato. Todas as análises foram realizadas em um sistema de cromatografia de troca de íons (HPLC-PAD).

3.6. Síntese de oligossacarídeos

Na síntese foi utilizado um micro-reator encamisado (6,5 x 3,5 cm). No reator foram adicionados 16,0 mL de solução de sacarose a 50% (w/v) com 2,0 mL da solução enzimática purificada ou imobilizada, perfazendo um atividade final de 6 UI/mL. Todas as sínteses foram realizadas em um tempo de 12 horas e 50°C.

3.6.1. Produção de oligossacarídeos

No estudo das melhores condições para produção de frutooligossacarídeos, foi utilizada a técnica de planejamento experimental, conforme descrito no item 3.6.1.1.

3.6.1.1. Planejamento experimental

O planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta são preferidos em relação a análise univariável ao permitirem considerar simultaneamente vários fatores em diferentes níveis e as interações entre eles, reduzindo o número de experimentos. Técnicas de inferência estatística podem ser aplicadas para estimar a importância de fatores individuais, a sensibilidade da resposta para cada fator e a magnitude do erro experimental.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isso implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Ao analisar os resultados dos efeitos e verificar que o efeito de uma variável é dependente do nível da outra, diz-se que as duas variáveis interagem e desta forma calcula-se o efeito de interação.

Esta técnica é utilizada quando deseja-se estudar com muitas variáveis e se desconhece a importância de cada uma delas no processo. O fato de não escolher de imediato o planejamento fatorial completo se deve principalmente ao número de variáveis. Assim, o planejamento fatorial fracionário pode trabalhar com um número reduzido de experimentos, devendo-se levar em consideração o número de efeitos de interação de

ordem alta aumenta consideravelmente com o número de fatores. Muitas vezes esses efeitos têm valores pequenos e são destituídos de qualquer importância prática. Como analogia da expansão em série de uma função, os efeitos principais tendem a ser maiores que as interações de três fatores, e assim por diante. Essa tendência naturalmente se acentua para efeitos de ordem mais alta. Como esses efeitos em geral não são significativos não há necessidade de fazer todos os ensaios de um planejamento só para determiná-los.

Quando o número de variáveis aumenta, crescem as chances de que uma ou mais variáveis não afetem significativamente a resposta. Se os efeitos dessas variáveis não precisam ser determinados, não é necessário fazer todos os ensaios do fatorial completo.

Por outro lado, dificilmente se conhece a importância de cada variável no processo. Não se pode excluir de uma forma totalmente arbitrária fatores potencialmente importantes, sendo que é conveniente incluir no estudo, nesse estágio, o maior número possível de variáveis. Por este motivo escolhe-se o planejamento fracionário ao invés o planejamento fatorial completo.

Neste trabalho utilizou-se inicialmente o planejamento fracionário para verificar quais as variáveis que apresentam efeitos significativos na produção dos frutooligossacarídeos. Assim, estudou-se a influência da temperatura, pH, concentração de sacarose e concentração de enzimas. A Tabela 05 mostra a tabela de níveis e a faixa de valores utilizadas neste estudo e a Tabela 06 a matriz de planejamento.

Tabela 05: Tabela de níveis

	-1	0	+1
pH	5,0	5,5	6,0
T (°C)	40	45	50
C _s (g/L)	450	550	650
C _E (g/L)	4	5	6

C_s= concentração de sacarose, C_E= concentração de enzimas.

Tabela 06: Matriz de planejamento fracionário 2⁴-1

Ensaio	Valores codificados				Valores reais			
	pH	T(°C)	C _s (g/L)	C _E (g/L)	pH	T(°C)	C _s (g/L)	C _E (g/L)
01	-1	-1	-1	-1	5,0	40	450	4
02	+1	-1	-1	+1	6,0	40	450	6
03	-1	+1	-1	+1	5,0	50	450	6
04	+1	+1	-1	-1	6,0	50	450	4
05	-1	-1	+1	+1	5,0	40	650	6
06	+1	-1	+1	-1	6,0	40	650	4
07	-1	+1	+1	-1	5,0	50	650	4
08	+1	+1	+1	+1	6,0	50	650	6
09	0	0	0	0	5,5	45	550	5
10	0	0	0	0	5,5	45	550	5
11	0	0	0	0	5,5	45	550	5

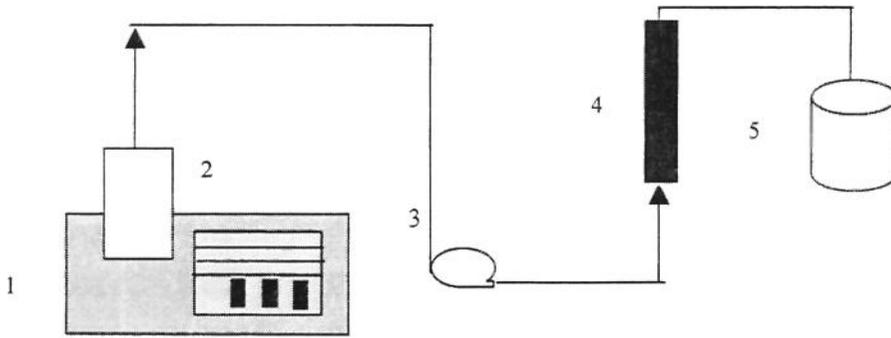
3.6.2. Estudo da influência de aceptores (maltose, lactose, glicose e frutose) na síntese de oligossacarídeos.

O estudo da influência dos aceptores foi realizado fixando-se a concentração de sacarose em 500g/L e variando-se a concentração do acceptor em 20 e 100g/L (maltose, lactose) e 25 e 75g/L (glicose e frutose). A identificação e quantificação das amostras foram realizadas utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de íons (HPLC-PAD).

3.7. Síntese de oligossacarídeos com inulinase imobilizada

Para a síntese de oligossacarídeos, a enzima imobilizada em alginato de cálcio foi empacotada em coluna encamisada com controle de temperatura (50°C). A coluna foi alimentada com solução de sacarose a 45% (p/v) a pH 6,0. Durante a alimentação foram estudados vários tempos de residência, variando-se a vazão de alimentação (Figura 06). Os produtos de síntese foram identificados e quantificados através de um sistema de cromatografia de íons (HPLC-PAD) equipado com detector de pulso amperométrico com uma coluna CarboPac PA100 (240x4mm) e coluna de proteção CarboPac PA100 (50x4mm). Para eluição dos carboidratos utilizou-se um gradiente composto de duas

soluções: a) 100mM solução de hidróxido e b)100mM de hidróxido de sódio contendo 500mM de acetato de sódio. Um tempo de corrida de 35 minutos com fluxo de 1mL/min.



- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. banho termostático | 4. coluna encamisada contendo inulinase imobilizada |
| 2. solução de sacarose 50%, a 50°C | 5. coletor de amostra |
| 3. bomba peristáltica | |

Figura 06. Esquema da síntese de oligossacarídeos com inulinase imobilizada em alginato de cálcio.

3.8. Metodologia Analítica

3.8.1. Atividade enzimática

A dosagem da atividade enzimática foi realizada pelo método de velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. O método consiste na utilização de um micro-reator encamisado sob agitação e controle de temperatura com auxílio de um banho termostático TECNAL TE-184. No reator adicionou-se 5,0 mL da solução de sacarose a 0,06 M, 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 5,2, 1,5 mL de água destilada e 1,0 mL da amostra convenientemente diluída. O mesmo procedimento foi efetuado substituindo a solução de sacarose por inulina, para determinar a atividade de inulinase. As reações foram realizadas a 50°C.

Foram retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos de tempo de 1, 3, 5, 7 e 9 minutos para a sacarose e 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a inulinase e analisou-se os açúcares redutores totais (DNS, Miller, 1959). Construiu-se uma curva de absorbância (540nm) em função do tempo e com auxílio da curva de calibração de açúcar redutor foram determinadas as atividades. A atividade de invertase foi definida como a quantidade de

enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de sacarose por minuto. A atividade da inulinase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de frutose por minuto sob condições de análise.

3.8.2. Determinação de proteínas

Na dosagem de proteínas foi utilizado o método de Lowry (Lowry, 1951).

3.8.3. Purificação por cromatografia de troca iônica - FPLC

O sistema FPLC consiste dos seguintes equipamentos

- Mixer (para gradientes de soluções)
- Controlador de cromatografia líquida LCC – 501 Plus
- Duas bombas P-500 para injeção dos eluentes
- Uma bomba P-1 para injeção de amostra
- Um monitor UV para medição do perfil cromatográfico
- Coletor de frações FRAC-100
- Coluna cromatográfica de troca iônica
- Loop de 150 mL para injeção das amostras

A coluna foi utilizada nas seguintes condições padrões

- Pressão 0,3 Mpa
- Temperatura 17°C
- Fluxo 1,0 mL

Preparo da resina

A resina mantida em etanol 20% (p/v) foi lavada com tampão fosfato de sódio 0,05 M para equilibrar a coluna. Foi necessária a lavagem da resina com solução de NaCl 1 M, com o objetivo de recarregar a resina com grupos ativos. O procedimento utilizado está de acordo com o manual da coluna (Pharmacia).

Fase móvel

Para a fase móvel foi utilizado um gradiente salino de NaCl 1 M em tampão fosfato de sódio 0,05 M e tampão fosfato de sódio 0,05 M para a coluna Q-sepharose FF de troca

aniônica (faixa de pH 5,5-7,5) e tampão acetato de sódio 0,02M e NaCl 1 M em tampão acetato de sódio 0,02 M para coluna SP-Sepharose FF de troca catiônica (pH 4,0 e 4,5).

As soluções foram preparadas com água MilliQ, filtrada em filtro Millipore 0,45 µm e em seguida degaseificada durante 30 min em banho de ultrassom (Eurosonic modelo SX-20) .

Preparo da coluna para injeção da amostra

O caldo bruto isento de células foi filtrado em filtro Millipore de 0,45 µm. Antes de injetar a amostra, a coluna foi lavada com tampão acetato de sódio 0,01 M para SP-Sepharose FF e tampão fosfato de sódio 0,05 M para Q-sepharose FF, fluxo de 2,0 mL/min num volume total de 40,0 mL, correspondendo a duas vezes o volume da coluna. A coluna foi equilibrada com um volume de 100 mL, correspondendo a 5 vezes o volume da coluna. O pH das soluções foi ajustado para o valor desejado. A amostra foi injetada num fluxo de 0,5 mL/min. A eluição da enzima foi realizada com tampão fosfato de sódio 0,05 M ou acetato de sódio 0,01 M, seguido de um gradiente salino linear ascendente 0-90% de NaCl 1 M em tampão acetato de sódio 0,01 M para os testes com pH 4,0 e 4,5 e 0-70% de NaCl 1 M em tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 5,5-7,5, com um fluxo de 1,0 mL/min. O processo foi monitorado a 280 nm. Durante a eluição da enzima, foram coletadas frações no coletor de frações FRAC-100. Nas frações foram determinadas a atividade enzimática e o teor de proteína para o cálculo da atividade específica, fator purificação, rendimento e caracterização da enzima.

Preparo e injeção das amostras

Nesta etapa utilizou-se o caldo bruto livre de células. O caldo bruto foi filtrado em filtro Millipore 0,45 µm, em seguida a amostra foi injetada no sistema FPLC.

Identificação das amostras

Os cromatogramas foram analisados com o auxílio do software de aquisição e processamento de dados FPLC director.

3.8.4. Identificação e quantificação de carboidratos por cromatografia de íons (HPLC-PAD)

Detector eletroquímico: ED40

- Sistema de bombas: GP50

- Detector de pulso amperométrico: eletrodo de ouro
- Software para aquisição e processamento de dados além de geração de relatório-PEAKNET
- Pré-coluna e coluna CarboPac PA100

A pré-coluna e a coluna foram conectadas em série seguindo as condições padrão de uso.

Preparo da fase móvel

O critério básico para análise dos açúcares em HPLC-PAD é a solubilidade da fase móvel. A fase móvel utilizada foi: NaOH 100 mM, acetato de sódio 500 mM em NaOH 100 mM e água ultra pura obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus (18 Ω). A fase móvel foi degaseificada durante 5 minutos com nitrogênio. O fluxo do eluente foi de 1,0 mL/min.

Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foram utilizados padrões de kestose, nistose e fructosilnistose (Wako Dako Industries, Ltd.), glicose, frutose e sacarose da Merck. Foram preparadas as soluções contendo os seis padrões, numa faixa de concentrações de 1-100 mg/L. A integração dos picos para cada padrão foi otimizada com base no melhor coeficiente de regressão obtido. Utilizando-se o software PEAKNET de aquisição de dados obteve-se uma curva padrão para quantificação das amostras.

Preparo das amostras

Foram retiradas amostras de 1,0 mL em intervalos de tempos regulares durante 12 horas. As amostras foram diluídas convenientemente para ficar numa faixa de concentrações de 10-100 mg/L. Para diluição das amostras utilizou-se um diluidor (Dilutor-Dispenser 402, Gilson).

Injeção das amostras no sistema HPLC-PAD

As amostras foram injetadas em uma coluna CarboPac PA100, utilizando um injetor automático (SpectoSERIES AS 100), nas seguintes condições de operação.

- Temperatura ambiente: 22-24⁰C
- Detector de pulso amperométrico: eletrodo de ouro
- Volume de injeção: 25 μ L
- Fluxo do eluente: 1,0 mL/min

• Fase móvel: NaOH 100 mM, acetato de sódio 500mM em NaOH 100 mM e água ultra-pura (MilliQ).

Identificação e quantificação das amostras

As amostras (25 μ L) foram injetadas no sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, USA), consistindo de uma bomba gradiente GP50 com um detector eletroquímico ED-40, operando na forma de pulso amperométrico, e um eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência Ag-AgCl. O programa de detecção amperométrica utilizado para medida dos carboidratos na amostra está descrito na Tabela 07. Este sistema está acoplado a um computador usando um programa de aquisição de dados Peak Net 5.1. Os produtos foram analisados usando uma coluna de troca de aniônica CarboPac PA 100 (250x4 mm) e uma pré-coluna CarboPac PA100 (50x4mm). O gradiente de eluição utilizado consistiu de dois solventes: (A) uma solução de NaOH 100 mM e (B) uma solução de NaOH 100 mM contendo 500 mM de acetato de sódio. O tempo total de corrida foi de 35 minutos. A eluição iniciou com 100% de A por 10 minutos a um fluxo de 1,0 mL/min, seguido de um gradiente linear de 0-38% do solvente B combinado com o solvente A por 12 minutos. Em seguida a coluna foi lavada por 5 minutos com 100% do solvente B e equilibrada com 100% de A por 5 minutos.

A identificação e quantificação foram realizadas usando padrões comerciais como descrito anteriormente.

Tabela 07: Condições da célula de detecção amperométrica (PAD)

Waveform		Tempo de integração	
Tempo (seg)	Potencial (V)	Início (seg)	Término (seg)
0,00	+0,1	0,2	0,40
0,20	+0,1		
0,40	+0,1		
0,41	-2,0		
0,42	-2,0		
0,43	+0,6		
0,44	-0,1		
0,50	-0,1		

4. Resultados e Discussão

4.1. Produção da enzima

Na primeira etapa deste trabalho foi realizado um estudo, com dois meios de cultivo, para produção da inulinase diferenciando apenas na concentração dos componentes composição(Tabela 08). O objetivo foi verificar diferenças no modo de atuação da enzima durante a síntese dos frutooligossacarídeos (FOS) realizada conforme o item 3.6. Os resultados das sínteses de frutooligossacarídeos estão apresentados nas Figuras 07 e 08.

Tabela 08. Composição do meio de cultivo para produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

Meio 01	
Composição	Concentração (g/L)
Sacarose	30
Extrato de Levedura	10
Peptona	20
K ₂ HPO ₄	5
pH	3,5
T	30°C

Meio 02	
Composição	Concentração (g/L)
Sacarose	14
Extrato de Levedura	10
Peptona	20
K ₂ HPO ₄	1
pH	3,5
T	30°C

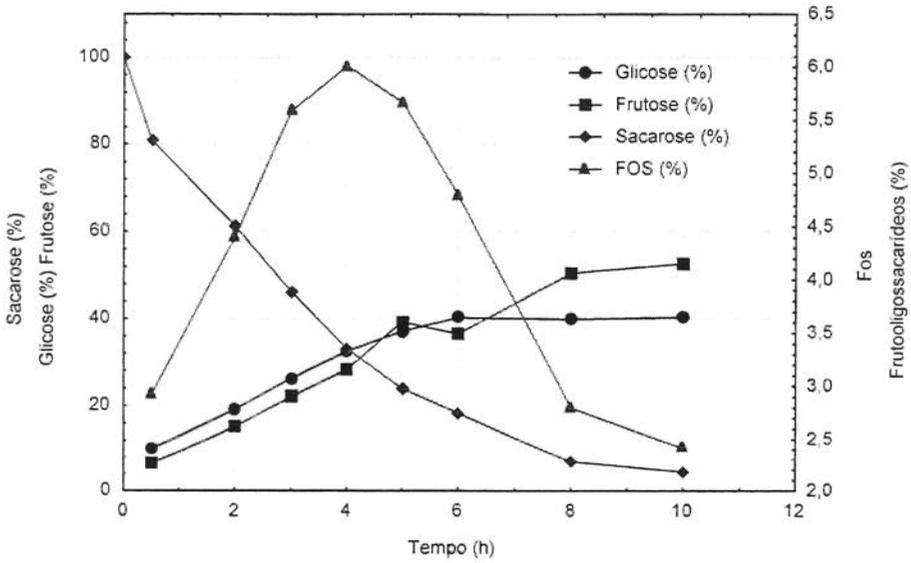


Figura 07. Síntese de frutooligossacarídeos com inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* obtida por fermentação em meio de 30 g/L de sacarose.

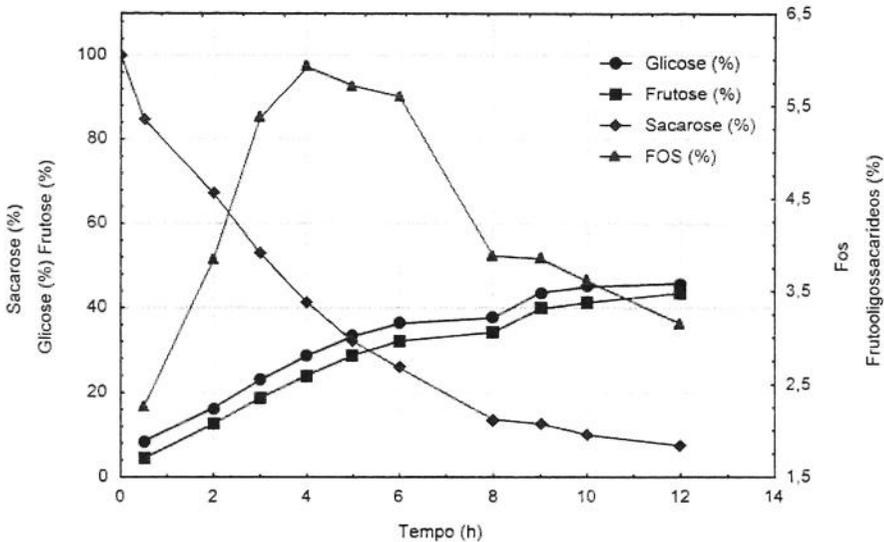


Figura 08. Síntese de frutooligossacarídeos com inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* obtida por fermentação em meio de 14 g/L de sacarose.

Em relação à síntese de frutooligossacarídeos (Figuras 07 e 08), pode-se verificar que não houve diferenças significativas na produção. De acordo com os resultados apresentados, a máxima conversão de frutooligossacarídeos obtida tanto para o meio 01 quanto para o meio 02 foi de aproximadamente 6,0% com 4 horas de síntese. Porém, o

mesmo não foi observado em relação à atividade enzimática, que apresentou uma diferença de aproximadamente 50% entre os meios estudados (Tabela 09 e Figura 09), o que nos levou a realizar um estudo mais detalhado da produção desta enzima com o meio 01, utilizando a técnica de planejamento experimental e análise de superfície e resposta, variando-se o pH inicial e a temperatura das fermentações.

Tabela 09. Resultados da atividade da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* no caldo fermentado em diferentes meios de fermentação.

tempo (h)	Atividade Enzimática (UI/mL)	
	Meio 01	Meio 02
0	0,0	0,0
10	26,07	27,34
24	130,07	63,00
29	135,15	60,15
34	139,72	61,73
48	155,98	73,47
58	159,54	76,47
74	176,56	89,93

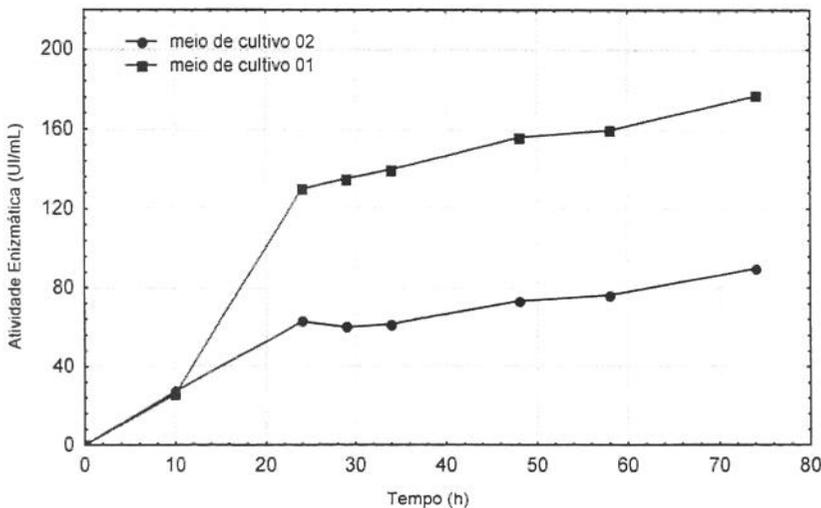


Figura 09. Evolução da atividade enzimática obtida por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* para o meio de fermentação 1 e 2.

A inulinase foi produzida em frascos agitados durante 72 horas de fermentação a diferentes valores de pH e temperatura (Tabela 10). O meio de fermentação foi composto de sacarose 30 g/L, extrato de levedura 20 g/L, peptona 20 g/L e K₂HPO₄ 5 g/L, que corresponde ao meio que apresentou uma maior atividade enzimática. As amostras foram retiradas em intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados da atividade enzimática observada, atividade enzimática predita pelo modelo e o erro padrão estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 10. Valores reais e codificados usados no planejamento fatorial.

Variáveis	- α	-1	0	+1	+ α
pH	2,8	3,0	3,4	3,8	4,0
Temperatura (°C)	26	27	30	33	34

$\alpha=1,41$

Tabela 11. Planejamento experimental da atividade enzimática após 72 horas de fermentação.

	pH	T(°C)	pH	T(°C)	UI/mL (**) (observada)	UI/mL (**) (Predita)	Erro Padrão (%)
1	-1	-1	3,0	27	268,5	245,16	8,72
2	+1	-1	3,8	27	256,9	215,02	16,32
3	-1	+1	3,0	33	110,5	107,10	3,08
4	+1	+1	3,8	33	173,8	151,98	12,60
5	- α	0	2,8	30	89,2	101,33	-13,53
6	+ α	0	4,0	30	107,4	151,59	-41,96
7	0	- α	3,4	26	268,3	305,21	-13,73
8	0	+ α	3,4	34	163,9	171,15	-4,40
9*	0	0	3,4	30	247,7	238,18	3,85
10*	0	0	3,4	30	241,6	238,18	1,43
11*	0	0	3,4	30	227,0	238,18	-4,89

$\alpha=2^{n/4}=\pm 1,41$; n=número de variáveis, * = ponto central, (**) = atividade enzimática em sacarose

Analisando os resultados da Tabela 11, podemos verificar que os melhores resultados foram obtidos com os experimentos 01 (pH 3,0 e T=27°C) e 07 (pH 3,4 e T=26°C). Os altos valores de atividade enzimática foram alcançados quando a temperatura decresceu do nível 1 (110,5 UI/mL) para -1 (268,5 UI/mL).

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para atividade inulinase.

Fator	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	41480,4	4	10370,1	9,5	4,53
Residual	6521,5	6	1086,9		
Falta de ajuste	6296,4	4			
Erro Puro	225,1	2			
Total	48001,93	10			

Coefficiente de regressão: $R^2 = 0,86$; $F_{0,95;2;11} = 4,53$

Tabela 12 mostra a análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática. O valor do teste F calculado neste modelo reduzido é maior do que o F tabelado, que significa que o modelo pode ser usado para verificar as tendências da produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. A partir do modelo (Equação 10), construiu-se a superfície de resposta para produção de inulinase como uma função da temperatura e pH (Figura 10). Pode-se verificar que tanto a temperatura quanto o pH influenciam na atividade enzimática. Pela análise da superfície de resposta, pode-se verificar que o pH favorece a atividade enzimática, sendo que a enzima apresentou um ótimo no pH 3,4. Em relação à temperatura verifica-se que com o aumento da temperatura a atividade enzimática diminui significativamente.

$$(UI/mL) = -1913,22 + 2020,95 \text{ pH} - 364,8 \text{ pH}^2 - 69,92 \text{ T} + 15,63 \text{ T.pH} \quad (10)$$

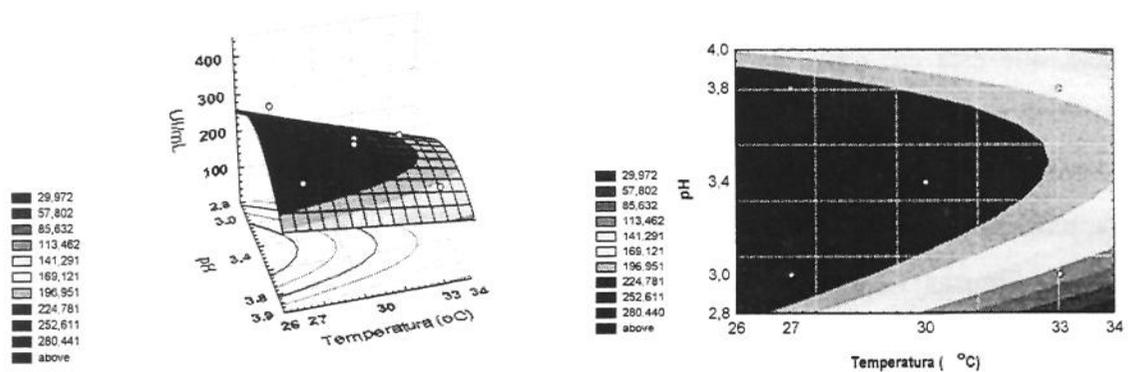


Figura 10. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da temperatura e pH.

Como o pH 3,4 nos resultados do planejamento foi o valor que apresentou uma máxima atividade (Figura 10), decidiu-se realizar mais dois testes variando-se apenas a temperatura (20 e 23°C). A partir dos resultados apresentados na Figura 11, verifica-se que a melhor temperatura foi de 23°C com uma atividade de 301,75UI/mL. Para a temperatura de 20°C a atividade foi de 204 UI/mL após 48 horas de fermentação, com 72 horas verificou-se o decréscimo da atividade para 193,68 UI/mL.

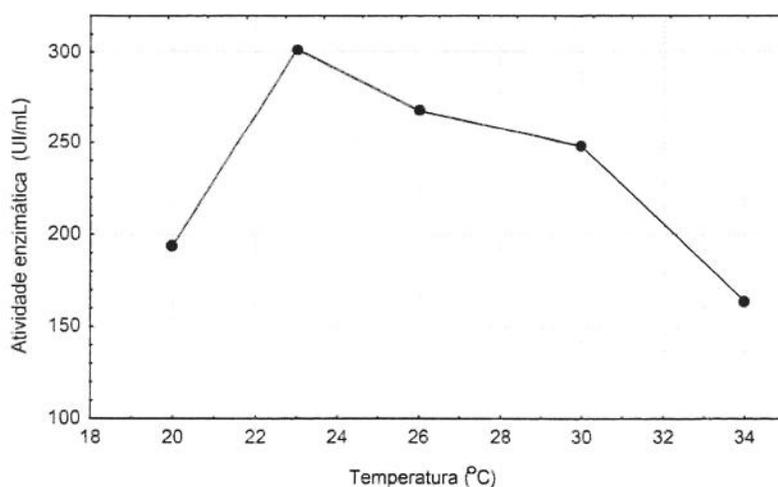


Figura 11. Produção da inulinase por fermentação a pH 3,4 e a diferentes temperaturas.

4.2. Purificação da enzima por FPLC

4.2.1. Testes preliminares para purificação da enzima a diferentes valores de pH

O estudo do melhor pH para adsorção/dessorção da enzima por cromatografia de troca iônica foi realizado utilizando dois tipos de resinas: catiônica (SP-Sepharose FF) e aniônica (Q-Sepharose FF) e com valores de pH abaixo e acima do ponto isoelétrico da inulinase, que está em torno de 4,5 (Costa, 1986). No valor abaixo do ponto isoelétrico utilizou-se a resina de troca catiônica. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,02 M e a eluição da amostra foi realizada com tampão acetato de sódio 0,02 M e um gradiente salino de NaCl 1M em tampão acetato de sódio 0,02 M.

Nas Figuras 12 e 13 estão apresentados o perfis cromatográficos da eluição da enzima a pH 4,0 e 4,5, respectivamente. De acordo com as figuras pode-se verificar que a enzima não foi eluída, pois nas frações coletadas não foi detectada atividade em sacarose e nem em inulina. Em relação aos resultados obtidos neste trabalho para a resina SP-

Sepharose FF, pode-se verificar que não ocorre uma adsorção satisfatória quando comparado aos resultados encontrados por Kalil (2001), que trabalhando com coluna de troca catiônica STREALINE™ SP para purificação da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* verificou que o pH 4,1 foi mais favorável, obtendo uma recuperação de 74% e um fator de purificação de 10,4 vezes.

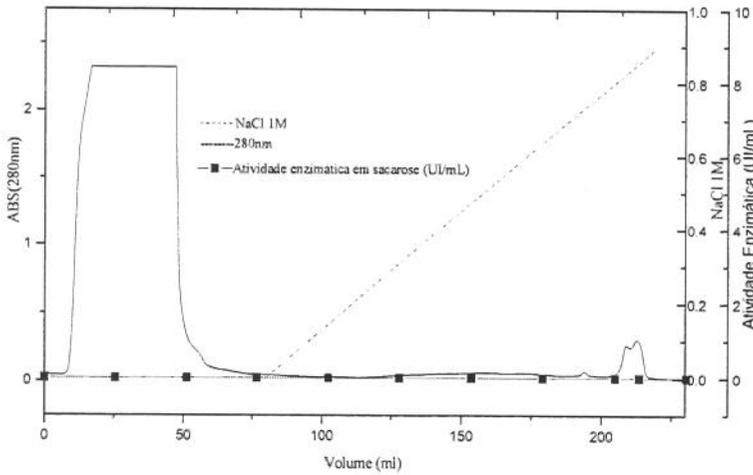


Figura 12. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca catiônica SP-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão acetato de sódio 0,02M a pH 4,0.

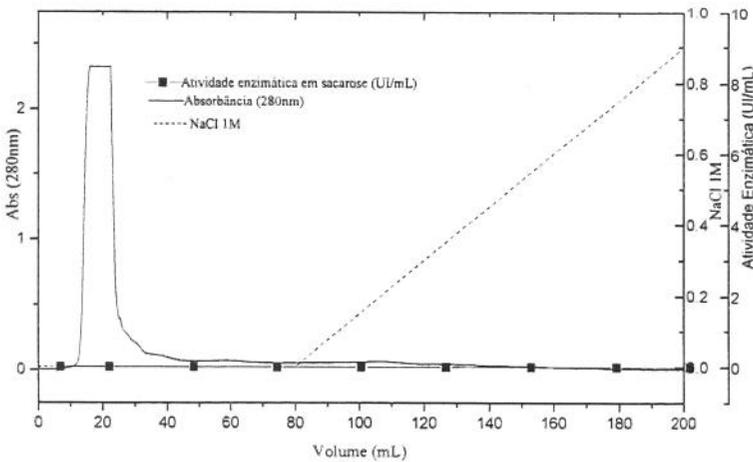


Figura 13. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca catiônica SP-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão acetato de sódio 0,02M a pH4,5.

Assim, tendo como base os resultados obtidos com a coluna SP-Sepharose FF, foi realizado um novo teste com o pH 6,5, utilizando a resina de troca aniônica Q-Sepharose

FF, com o objetivo de analisar o comportamento da enzima neste tipo de resina antes de iniciar o estudo das melhores condições para purificação da inulinase. A eluição da amostra foi realizada em tampão fosfato de sódio 0,05 M a pH 6,5 e um gradiente salino ascendente com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 6,5. A escolha desta condição foi baseada em trabalhos anteriores realizados com esta enzima (Santos, 1998). A enzima foi eluída numa concentração de 0,2 M de NaCl com um rendimento de 47,93%. Na Figura 14 está demonstrado o perfil cromatográfico da purificação em pH 6,5.

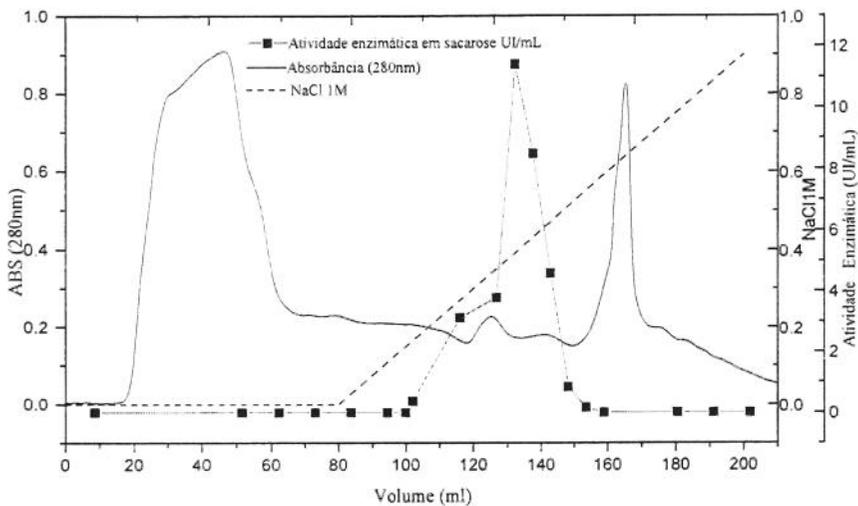


Figura 14. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 6,5.

Assim, de acordo com os resultados obtidos que foram bastante satisfatórios, os estudos de otimização das condições de purificação em diferentes valores de pH (5,5 a 7,5) foram realizados com a resina Q-Sepharose FF, a eluição da amostra em tampão fosfato de sódio 0,05M e um gradiente salino ascendente de NaCl 1 M em tampão fosfato.

4.2.2.Purificação da enzima em diferentes valores de pH (5,5-7,5)

Os perfis cromatográficos da purificação da enzima em pH 5,5 a 7,5 estão apresentados nas Figuras 15 a 19, onde estão reunidos os resultados de atividade total (UI/mL), teor de proteína (mg), atividade específica (UI/mg), fator de purificação, rendimento e fator S/I dos diferentes testes de pH.

pH 5,5

Na purificação da enzima realizada a pH 5,5 (Figura 15), observou-se que a eluição da enzima ocorreu numa concentração de 0,5 M de NaCl. Nesta condição a enzima foi purificada 19,87 vezes em relação à enzima do caldo bruto e obteve-se um rendimento de recuperação de 70,11% (Tabela 13). Comparando os valores da relação S/I do caldo bruto (6,58) com a fração coletada (13,13), foi observado um aumento em torno de 50%, caracterizando uma maior atividade em invertase, podendo-se supor que, nesta condição a concentração de invertase purificada seja superior a da inulinase. Gupta *et al.* (1994) obtiveram um fator de purificação 26 vezes e uma relação de S/I de 3,4 para inulinase de *Kluyveromyces fragilis* utilizando uma coluna de DEAE-celulose e CM-celulose com um pH de 5,4.

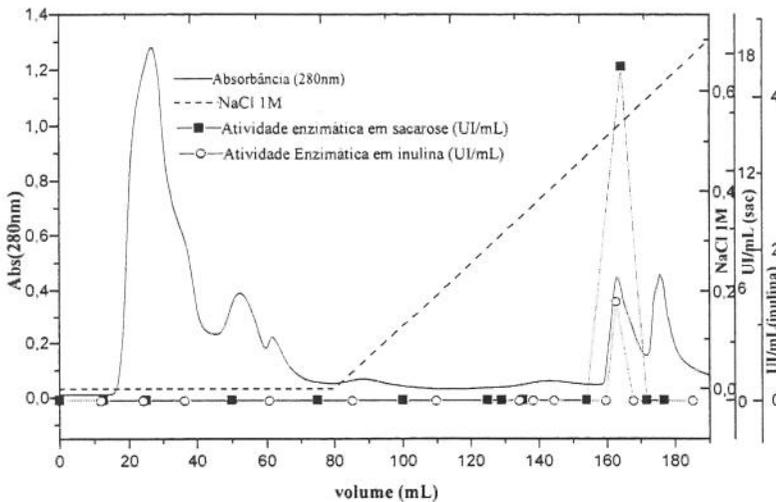


Figura 15. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e em inulina e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 5,5.

pH 6,0

Para o pH 6,0, a eluição da enzima foi realizada numa concentração de 0,1 M de NaCl (Figura 16). O fator de purificação obtido foi de 23,86, rendimento de recuperação 86,06% e uma relação de S/I para a enzima purificada de 7,27 (Tabela 13). Para a enzima purificada de *Penicillium sp* utilizando uma coluna de troca iônica Q-Sepharose HP, Nakamura *et al.* (1997), obtiveram um fator de purificação de 45 vezes em relação ao caldo

bruto e um rendimento de recuperação de 85%, com a eluição da enzima numa concentração de 0,4 M de NaCl no pH 6,0. Santos *et al.*, 2002, utilizando a coluna Q-Sepharose FF, tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 6,0 obtiveram um fator de purificação de 96 vezes e uma recuperação de 41% com a enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

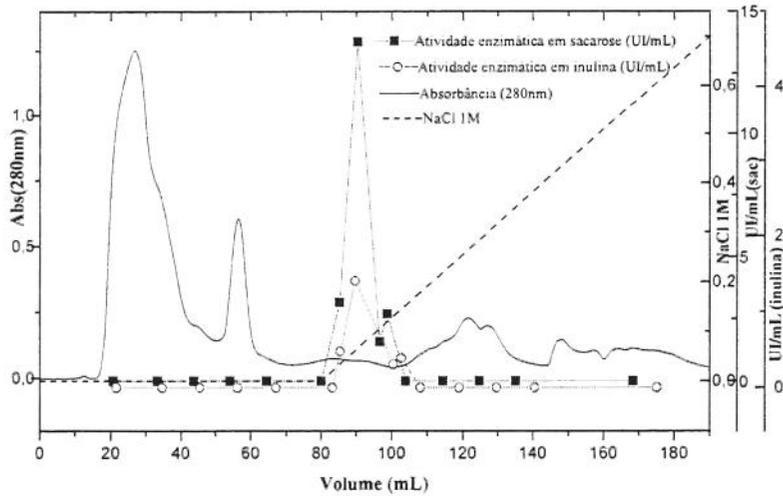


Figura 16. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e em inulina e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH6,0.

pH 6,5

De acordo com a Figura 17, a eluição da enzima ocorreu numa concentração salina de 0,21 M de NaCl. O fator de purificação foi de 17,41 e rendimento de recuperação de 74,30%. A relação S/I para a enzima purificada foi de 7,42. Comparando estes resultados com os valores obtidos para o fator de purificação e rendimento para pH 5,5 e 6,0 (Tabela 13), verificou-se que a enzima no pH 6,5 apresentou melhores resultados que o ensaio a pH 5,5, mas não superiores ao pH 6,0.

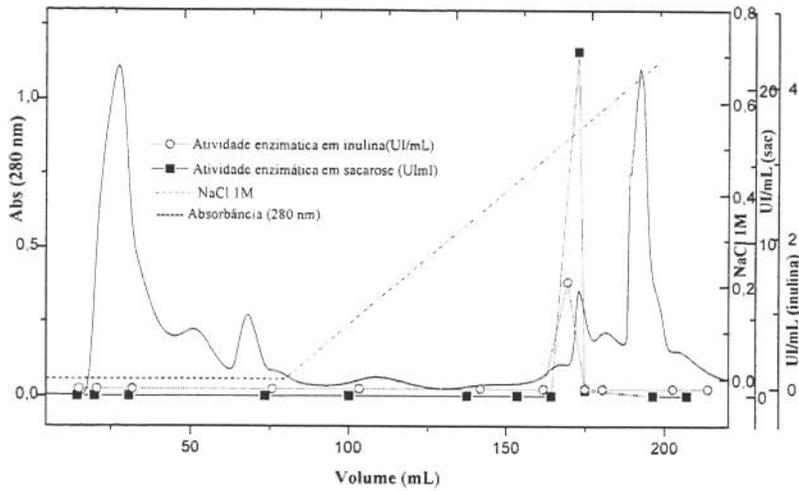


Figura 17. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorvância (280nm), atividade em sacarose e em inulina e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 6,5.

pH 7,0 e 7,5

A Figura 18 mostra o perfil cromatográfico da eluição da enzima no pH 7,0. A enzima foi eluída numa concentração 0,05 M de NaCl, onde foi determinada a atividade enzimática. Nas frações coletadas a enzima apresentou uma atividade em sacarose de 103,6 UI/mL, um fator de purificação de 35,22 em relação ao caldo bruto e um rendimento de recuperação de 46,43%. A enzima purificada neste pH pode ser caracterizada como invertase, já que não foi verificada atividade em inulina.

No estudo realizado com o pH 7,5, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na Figura 19 e pelas atividades enzimáticas de inulinase nas frações coletadas, verifica-se que nestas condições não ocorrem adsorção da enzima ou a enzima foi desnaturada.

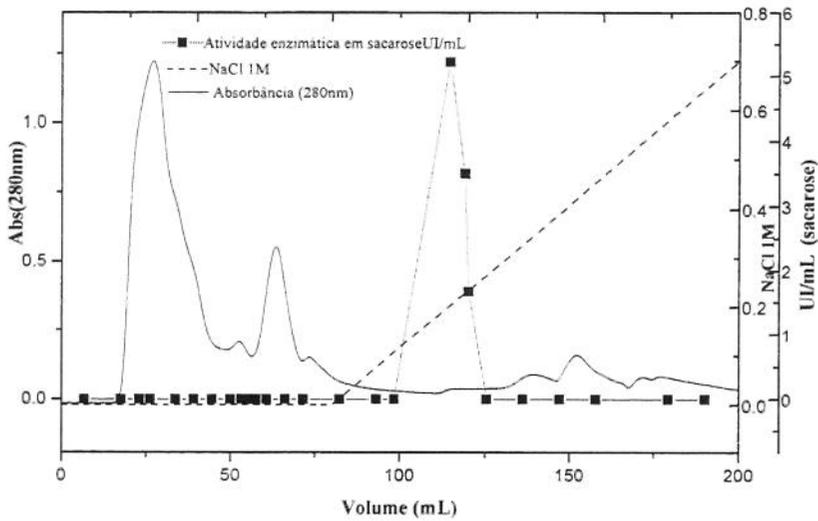


Figura 18. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH7,0.

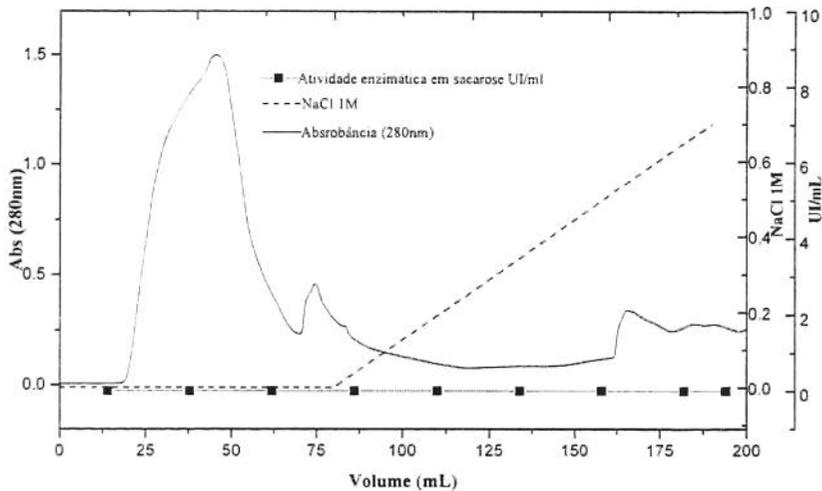


Figura 19. Perfil cromatográfico da purificação da inulinase em coluna de troca aniônica Q-Sepharose FF, apresentando absorbância (280nm), atividade em sacarose e gradiente salino com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH7,5.

A Tabela 13 mostra os valores da atividade total, atividade específica, fator de purificação, rendimento para a inulinase e invertase da enzima bruta e purificada nos diferentes valores de pH testados.

Tabela 13. Resultados da purificação da inulinase em diferentes valores de pH apresentando atividade total (U), proteína total (mg), atividade específica (U/mg), fator de purificação, rendimento e S/I (caracterização da enzima)

pH	Amostra	Ativ. Total		Proteína mg	Ativ. Específica		Fator de Purificação	Rendimento %	S/I
		UI			U/mg				
		I	S	I	S				
5,5	c.b	37,40	247,90	156,40	0,24	1,58	1	100	6,58
	Purif.	13,20	173,60	5,53	2,39	31,39	19,87	70,11	13,13
6,0	c.b	27,80	213,60	156,40	0,18	1,37	1	100	7,61
	Purif.	25,90	118,10	7,39	3,50	25,45	23,86	86,06	7,27
6,5	c.b	43,40	312,50	156,40	0,27	1,99	1	100	7,37
	Purif.	16,40	231,20	6,70	4,67	34,66	17,41	74,30	7,42
7,0	c.b	31,40	223,80	156,40	0,20	1,43	1	100	7,15
	Purif.	*	103,60	2,06	*	50,44	35,22	46,43	*

*c.b.- caldo bruto, purif. – amostra purificada, I= inulina, S= sacarose

A Tabela 13 mostra os resultados da purificação da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em diferentes valores de pH. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar a influência do pH no fator de purificação e rendimento de recuperação da inulinase. Os melhores resultados, quanto ao fator de purificação (23,86) e rendimento de recuperação (88,06 %) foram obtidos a pH 6,0. Em relação ao pH 5,5 e 6,5 pode-se dizer que a enzima apresentou resultados similares, já que as diferenças não foram significativas em relação ao fator de purificação e rendimento de recuperação. No pH 7,0 apenas foi detectada a atividade em sacarose, obtendo um alto fator de purificação de 35,22, e um rendimento de recuperação (46,43%). Manzoni & Cavazzoni (1988) estudaram a inulinase extracelular de quatro leveduras: *Candida Kefyr*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces cicerisporus*, *Kluyveromyces fragilis*, encontraram valores para a relação S/I foram de 7,1 para *Candida Kefyr*, 8,1 para *Candida pseudotropicalis*, 7,2 para *Kluyveromyces cicerisporus* e 10,2 para *Kluyveromyces fragilis*.

Em relação aos valores obtidos para a relação S/I, o aumento da relação de S/I, entre a enzima do caldo bruto e a enzima purificada, verificado principalmente para o pH 5,5, poderia estar relacionada com presença da invertase, que interfere na atividade enzimática da inulinase. Este efeito foi verificado por Gupta *et al.*(1994) que estudaram a purificação de β -frutoseidase de *Fusarium oxysporum*.

4.3. Estudo comparativo da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* com as enzimas invertase e inulinase comerciais

Neste item foi realizado um estudo qualitativo com o objetivo de comparar os perfis das enzimas comerciais com a enzima produzida pelo microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, utilizando um sistema de cromatografia líquida HPLC-IR. Os perfis cromatográficos da invertase comercial, inulinase comercial e inulinase do caldo bruto e parcialmente purificada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* estão apresentados nas Figuras 20 a 22.

As amostras com atividade enzimática obtidas por cromatografia de troca iônica em FPLC no pH 6,0 foram injetadas no sistema HPLC-RI, utilizando-se colunas de permeação em gel, conforme a metodologia descrita por Santos (1996) e Pereira (1998). Na Figura 20 encontram-se os perfis cromatográficos das enzimas invertase e inulinase comerciais e nas Figuras 21 e 22 os perfis cromatográficos do caldo bruto e da enzima parcialmente purificada no pH 6,0 de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, respectivamente. A análise comparativa dos tempos de retenção e do perfil cromatográfico da invertase e inulinase comercial (Frutozyme, Novo Nordisk) com a inulinase do caldo bruto e parcialmente purificada por cromatografia de troca iônica, mostra um perfil similar ao da inulinase comercial, podendo indicar que o peso molecular da inulinase tanto do caldo bruto quanto da parcialmente purificada está próximo do peso molecular da inulinase comercial. Para obter resultados mais satisfatórios, foi realizada eletroforese em gel, da inulinase do caldo bruto e parcialmente purificada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* para determinação do peso molecular, e os resultados obtidos foram comparados com os dados da literatura.

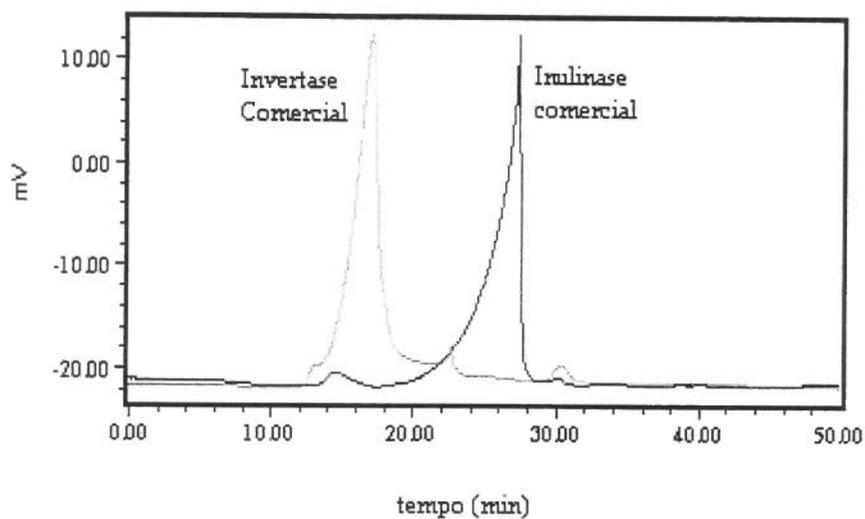


Figura 20. Perfil cromatográfico da invertase e inulinase comercial em coluna de permeação em gel.

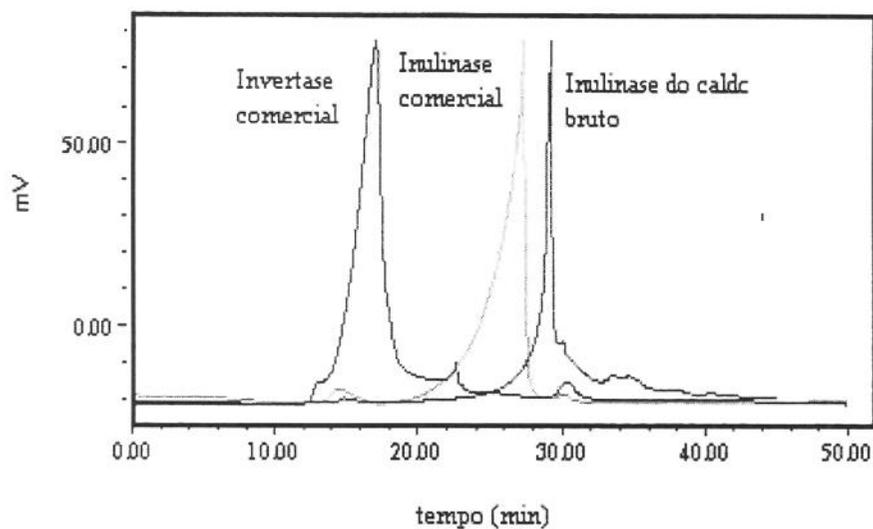


Figura 21. Perfil cromatográfico da invertase e inulinase comercial e da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, em coluna de permeação em gel.

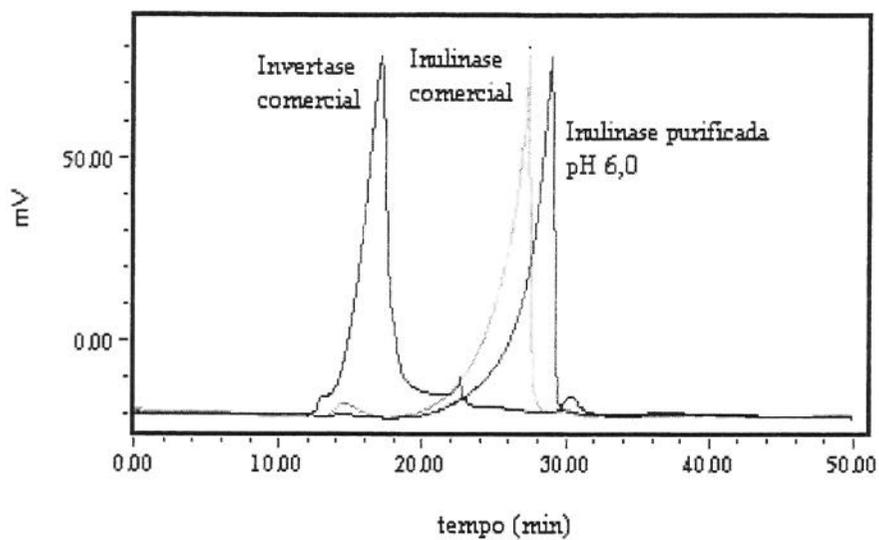


Figura 22. Perfil cromatográfico da inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, a pH 6,0 em coluna de permeação em gel.

4.4. Caracterização da inulinase nas formas livre e imobilizada

4.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese é uma técnica bastante efetiva no isolamento, purificação e caracterização de enzimas. Normalmente é utilizada como uma etapa final no processo de purificação após separações cromatográficas prévias. A eletroforese é utilizada para caracterização da enzima em relação ao peso molecular (SDS-PAGE), determinação do ponto isoelétrico (IEF) e avaliação da pureza da enzima.

A metodologia de eletroforese SDS-PAGE foi aplicada para a determinação do peso molecular da inulinase do caldo bruto (Figura 24) e da inulinase purificada e dialisada (Figura 25), após o estudo preliminar de caracterização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, por cromatografia de permeação em gel. Na Figura 23 está representado o espectro da curva de calibração utilizando padrões de baixo peso molecular (Kit Pharmacia). Analisando as Figuras 24 e 25, foi verificada uma única banda quando corada com Comassie Brilliant Blue G-250. De acordo com a curva de calibração o peso molecular para inulinase do caldo bruto foi de 88 KDa e para a enzima purificada 83 KDa.

Comparando os resultados obtidos com os dados da literatura, verifica-se que o peso molecular de 88 KDa diferencia do peso molecular de 30,1 KDa obtido por Kushi *et al.* (1996), para inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. Entretanto, quando os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os resultados obtidos por Xiao *et al.*, (1989) da inulinase de *Chrysosporum pannorum*, não se observou diferenças significativas nas duas frações com atividade em inulina onde o peso molecular estimado foi de 84 KDa e 70 KDa para F2 e F3, respectivamente. O peso molecular estimado por Azhari *et al.* (1989) para a endo-inulinase e exo-inulinase de *Aspergillus niger*, utilizando a cromatografia de permeação em gel foi 53 KDa para endo-inulinase e 81 KDa para exo-inulinase. Assim, podemos supor que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* poderia ser caracterizada como uma exo-inulinase, já que o peso molecular é bem próximo do peso molecular das exo-inulinases encontradas na literatura.

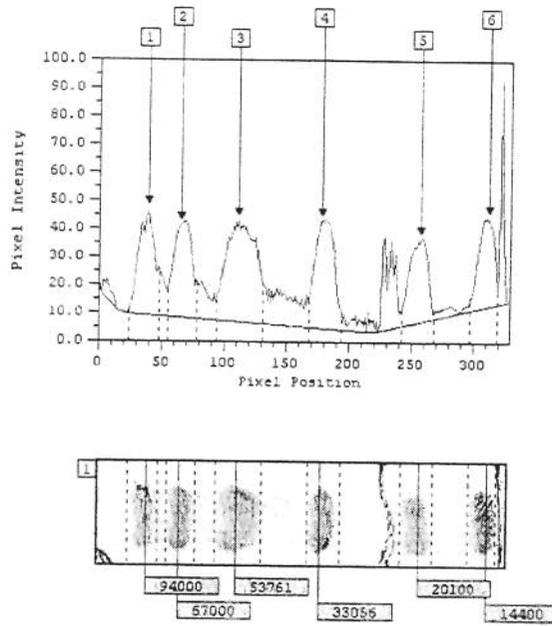


Figura 23. Espectro do gel de eletroforese SDS dos padrões de baixo peso molecular (LMW kit Calibracion Pharmacia).

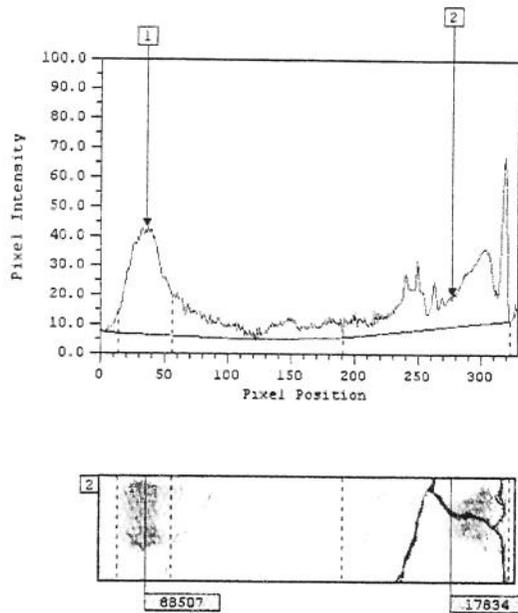


Figura 24. Espectro do gel de eletroforese SDS em gel poliacrilamida da inulinase bruta de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

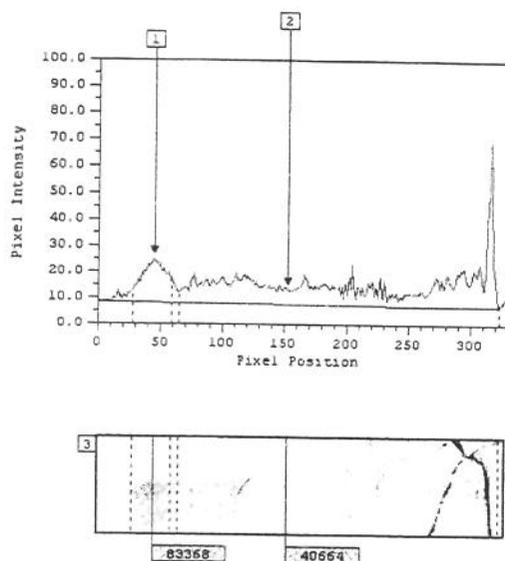


Figura 25. Espectro do gel de eletroforese SDS em gel de poliacrilamida da inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*.

4.4.2. Estabilidade com o tempo

O estudo da estabilidade da inulinase do caldo bruto e purificada foi realizado mantendo-se a enzima a -15°C durante 4 meses para a enzima purificada (Tabela 14) e 08 meses para a enzima do caldo bruto. De acordo com os resultados, obtidos verifica-se que a inulinase purificada se mostrou bastante estável durante o tempo de estocagem, estando de acordo com os dados obtidos por Schneider (1996), que trabalhou com a inulinase *Kluyveromyces marxianus* e verificou boa estabilidade após um período de 04 meses. Para a inulinase do caldo bruto foi verificada uma perda de 38% da atividade durante 08 meses de estocagem, mantida congelada. Quando a enzima foi mantida sob refrigeração (10°C), durante 12 meses a perda da atividade enzimática ficou em torno de 20%. Manzoni & Cavazoni (1988), estudaram a estabilidade das inulinasas de quatro leveduras (*Candida Kefyr*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces cicerisporus*, *Kluyveromyces fragilis*), verificando que as enzimas mantiveram a atividade durante 05 meses a -20°C , e a 10°C a estabilidade da enzima foi mantida durante um mês.

Tabela 14. Estabilidade em função do tempo de estocagem a -15°C da inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

Tempo (meses)	Atividade Enzimática (%)
0	100
01	100
02	99,91
04	99,91

4.4.3. Microscopia eletrônica da esfera de alginato de cálcio

Com o objetivo de conhecer um pouco melhor a estrutura do alginato de cálcio foi realizada uma microscopia eletrônica da superfície da esfera do alginato de cálcio sem adição de enzima (Figura 26). Nas Figuras 27a e b estão apresentadas a microscopia eletrônica da estrutura interna do gel com e sem adição de enzima (observadas após fratura da cápsula). Na ausência da enzima no gel podemos verificar que houve uma maior compactação da matriz polimérica de alginato, enquanto que após a adição da enzima foi observado um efeito de aglomeração, caracterizado pela presença de zonas de descontinuidade (Figuras 27 a e b). Desta forma pode-se conhecer um pouco melhor a estrutura do alginato na forma de esfera e fragmentado com e sem enzimas.

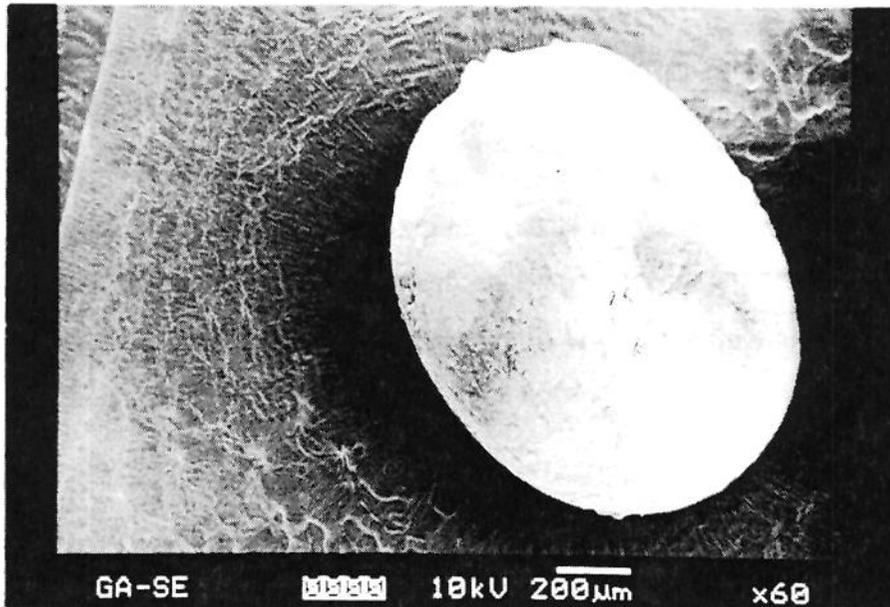
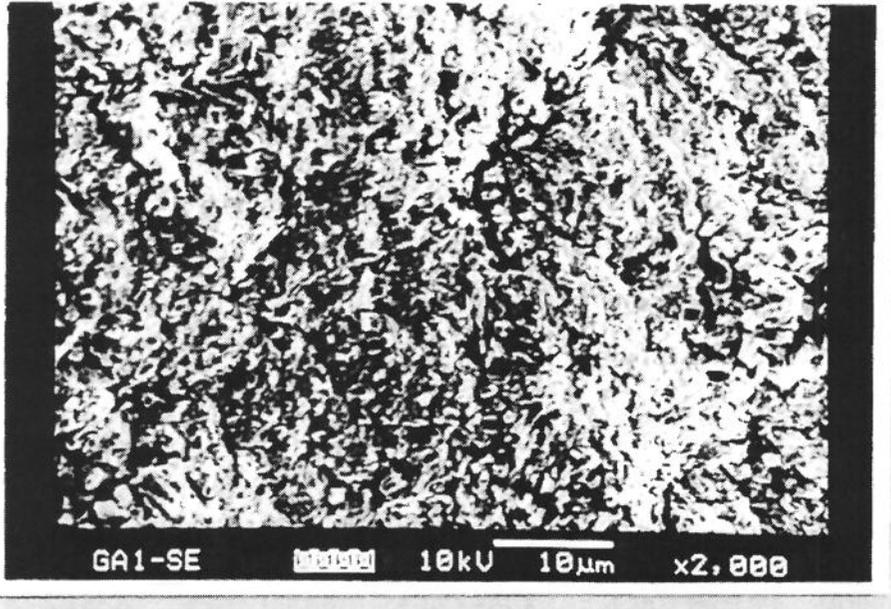
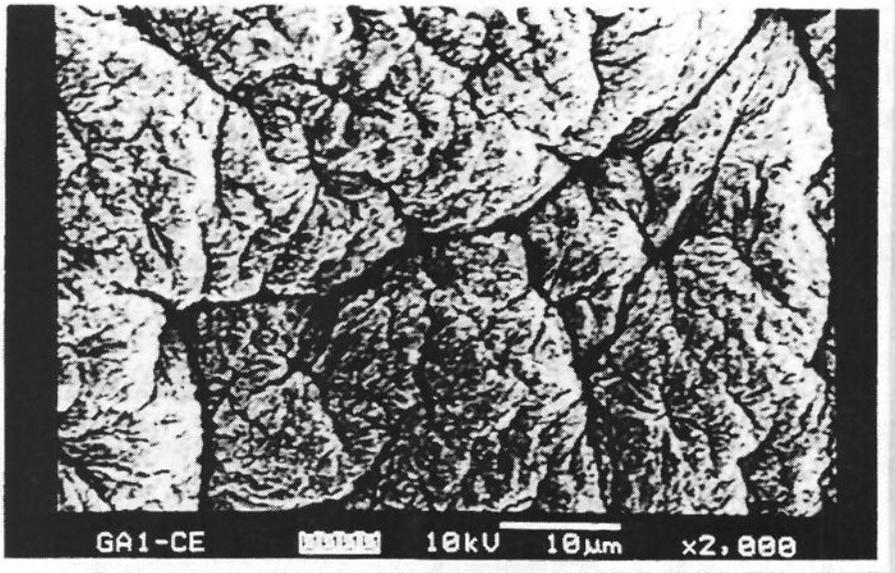


Figura 26. Microscopia eletrônica da esfera de alginato de cálcio sem enzima.



(a)



(b)

Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura da esfera fraturada de alginato de cálcio (a) sem enzima e (b) com enzima encapsulada.

4.4.4. Estudo da otimização da inulinase imobilizada em alginato de cálcio

Na imobilização da enzima com alginato de cálcio um dos fatores importantes, além da concentração do gel, é a concentração da solução de cloreto de cálcio que dá uma melhor estabilidade na formação das esferas de alginato. Em todos os testes manteve-se a concentração do gel de alginato a 3,5%, que em estudos anteriores apresentou melhores resultados. Para o estudo da influência da concentração de CaCl_2 na imobilização de inulinase, o gel de alginato contendo a enzima foi gotejado em soluções de CaCl_2 em diferentes concentrações (0,05, 0,10, 0,15 e 0,2 M). Os resultados estão apresentados na Tabela 15 e Figura 28.

Tabela 15. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em diferentes concentrações de cloreto de cálcio.

Tempo(h)	Atividade enzimática (UI/mL)			
	0,05M CaCl_2	0,1M CaCl_2	0,15M CaCl_2	0,2M CaCl_2
0	1,237	1,374	1,486	1,18
16,0	0,757	0,884	1,115	0,902
23,0	0,526	0,670	0,954	0,826
40,0	0,457	0,586	0,682	0,694
47,5	0,485	0,537	0,682	0,699
64,2	0,509	0,537	0,653	0,705
71,0	0,457	0,531	0,589	0,647
88,0	0,514	0,537	0,537	0,670
95,5	0,428	0,324	0,405	0,595
118,0	0,341	0,168	0,248	0,555
165,2	0,358	0,012	0,133	0,613

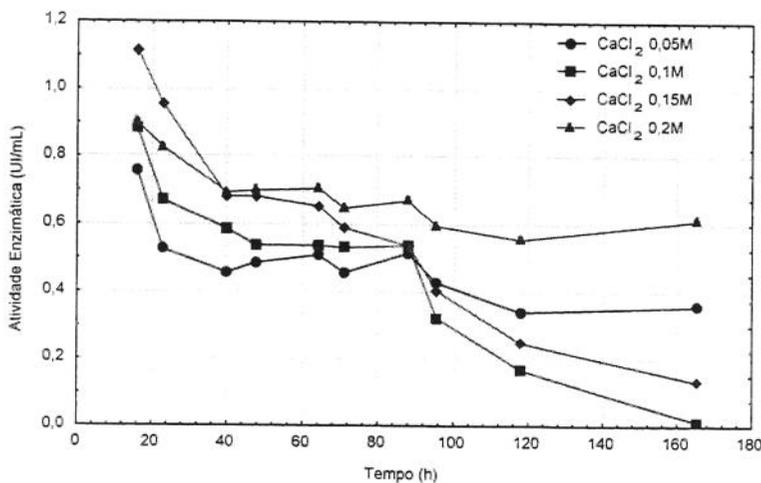


Figura 28. Perfil da atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em diferentes concentrações de cloreto de cálcio.

Quando o gel de alginato contendo a enzima foi gotejado na solução de cloreto de cálcio 0,15 M, a atividade enzimática da enzima imobilizada foi maior, caracterizando uma melhor retenção da enzima, porém com uma menor estabilidade (Tabela 15). Na concentração de 0,2 M de CaCl_2 a enzima apresentou uma boa estabilidade, mantendo 55% da sua atividade inicial durante um período de 165 horas (7 dias) estocada sob refrigeração (10°C). Os resultados obtidos neste trabalho para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em alginato de cálcio foram similares aos de Ortega *et al.*, (1998) que imobilizaram a enzima β -glicosidase em alginato de cálcio (3%) com poliacrilamida, verificando que nas esferas preparadas com CaCl_2 a 0,2 M a retenção da atividade inicial foi de 66%. Jain *et al* (1984) estudaram de imobilização de células de *Pichia etchelsii* em alginato de cálcio, e verificaram que a concentração de CaCl_2 0,2M favorecia um aumento na estabilidade, sem provocar variações significativas na atividade enzimática.

Gaspari *et al.* (1999) estudaram o efeito de diferentes suportes (quitina com e sem glutaraldeído, sílica de porosidade controlada e alginato de sódio) na atividade enzimática da inulinase de *Kluyveromyces marxianus*. De acordo com os resultados obtidos por estes autores, a enzima apresentou uma melhor atividade imobilizada em sílica de porosidade controlada, do que quando imobilizada em gel de alginato de sódio.

Futagawa (2002) estudou a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando diferentes suportes: gel de gelatina com adição de carvão ativado, gel de alginato, gel de alginato com carvão ativado, gel de alginato com glutaraldeído, gel de alginato com celite e gel de alginato em solução de sacarose mais glutaraldeído. A partir dos resultados foi verificada que o suporte de gel de alginato com a adição com 2 a 3% de carvão ativado, glutaraldeído ou celite apresentou uma maior estabilidade.

4.4.5. Influência do pH na atividade enzimática (pH ótimo)

a) Enzima livre

O estudo da influência do pH ótimo para a enzima na forma purificada livre foi realizado em tampão acetato de sódio 0,1 M em diferentes valores de pH (3,6-5,6). Os resultados estão apresentados na Tabela 16 e Figura 29.

Tabela 16. Atividade enzimática da inulinase purificada livre em função do pH, diluída em tampão acetato de sódio 0,1M.

pH	UI/mL
3,6	28,88
4,0	28,42
4,4	29,98
4,8	30,24
5,2	25,17
5,6	20,23

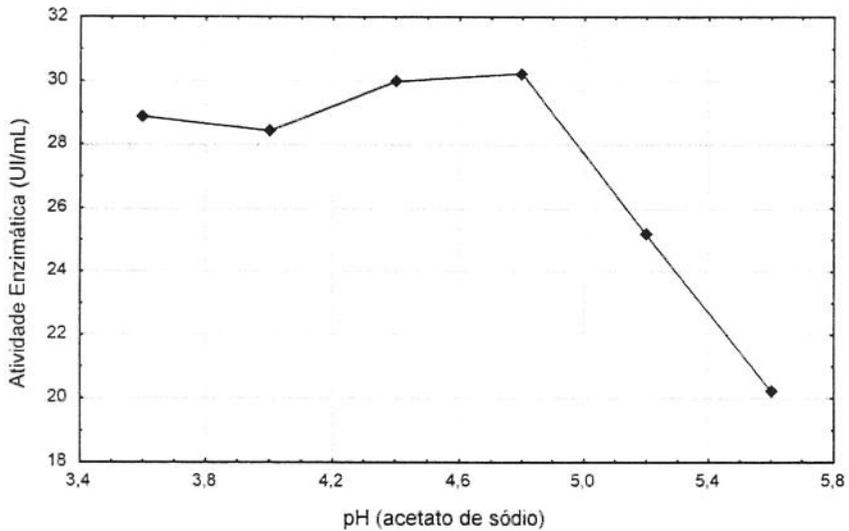


Figura 29. Atividade enzimática da inulinase livre em função do pH, em tampão acetato de sódio 0,1M.

Pela análise dos resultados podemos verificar que a máxima atividade para a enzima livre foi obtida no pH 4,8 (Tabela 16 e Figura 29). Pessoa e Vitolo (1999) caracterizaram a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* e encontraram um pH ótimo de 5,0. Um resultado similar foi obtido por Xiao *et al.*, (1989), para as frações (F2 e F3) de inulinase purificada de *Chrysosporium pannorum*. Para a fração F2 encontraram um pH ótimo de 5,0 e 6,0 para fração F3, incubando-as em tampão McIlvaine a 50°C, por 30 minutos. Manzoni & Cavazzoni (1988) estudaram a caracterização de inulinase de quatro leveduras (*Candida*

Kefyr, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces cicerisporus*, *Kluyveromyces fragilis*) e encontraram um pH ótimo em 4,7 para todas as leveduras estudadas. Barthomeuf *et al.*, (1991) estudaram a inulinase de *Penicillium rugulosum*, encontrando um pH ótimo entre 5,5-5,6, determinado em tampão acetato de sódio 0,1 M. Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 foi encontrado um pH ótimo de 5,0 (Cruz-Guerrero *et al.*, 1995). E para inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a máxima atividade foi obtida no pH 4,0 (Rouwenhorst *et al.* 1988).

É interessante ressaltar que para fins industriais é importante que a enzima apresente um baixo valor para o pH ótimo, evitando desta forma contaminação bacteriana, sendo também vantajoso que a enzima tenha a capacidade de atuação em uma ampla faixa de pH, tornando o processo mais flexível (Schneider, 1996). Esta característica pode ser verificada para a maioria das inulinasas de microrganismos, inclusive para *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, utilizada neste trabalho

b) Enzima imobilizada

Em relação à enzima imobilizada em alginato de cálcio, o estudo foi realizado com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6-5,6). As esferas de alginato de cálcio (1 cm³) contendo a enzima encapsulada foram incubadas em diferentes valores de pH e em seguida determinada a atividade enzimática. Na Tabela 17 e Figura 30 estão apresentados os resultados.

Tabela 17. Atividade enzimática da inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio em função do pH. Atividade inicial: 0,8554 UI/mL.

pH	UI/mL
3,6	0,6531
4,0	0,8207
4,4	0,8381
4,8	0,7803
5,2	0,6067
5,6	0,4710

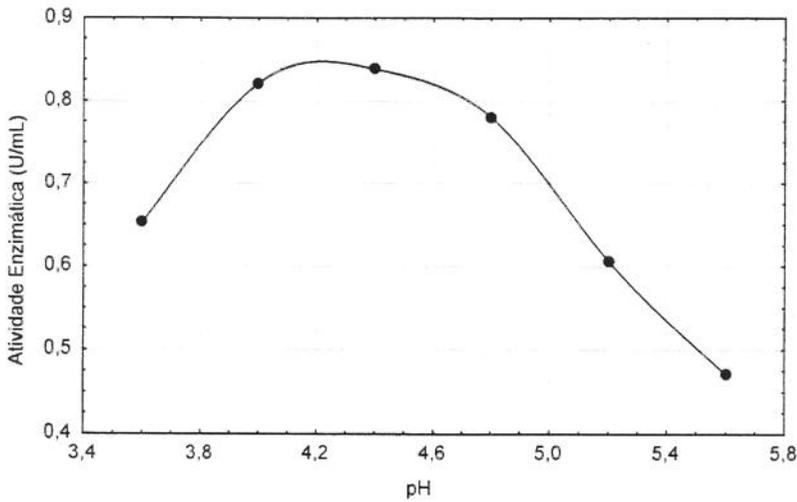


Figura 30. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em função do pH, em tampão acetato de sódio 0,1M.

Analisando os resultados obtidos podemos verificar que a enzima imobilizada em alginato de cálcio apresentou uma máxima atividade no pH 4,4 (Tabela 17 e Figura 30), o que difere do valor obtido para a inulinase livre, onde a máxima atividade foi próximo do pH 4,8. Resultados similares foram obtidos por Adami *et al.*, (1998) para os valores do pH ótimo para enzima de *Trichosporon pullulans* livre e imobilizada em alginato de cálcio. De acordo com os autores esta diferença do pH ótimo da enzima imobilizada em relação à enzima livre, poderia estar relacionada com a presença de cargas positivas dominantes próximas à superfície da matriz do alginato de cálcio.

Estas mudanças que podem ocorrer no perfil do pH para enzimas imobilizadas, são associadas à existência de efeitos de atração de íons pela matriz do suporte. Isto é, se um determinado suporte apresentar cargas negativas, o pH ótimo da enzima imobilizada desloca-se para o lado alcalino. A atração de cargas positivas (prótons) pela matriz carregada negativamente forma um “filme” de cátions que gera um micro ambiente com um pH mais ácido do que o pH macro ambiente, onde está sendo feita a medição. Similarmente, matrizes carregadas positivamente deslocam o pH ótimo para o lado ácido (Baruque,1991, Adami *et al.*,1998).

4.4.6. Influência do pH na estabilidade da enzima

a) Enzima livre

A estabilidade da inulinase livre foi verificada incubando-a em diferentes valores de pH (3,6-5,8), em tampão acetato de sódio 0,1 M a 50°C. Os resultados estão representados na Figura 31. A análise dos resultados leva-nos a concluir que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, na forma livre apresenta uma maior estabilidade no pH 4,8. Este valor de pH obtido diferencia um pouco dos encontrados na literatura. A inulinase de *Penicillium sp.* TN-88 apresentou uma faixa de maior estabilidade entre 5,0-7,0 (Nagamura *et al.* 1997) e 5,0-6,0, em tampão citrato-fosfato para inulinase de *Aspergillus niger* (Öngen-Baysal *et al.* 1994). Barthomeuf *et al.*, (1991) encontrou para inulinase de *Penicillium rugulosum* uma maior estabilidade no intervalo de pH 4,0 até 6,5 com 24 horas de incubação. Para inulinase das frações (F2 e F3) purificada por Xiao *et al.* (1989) de *Chrysosporium pannorum*, a maior estabilidade foi no pH de 5,0 e 7,5 para fração F2 e 5,0 e 8,5 para F3, em 24 horas de incubação a 30°C.

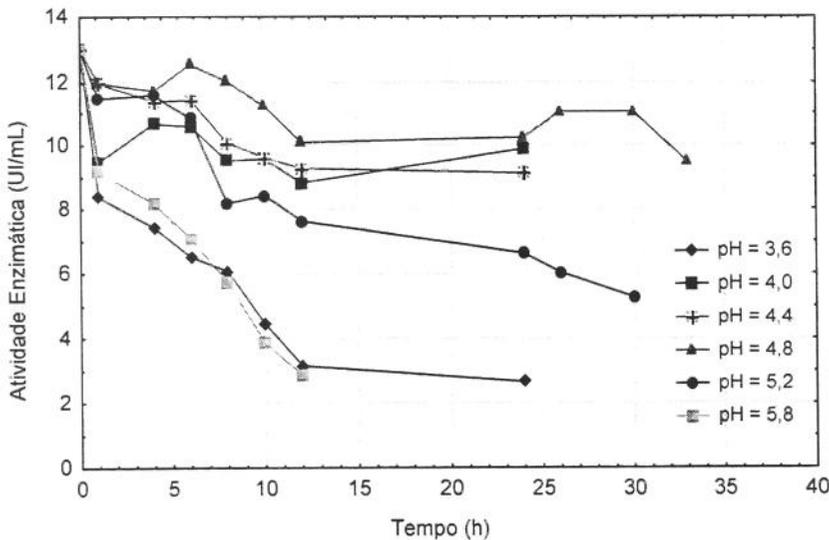


Figura 31. Atividade enzimática em função do tempo e do pH da inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*.

b) Enzima imobilizada

Para a inulinase imobilizada em alginato de cálcio, podemos verificar a partir dos resultados que no pH 4,4 a enzima mantém uma melhor estabilidade. Entretanto podemos

verificar que a queda de atividade da enzima imobilizada, na faixa de pH estudada, é mais acentuada em comparação com a enzima livre, comprovando que a imobilização em alginato de cálcio diminui a estabilidade da enzima (Figura 32).

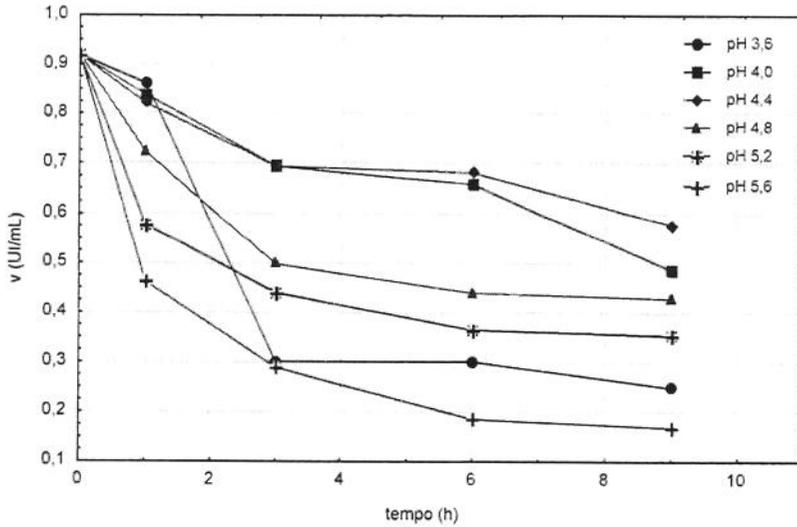


Figura 32: Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio em função do tempo e pH.

4.4.7. Influência da temperatura na atividade enzimática

a) Enzima livre

A inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* na forma livre foi incubada em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 4,8 em diferentes temperaturas (20-70°C) e em seguida foram determinadas as atividades enzimáticas. A partir dos resultados foi determinada a energia de ativação. Na Tabela 18 e Figura 33 estão apresentados os resultados das velocidades iniciais de reação com inulinase livre purificada em função da temperatura.

Na Tabela 18 e Figura 33 podemos verificar que a enzima apresentou uma atividade máxima na temperatura de 63°C (21,58 UI/mL). Entretanto, para temperaturas acima de 63°C a enzima perde atividade abruptamente devido a desnaturação. Schneider (1996), trabalhando com a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 obteve um máximo de atividade a 55°C. Manzoni & Cavazzoni (1988) que estudaram o efeito da atividade inulinolítica de enzimas das leveduras *Candida Kefyr*, *Candida pseudotropicalis*,

Kluyveromyces cicerisporus e *Kluyveromyces fragilis* observaram que a atividade máxima foi obtida a 60°C.

Vários estudos foram realizados sobre a influência da temperatura na atividade da inulinase. Nagamura *et al.*, (1997) obtiveram um ótimo a 50°C para endo-inulinase de *Penicillium sp* TN-88. Os autores também verificaram que a enzima perdia rapidamente atividade a 60°C. Outro trabalho sobre o efeito da temperatura em inulinase purificada foi realizado por Xiao *et al.* (1989). Estes autores obtiveram duas frações com atividade inulinolítica, denominadas de F2 e F3, que apresentaram uma temperatura ótima em torno de 55°C, com boa estabilidade a 50°C, para fração F2, e 45°C, para a fração F3. Para a inulinase purificada de *Kluyveromyces bulgaricus*, a máxima atividade obtida foi a 50°C em tampão fosfato 0,05 M, a pH 4,6, e para inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 a temperatura ótima foi de 70°C, utilizando a sacarose como substrato e 50°C para inulina como substrato (Cruz-Guerrero *et al.*, 1995).

Tabela 18. Atividade enzimática em função da temperatura, para inulinase livre purificada e atividade inicial: 11,44 UI/mL.

Temperatura (°C)	T (K)	1/T K ⁻¹ (10 ⁻³)	(UI/mL)
20,0	293,15	3,41	1,25
25,0	298,15	3,35	2,36
30,0	303,15	3,30	4,47
35	308,15	3,25	4,92
37,5	310,65	3,22	5,32
40	313,15	3,19	6,37
45	318,15	3,14	8,43
47,5	320,65	3,12	10,87
50	323,15	3,09	11,47
55	328,15	3,05	10,09
57,5	330,65	3,02	16,91
60	333,15	3,00	21,28
63	336,15	2,97	21,58
65	338,15	2,96	20,53
67,5	340,15	2,94	20,32
70	343,15	2,91	11,74

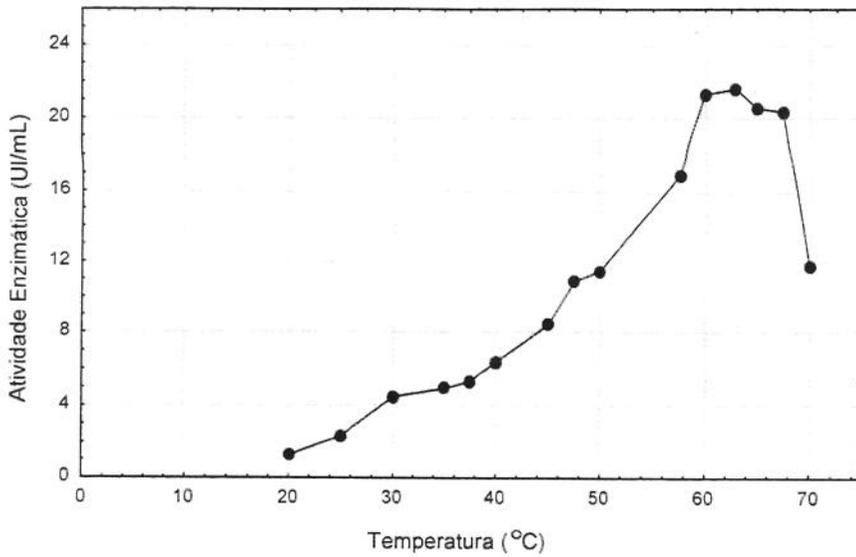


Figura 33. Efeito da temperatura na atividade da inulinase livre purificada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*

b) Enzima imobilizada

A inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* imobilizada em alginato de cálcio foi incubada em tampão acetato de sódio 0,1M, a pH 4,8, em diferentes temperaturas (20-70°C) e determinou-se a atividade enzimática.

Na Tabela 19 e Figura 34 estão apresentados os resultados das velocidades iniciais de reação com inulinase imobilizada em alginato de cálcio em função da temperatura.

De acordo com a Tabela 19 e Figura 34, pode-se verificar que a enzima apresentou um máximo de atividade na temperatura de 57,5°C. Entretanto, a 60 e 63°C, a enzima também apresentou um comportamento praticamente igual. Acima desta temperatura observa-se uma perda da atividade enzimática nos primeiros minutos de incubação.

Tabela 19. Atividade enzimática para inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio em função da temperatura. Atividade Inicial: 1,2821 UI/mL

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	T (K)	$1/T \text{ K}^{-1} \cdot 10^3$	v (UI/mL)
20,0	293,15	3,41	0,097
25,0	298,15	3,35	0,163
30,0	303,15	3,30	0,325
32,5	305,65	3,27	0,279
35,0	308,15	3,25	0,423
37,5	310,65	3,22	0,495
40,0	313,15	3,19	0,573
45,0	318,15	3,14	0,664
47,5	320,65	3,12	0,709
50,0	323,15	3,09	0,872
52,5	325,65	3,07	0,931
55,0	328,15	3,05	1,132
57,5	330,65	3,02	1,191
60,0	333,15	3,00	1,184
63,0	336,15	2,97	1,165
65,0	335,15	2,96	0,911
67,5	340,15	2,94	0,508
70,0	343,15	2,91	0,149

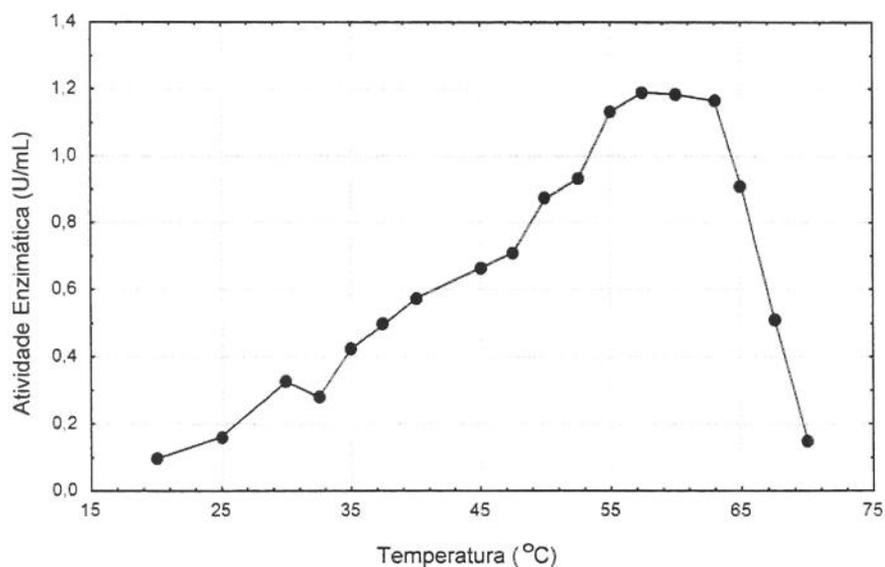


Figura 34. Efeito da temperatura na atividade da inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio

4.4.7.1. Modelagem da velocidade de reação em função da temperatura e tempo de reação

Sabe-se que a velocidade de reação enzimática é proporcional à concentração de enzima. Segundo as Equações 11 e 12, conhecida como de Arrhenius, pode representar a variação da velocidade em função da temperatura, tal como nos processos químicos. Entretanto, em se tratando de uma reação bioquímica, a enzima sofre desnaturação à medida que aumenta a temperatura, implicando no decréscimo da velocidade da reação em altas temperaturas, como bem exemplifica as Figuras 33 e 34. Portanto, a equação de Arrhenius só explica a primeira parte da curva, até as proximidades do máximo de atividade. Por outro lado, na segunda parte da curva, onde começa a ocorrer o decréscimo da velocidade de reação, tem-se uma combinação de ativação de reação com ativação da desnaturação, sendo que esta última passa a ser cada vez mais predominante à medida que a temperatura aumenta.

$$v = k[E] \quad (11)$$

$$v = v_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (12)$$

Onde:

v = velocidade de reação

v_0 = velocidade de reação a temperatura infinita

E_a = energia de ativação

R = constante universal dos gases ($R = 1,9872 \text{ cal/mol.K}$)

K = constante cinética de reação

E = concentração da enzima ativa

Desta forma, para a segunda parte da curva é necessário levar-se em consideração o fenômeno da desnaturação proteica, ou seja, da perda de atividade enzimática em função do tempo.

Assumindo que a desnaturação, ou desativação enzimática é um processo de primeira ordem, pode-se escrever:

$$\frac{dE}{dt} = -k_d \cdot E \quad (13)$$

Onde k_d é a constante de desnaturação.

A Equação 13 pode ser integrada do tempo inicial zero (início da reação), onde toda a enzima estaria na forma ativa ($E=E_0$) até um tempo genérico de reação t , onde teríamos uma parcela E genérica de enzima ativa, ou seja:

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (14)$$

Ou então

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (15)$$

Entretanto k_d é uma constante cinética e portanto é função da temperatura. Assumindo-se que a equação de Arrhenius pode ser utilizada também para explicar a variação de k_d em função da temperatura tem-se (Peter *et al.*, 1987, Levenspiel, 1972):

$$k_d = k_{d_0} \cdot e^{-\frac{E_d}{RT}} \quad (16)$$

onde

k_{d_0} : constante de referência

E_d : energia de ativação da reação de desnaturação protéica

Tanto E_a como E_d , podem ser obtidos pela linearização das Equações 12 e 16, pela aplicação de \ln nos dois lados das equações, ou seja:

$$\ln E = \ln E_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (17)$$

O modelo matemático final que representa a variação da velocidade de reação em função da temperatura do processo, para qualquer tempo, pode ser expressa pelo seguinte sistema de equações:

$$\begin{aligned} v &= kE \\ k &= k_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \\ E &= E_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \\ k_d &= k_{d_0} e^{-\frac{E_d}{RT}} \end{aligned} \quad (18)$$

Para se chegar à expressão de k em função da temperatura, assumiu-se que em baixas temperaturas a desnaturação enzimática é desprezível, a concentração da enzima ativa permanecendo, portanto, constante pode-se escrever:

$$\frac{v}{v_0} = \frac{kE}{k_0E} = \frac{k}{k_0}$$

Substituindo-se esta expressão na Equação 12 chega-se então na equação que prevê a variação da constante k em função da temperatura, como mostrado na Equação 19.

Fazendo-se as substituições das 3 últimas expressões na primeira equação do modelo, obtém-se a equação 19, que é a equação final do modelo.

$$v = k_0 \cdot \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \cdot E_0 \cdot \exp\left[-\left(k_{do} \cdot \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right)\right) \cdot t\right] \quad (19)$$

Pelos resultados obtidos, tanto para enzima livre quanto para a enzima imobilizada, pode-se expressar o modelo de inativação térmica como uma cinética de primeira ordem, não necessitando de modelos mais complexos, tais como os modelos de inativação em série ou paralelo, para descrever o comportamento da inativação da enzima (Henley & Saldana, 1985).

a) Enzima livre

- Cálculo da energia de ativação (E_a)

A partir dos resultados obtidos para determinação da influência da temperatura na atividade enzimática, determinou-se a energia de ativação (E_a) utilizando a equação de Arrhenius na forma linearizada.

Nas Tabela 20 e Figura 35 estão apresentados os dados experimentais utilizados para a determinação da energia de ativação para enzima na forma livre.

Tabela 20. Atividade enzimática da inulinase livre, em função da temperatura.
Atividade inicial: $v_0 = 11,44$ UI/mL.

Temp. ($^{\circ}$ C)	Temp. (K)	Temp. ($1/T$). 10^{-3} (K^{-1})	v (UI/mL)	ln(v/v ₀)
25	298,15	3,35	1,25	-2,21
33	306,15	3,27	2,36	-1,58
35	308,15	3,25	4,47	-0,94
37,5	310,65	3,22	5,32	-0,76
40	313,15	3,19	6,37	-0,59
45	318,15	3,14	8,43	-0,31

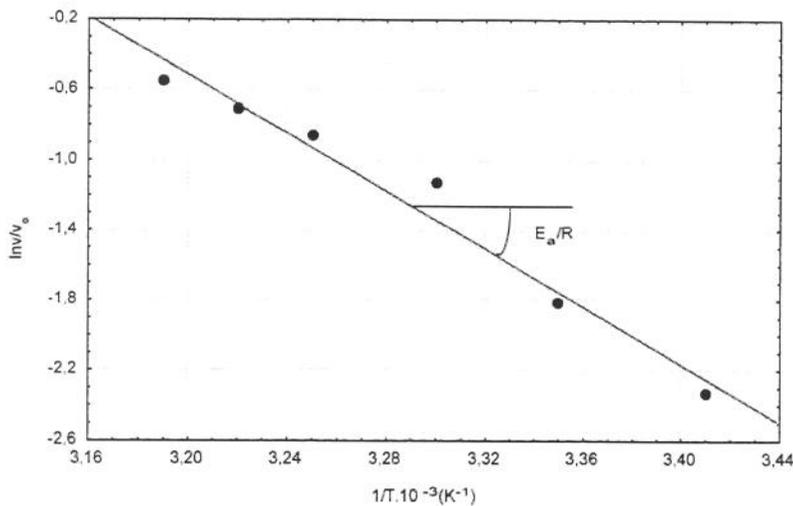


Figura 35. Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase purificada e livre de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, para o cálculo da energia de ativação.

Com o objetivo de determinar a energia de ativação da reação da sacarose com a inulinase, foi construído o gráfico $\ln v/v_0$ em função do inverso da temperatura, que representa a forma linearizada de Arrhenius, Equação 20.

$$\ln v = -8263,2 \frac{1}{T} + 25,93 \quad (20)$$

A partir da Equação 20, determinou-se a energia de ativação da reação como sendo 16,42 kcal/mol

- Cálculo da energia de ativação para reação de desnaturação (E_d)

O conhecimento da cinética de desativação das enzimas é de grande importância no projeto de reatores enzimáticos. Para o cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação (E_d), a enzima foi incubada em diferentes temperaturas. Para cada temperatura foram retiradas amostras em intervalos de tempos pré-determinados para o cálculo da atividade enzimática. Em seguida, determinou-se as constantes de desnaturação para cada temperatura. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 21 a 26.

Os valores encontrados para a temperatura de estabilidade para inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* (Tabela 21 a 26), são similares aos resultados encontrados na literatura. Öngen-Baysel *et al.*, (1994) estudaram a influência da

temperatura na estabilidade da inulinase de *Aspergillus niger* e verificaram que a enzima apresentava uma estabilidade máxima a 50°C, enquanto que Nagamura *et al.*, (1997) encontraram maior estabilidade a 40°C incubando durante 30 minutos. E verificaram a inativação da enzima a 60°C, utilizando uma endo-inulinase de *Penicillium* sp TN-88. Outro trabalho sobre a influência da temperatura sobre a enzima purificada foi realizado por Xiao *et al.*, (1989), onde foram coletadas duas frações com atividade inulinolítica, denominadas de F2 e F3 e que apresentaram uma temperatura de estabilidade de 50°C para a fração de F2 e 45°C para fração F3.

Inulinase a T= 50°C

A enzima foi incubada em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 durante um período de 105 horas e verificou-se que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* manteve boa estabilidade durante um período de 75 horas (13,51 UI/mL) cujos resultados estão apresentados na Tabela 21. A partir dos resultados obtidos, calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo, utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 36).

Tabela 21. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 4,8 e T=50°C (atividade inicial= 18,57UI/mL).

Tempo (h)	v (UI/mL)	ln (v/v ₀)
7	16,86	-0,0966
10	16,51	-0,1175
17	15,96	-0,1515
19	16,39	-0,1249
21	15,27	-0,1957
30	15,33	-0,1917
36	15,15	-0,2035
48	14,84	-0,2242
54	14,25	-0,2648
75	13,51	-0,3182

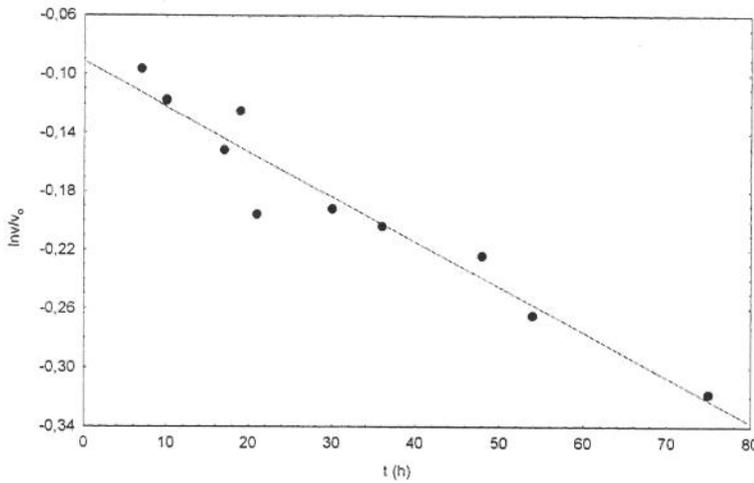


Figura 36. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 50°C.

Inulinase a T= 52,5°C

A enzima foi incubada em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 durante um período de 12 horas e verificou-se que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* manteve boa estabilidade durante um período de 4,5 horas (14,19 UI/mL). Apresentando uma rápida desnaturação após 12 horas. A partir dos resultados obtidos (Tabela 22), calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 37).

Tabela 22. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre diluída, a pH 4,8 e T=52,5°C. (atividade inicial= 18,57UI/mL).

Tempo (h)	v (UI/mL)	ln (v/v ₀)
1,5	16,19	-0,1372
2,5	16,25	-0,1335
4,5	14,19	-0,2690
7,5	12,02	-0,4349
12	7,97	-0,8459

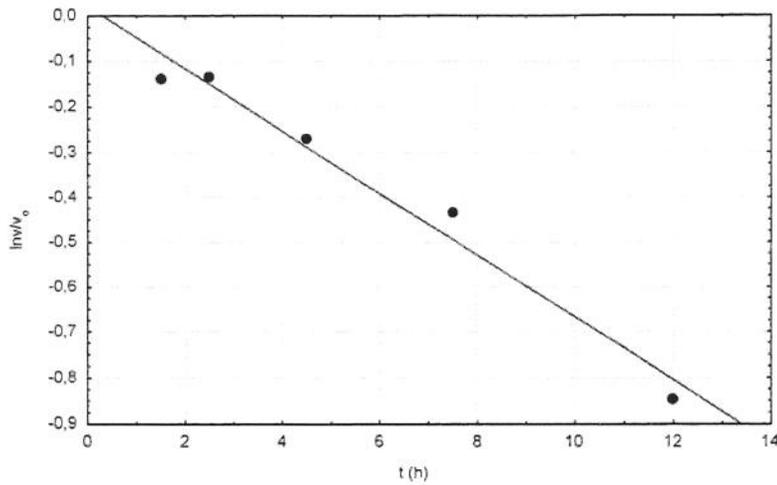


Figura 37. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 52,5°C.

Inulinase a $T=55^{\circ}\text{C}$

A enzima foi incubada em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 durante um período de 17 horas e verificando-se que a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* manteve boa estabilidade durante um período de 4,5 horas (11,20 UI/mL). Apresentou uma rápida desnaturação após 8 horas de análise. A partir dos resultados obtidos (Tabela 23), calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 38).

Tabela 23. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 4,8 e $T=55^{\circ}\text{C}$ (atividade inicial= 18,57UI/mL).

Tempo (h)	v (UI/mL)	ln (v/v₀)
0,5	18,29	-0,0152
1,0	15,34	-0,1910
1,5	14,62	-0,2391
2,0	14,91	-0,2195
4,5	11,20	-0,5057
6,0	8,21	-0,8162
8,0	6,84	-0,9989

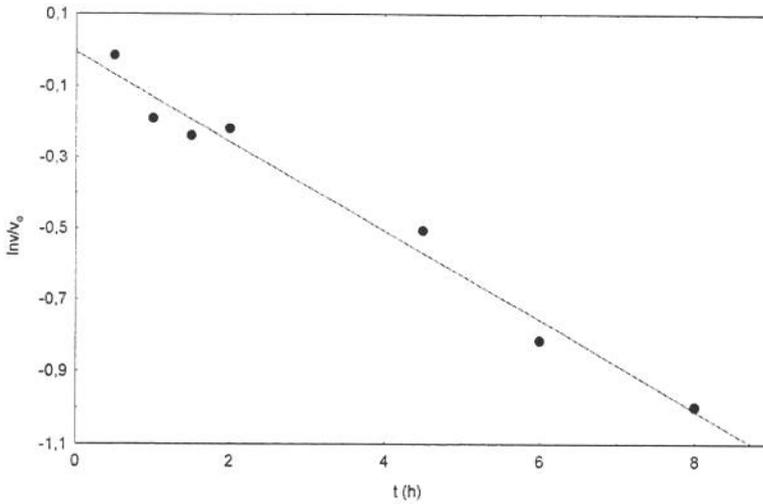


Figura 38. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 55°C.

Inulinase a T= 57,5°C

A enzima foi incubada em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 durante um período de 1,5 horas. Após um período de 30 minutos a enzima começa a apresentar uma rápida desnaturação, mantendo apenas 44% da sua atividade inicial. A constante de desnaturação (k_d) foi calculada a partir dos resultados obtidos (Tabela 24), graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 39).

Tabela 24. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 4,8 e T=57,5°C (atividade inicial= 18,57UI/mL).

Tempo (h)	v (UI/mL)	ln (v/v₀)
0,25	12,11	-0,4275
0,5	10,45	-0,5749
1,0	8,17	-0,8211
1,5	7,06	-0,9671

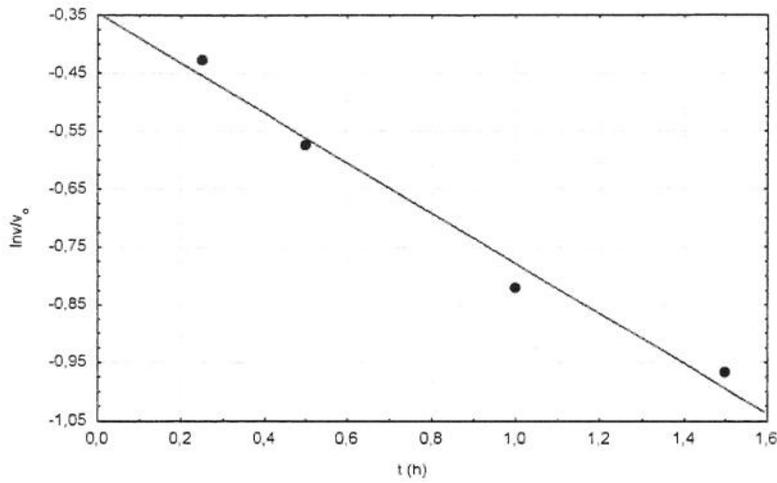


Figura 39. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 57,5°C.

Inulinase a T= 60°C

A enzima foi incubada em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 e manteve sua atividade durante 15 minutos. Após transcorrido este tempo verificou-se que a enzima começou a desnaturar rapidamente, perdendo praticamente toda a atividade em 75 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 25. A partir dos resultados obtidos, calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 40).

Tabela 25. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 4,8 e T=60°C (atividade inicial= 18,57UI/mL).

Tempo (h)	v (UI/mL)	ln (v/v₀)
0,25	13,19	-0,3420
0,5	7,89	-0,8559
0,75	4,73	-1,3676
1,0	3,60	-1,6406
1,25	1,57	-2,4705

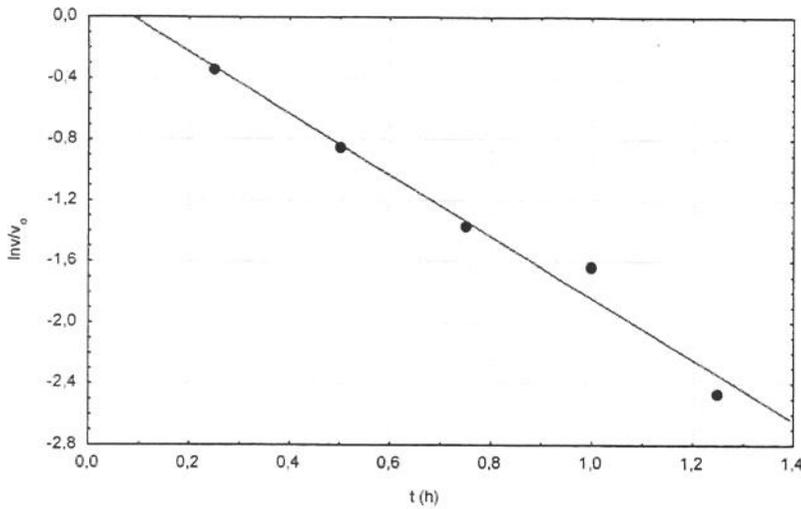


Figura 40. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase, para o cálculo da constante de desativação térmica a 60°C.

Inulinase a T= 65°C e 70°C

A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, incubada a 65°C, com 30 minutos observou-se a perda da atividade. A 70°C, a enzima sofreu desnaturação após 15 segundos de incubação. Na Tabela 26 estão apresentados os resultados referentes a temperatura de 65°C.

Tabela 26. Atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação, para a enzima livre, a pH 5,0 e T=65°C (atividade inicial= 18,57UI/mL).

Tempo (h)	v (UI/mL)	ln (v/v₀)
0,5	6,94	0,9987
0,75	0,979	2,9427
1,0	0	*

Com os valores de k_d em função da temperatura (Tabela 27), graficou-se $\ln k_d$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação (E_d), como descrito na Equação 21.

$$\ln k_d = \ln k_{d0} - \frac{E_d}{RT} \quad (21)$$

A partir da inclinação da reta da Figura 41 obtêm-se o valor de E_d que, neste caso é igual a 127,66 Kcal/mol.

Então os valores finais para os parâmetros do modelo são:

$$E_a = 16,42 \text{ Kcal/mol}$$

$$E_d = 127,66 \text{ Kcal/mol}$$

$$k_o = 2,09 \cdot 10^{82}$$

$$v_o = 1,82 \cdot 10^{11}$$

Tabela 27. Valores de k_d em função da temperatura para enzima livre.

Temperatura (°C)	k_d (h)
50	0,0031
52,5	0,0688
55	0,1256
57,5	0,4325
60	2,0166

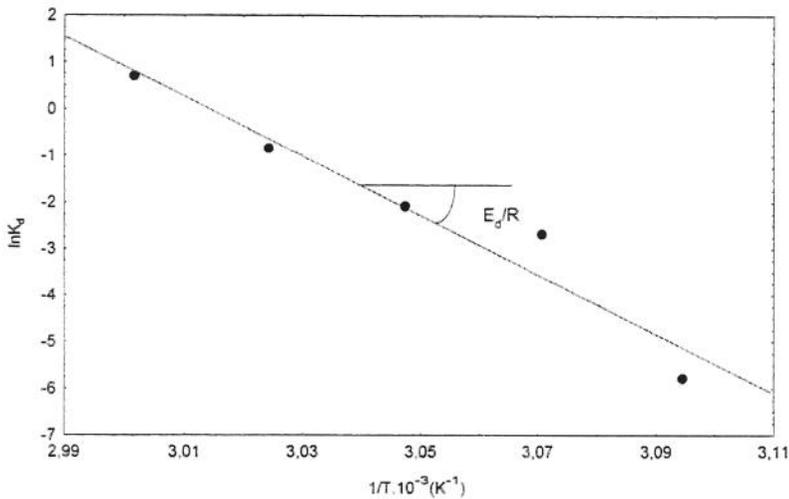


Figura 41. Determinação da energia de ativação da reação de desnaturação da enzima (E_d).

b) Enzima imobilizada

- Cálculo da energia de ativação (E_a)

Utilizando o mesmo procedimento da enzima livre para o cálculo da energia de ativação, calculou-se a energia de ativação para a enzima imobilizada.

Na Tabela 28 estão apresentados os resultados experimentais para o cálculo da energia de ativação para a enzima imobilizada em alginato de cálcio. Para o cálculo da energia de ativação foi construído o gráfico $\ln v/v_0$ em função do inverso da temperatura (Figura 42).

Tabela 28. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, em função da temperatura. Atividade inicial: $v_0 = 1,2821$ UI/mL.

Temp. ($^{\circ}$ C)	Temp. (K)	Temp. ($1/T$). 10^{-3} (K^{-1})	v (UI/mL)	$\ln(v/v_0)$
20,0	293,15	3,4	0,098	-2,57
25,0	298,15	3,35	0,163	-2,06
30,0	303,15	3,30	0,325	-1,37
32,5	303,65	3,3	0,279	-1,53
35,0	308,15	3,25	0,423	-1,11
37,5	310,65	3,22	0,495	-0,95
40,0	313,15	3,19	0,573	-0,81
45,0	318,15	3,14	0,664	-0,66

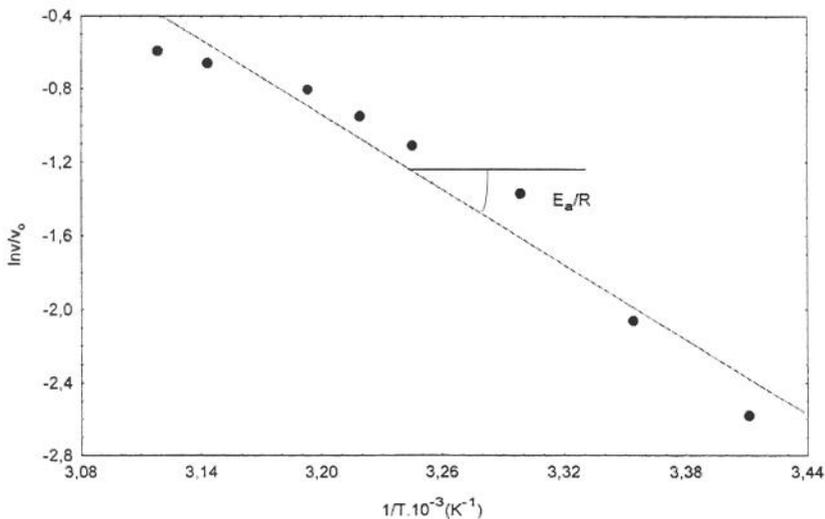


Figura 42. Efeito da temperatura na atividade enzimática da inulinase imobilizada, para o cálculo da energia de ativação.

Com a equação linearizada de Arrhenius (Equação 12) aplicada aos resultados da Tabela 28, determinou-se para energia de ativação da reação o valor de 13,53 kcal/mol.

- **Cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação (E_d)**

Da mesma forma que foi calculada a energia de desnaturação para a enzima livre, calculou-se a E_d para a enzima na forma imobilizada.

O estudo da estabilidade térmica da inulinase imobilizada foi realizado incubando a solução em tampão acetato 0,1M em diferentes valores de temperaturas. As amostras foram retiradas em intervalos de tempos pré-determinados e em seguida determinou-se a atividade enzimática. A partir da desativação térmica pode-se calcular as constantes de desativação térmica, para o cálculo da energia de desnaturação (E_d) e meia-vida.

Analisando os resultados obtidos (Tabelas 29 a 34), a desativação térmica é bastante sensível à temperatura. Pequenas variações de temperatura promovem grandes variações na estabilidade da inulinase. É importante verificar que a 45°C a enzima apresenta uma estabilidade de 43 horas (Tabela 31). Lorenço (tese em andamento) estudou a estabilidade da inulinase *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* e encontrou uma meia vida de 15 dias a 50°C, imobilizando a enzima com alginato de cálcio, carvão ativado, glutaraldeído e sacarose.

Inulinase a 40°C

A enzima imobilizada foi incubada a 40°C em tampão acetato 0,1 M pH 4,8 durante um período de 51 horas. Verificou-se que nesta temperatura a enzima manteve uma boa estabilidade durante todo o período de análise, perdendo em torno de 28% da sua atividade em 51 horas. Os resultados são apresentados na Tabela 29. A partir dos resultados obtidos, calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 43).

Tabela 29. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e $T = 40^{\circ}\text{C}$. Atividade inicial : $v_0 = 2,11 \text{ UI/mL}$

Tempo (h)	$v(\text{UI/mL})$	$\ln(v/v_0)$
1,0	2,273	0,07
2,0	2,197	0,04
4,0	2,059	-0,02
9,0	1,988	-0,06
11,0	2,136	0,01
18,0	2,003	-0,05
22,0	1,830	-0,14
25,0	1,855	-0,13
30,0	1,828	-0,14
44,0	1,804	-0,16
51,0	1,626	-0,26

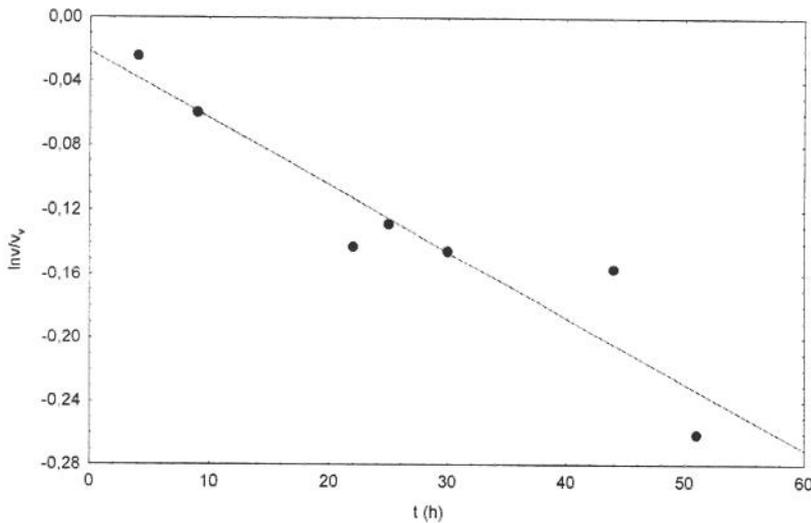


Figura 43. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (k_d) a 40°C .

Inulinase a $42,5^{\circ}\text{C}$

A enzima foi incubada a $42,5^{\circ}\text{C}$ em tampão acetato 0,1M a pH 4,8 durante um tempo de 49 horas. Pode-se verificar que nesta temperatura a enzima praticamente não perde atividade nas 16 horas de incubação. No tempo de 49 horas manteve 60% da sua atividade. Resultados apresentados na Tabela 30. A partir dos resultados obtidos, calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 44).

Tabela 30. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e $T = 42,5^{\circ}\text{C}$. Atividade inicial: $v_0 = 2,46 \text{ UI/mL}$.

Tempo (h)	$v(\text{UI/mL})$	$\ln(v/v_0)$
1,0	2,23	-0,09
3,0	2,47	0,004
5,0	2,16	-0,13
7,0	2,18	-0,12
9,0	2,31	-0,06
14,0	1,96	-0,23
16,0	1,87	-0,27
20,0	1,42	-0,55
23,0	1,91	-0,25
27,0	1,56	-0,46
30,0	1,51	-0,49
49,0	1,43	-0,54

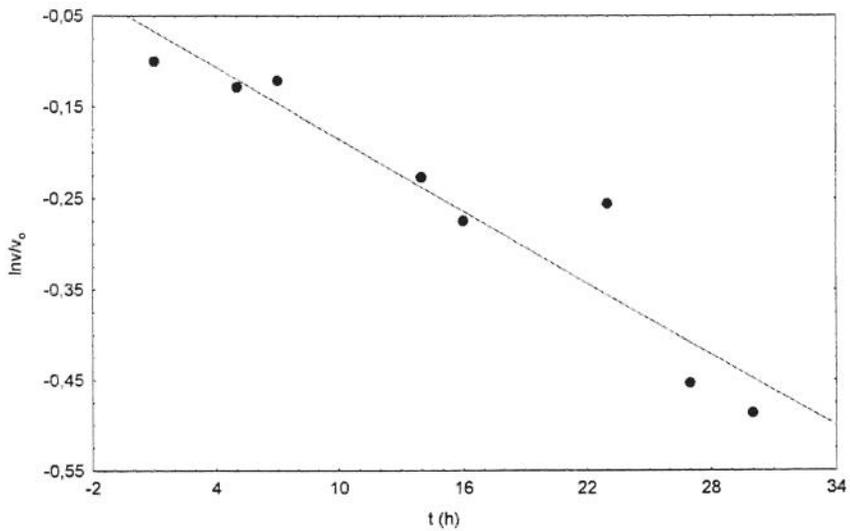


Figura 44. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (k_d) a $42,5^{\circ}\text{C}$.

Inulinase a 45°C

A enzima imobilizada foi incubada a 45°C em tampão acetato 0,1M a pH 4,8. Nesta temperatura a enzima apresentou um comportamento similar quando comparada a

temperatura de 40 e 42,5°C. A enzima imobilizada permaneceu estável nas 12 horas iniciais, retendo 60% da sua atividade com 43,5 horas de incubação. A partir dos resultados obtidos (Tabela 31), calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 45).

Tabela 31. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 45°C. Atividade inicial : $v_0 = 2,00$ UI/mL

Tempo (h)	v(UI/mL)	$\ln(v/v_0)$
2,0	1,83	-0,09
4,0	1,84	-0,08
8,0	1,52	-0,27
10,0	1,56	-0,25
12,0	1,70	-0,16
23,0	1,35	-0,39
28,5	1,28	-0,45
43,5	1,21	-0,51

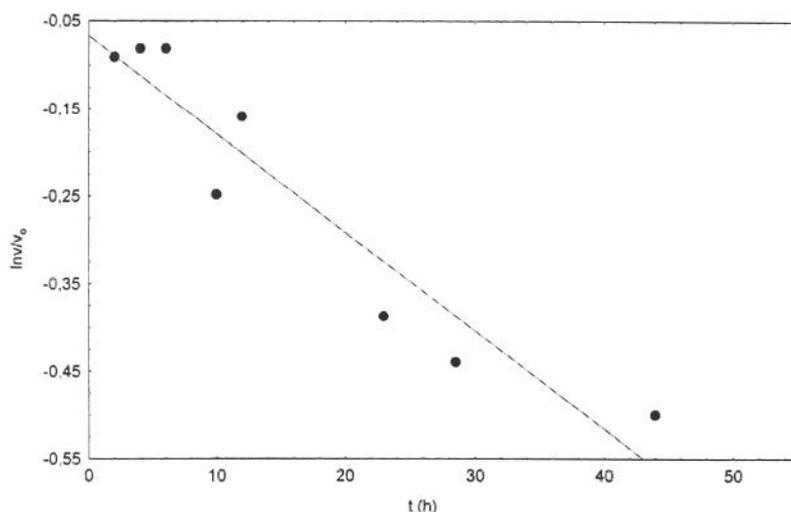


Figura 45. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (k_d) a 45°C.

Inulinase a 47,5°C

A enzima imobilizada foi incubada a 47,5°C em tampão acetato 0,1M a pH 4,8. Nesta temperatura a desnaturação da mesma ocorreu após 6 horas de incubação. A enzima

imobilizada permaneceu estável nas 6 horas iniciais com 73% da sua atividade. A partir dos resultados obtidos (Tabela 32), calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 46).

Tabela 32. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e $T = 47,5^\circ\text{C}$. Atividade inicial: $v_0 = 1,69 \text{ UI/mL}$.

Tempo (h)	$v(\text{UI/mL})$	$\ln v/v_0$
1,0	1,52	-0,11
2,0	1,41	-0,18
3,0	1,31	-0,25
4,0	1,16	-0,38
5,0	1,12	-0,41
6,0	1,13	-0,40
7,0	0,96	-0,57
8,0	0,95	-0,58
9,0	0,86	-0,68
10,0	0,78	-0,77
11,0	0,70	-0,88
12,0	0,68	-0,91

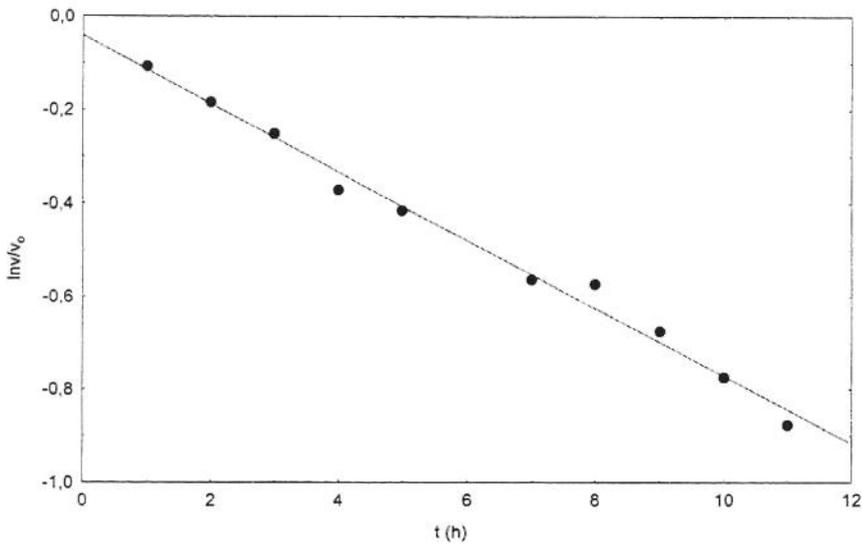


Figura 46. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (k_d) a $47,5^\circ\text{C}$.

Inulinase a 50°C

A enzima imobilizada foi incubada a 50°C em tampão acetato 0,1M a pH 4,8. Nesta temperatura a desnaturação da enzima é observada com 12 horas de incubação, mantendo

14% da sua atividade. A partir dos resultados obtidos (Tabela 33), calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 47).

Tabela 33. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e $T = 50^\circ\text{C}$. Atividade inicial : $v_0 = 2,00 \text{ UI/mL}$

Tempo (h)	$v(\text{UI/mL})$	$\ln v(v/v_0)$
2,0	1,48	-0,30
4,0	1,28	-0,45
6,0	1,13	-0,57
8,0	0,86	-0,84
10,0	0,71	-1,03
12,0	0,58	-1,24

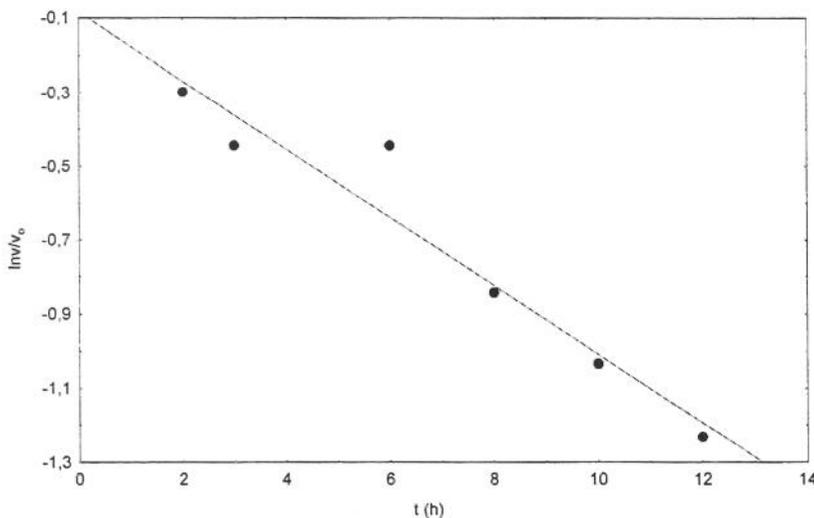


Figura 47. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (k_d) a 50°C .

Inulinase a $T=52,5^\circ\text{C}$

Enzima imobilizada foi incubada a $52,5^\circ\text{C}$ em tampão acetato 0,1M a pH 4,8. A desnaturação da enzima foi verificada com apenas 3 horas de incubação, mantendo

30% da sua atividade. A partir dos resultados obtidos (Tabela 34), calculou-se a constante de desnaturação (k_d) graficando $\ln v/v_0$ em função do tempo utilizando equação de Arrhenius linearizada (Figura 48).

Tabela 34. Atividade enzimática da inulinase imobilizada em alginato de cálcio, a pH 4,8 e T = 52,5°C. Atividade inicial : $v_0 = 2,3$ UI/mL

Tempo (h)	v(UI/mL)	$\ln(v/v_0)$
0,5	1,75	-0,27
1,0	1,42	-0,48
1,5	1,21	-0,64
2,5	0,82	-1,03
3,0	0,69	1,20

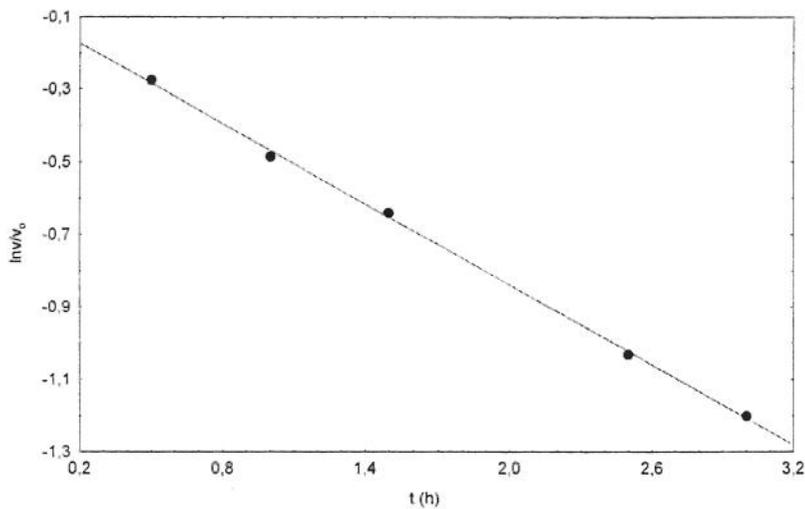


Figura 48. Efeito da temperatura em função do tempo na atividade da inulinase imobilizada, para o cálculo da constante de desativação (k_d) a 52,5°C.

Os valores de K_d em função da temperatura estão apresentados na Tabela 35. Para o cálculo de E_d , graficou-se $\ln k_d$ em função do inverso da temperatura (Figura 49) como descrito na equação 22.

$$\ln k_d = \ln k_{d0} - \frac{E_d}{RT} \quad (22)$$

A partir da inclinação da reta da Figura 49 obtêm-se o valor de E_d é igual a 74,50 Kcal/mol.

Então os valores finais para os parâmetros do modelo são:

$$E_a = 13,53 \text{ Kcal/mol}$$

$$E_d = 74,50 \text{ Kcal/mol}$$

$$k_0 = 5,95 \cdot 10^{49}$$

$$v_0 = 1,13 \cdot 10^9$$

Tabela 35. Valores de K_d em função da temperatura utilizada para enzima imobilizada

Temperatura (°C)	k_d (h)
40	0,0005
42,5	0,0093
45	0,0145
47,5	0,0732
50	0,0959
52,5	0,3688

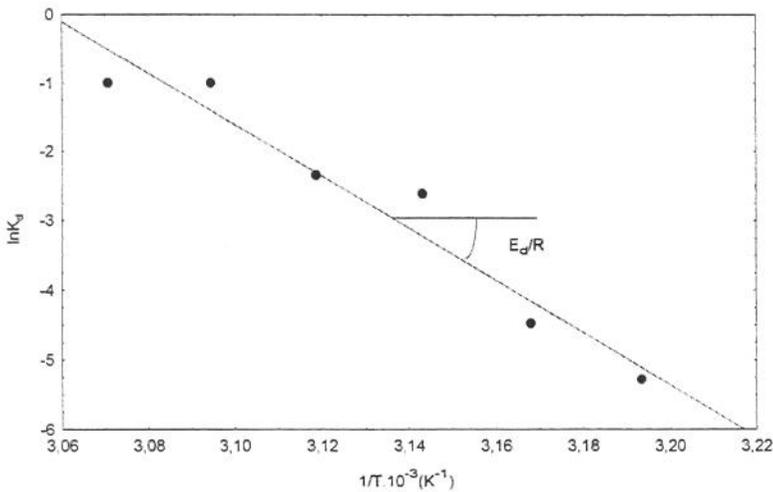


Figura 49. Determinação da energia de ativação da reação de desnaturação da enzima (E_d), para a enzima imobilizada.

c) Ajuste dos parâmetros do modelo para a enzima livre e imobilizada

Utilizando a metodologia de regressão não-linear, os parâmetros obtidos anteriormente foram ajustados para obter uma melhor representação entre os dados experimentais e do modelo.

As Figuras 50 e 51 mostram os ajustes encontrados para a enzima nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio utilizando a Equação 19.

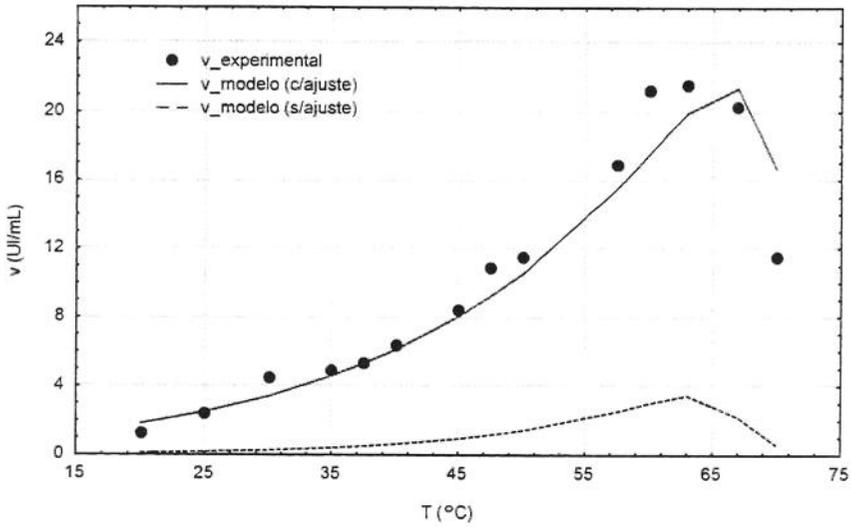


Figura 50. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo para atividades da enzima livre.

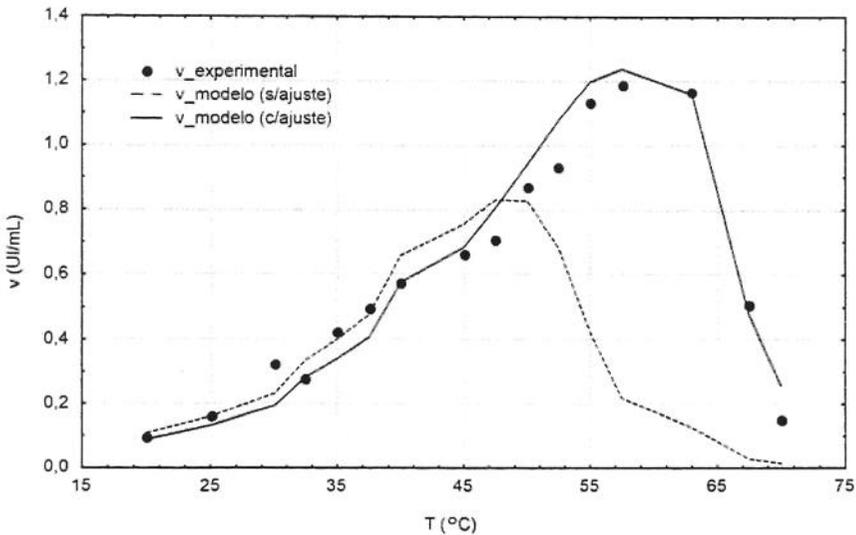


Figura 51. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo para atividades da enzima imobilizada.

Na Tabela 36 estão apresentados os valores dos parâmetros ajustados e experimentais.

Tabela 36. Valores dos parâmetros do modelo antes e após o ajuste por regressão não-linear

	Enzima Livre		Enzima Imobilizada	
	experimental	ajustados	experimental	ajustados
E_a (Kcal/mol)	16,42	10,99	13,53	13,89
E_d (Kcal/mol)	127,66	106,15	74,50	71,33
k_o (h^{-1})	$2,09 \cdot 10^{82}$	$4,85 \cdot 10^{67}$	$5,95 \cdot 10^{49}$	$3,01 \cdot 10^{46}$
v_o (UI/mL)	$1,82 \cdot 10^{11}$	$2,89 \cdot 10^8$	$1,13 \cdot 10^9$	$2,02 \cdot 10^9$

Analisando-se os resultados obtidos na Tabela 36, pode-se verificar que em relação à enzima imobilizada não foram observadas variações significativas na energia de ativação (E_a) e na energia de ativação para a reação de desnaturação (E_d), entre os valores experimentais e os ajustados com regressão não linear. Entretanto, o mesmo não foi observado para a energia de ativação da enzima na forma livre onde se verificou uma diferença de 33% para a energia de ativação e 17% para a energia de ativação para a reação de desnaturação, entre os parâmetros experimentais e os ajustados com regressão não linear.

4.4.7.2. Estimativa da meia vida da enzima em função da temperatura

A meia vida da enzima pode ser obtida a partir da Equação 19, substituindo a concentração de enzima ativa E por $E_o/2$. Então a Equação 19 transforma-se na Equação 23.

$$\ln\left(\frac{E_o/2}{E}\right) = -k_d t_{1/2} \quad (23)$$

ou seja,

$$t_{1/2} = \frac{0,69}{k_d}$$

Porém k_d é previsto pela Equação 17, e a Equação 19 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$t_{1/2} = \frac{0,69}{k_{do} \cdot e^{-\frac{E_d}{RT}}} \quad (24)$$

A partir da Equação 24 construiu-se a Tabela 37 e Figura 47 para a enzima na forma livre e a Tabela 38 e Figura 48 para a enzima na forma imobilizada.

Tabela 37. Valores de meia-vida para inulinase livre.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ (h)_exp.	$t_{1/2}$ (h)_modelo
50,0	228,8	236,73
52,5	10,0	53,75
55,0	5,49	12,48
57,5	1,59	2,96
60,0	0,34	0,72

Tabela 38. Valores de meia-vida para inulinase imobilizada.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)_modelo
40,0	138,00	134,26
42,5	74,19	52,00
45,0	47,59	20,46
47,5	9,43	8,16
50,0	7,26	3,30
52,5	1,87	1,36

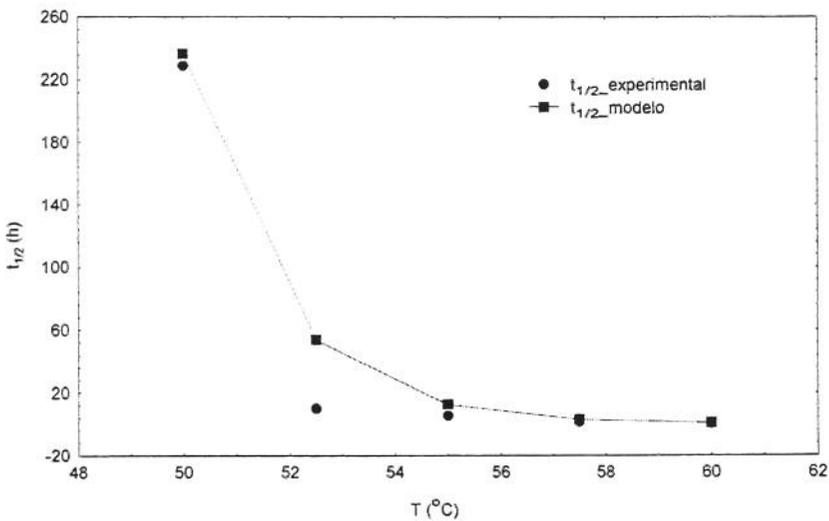


Figura 52. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo matemático para valores de meia-vida para enzima livre.

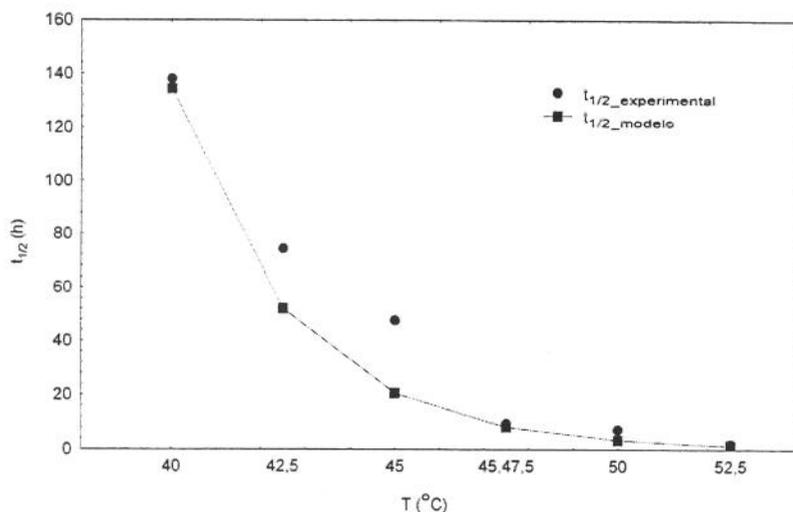


Figura 53. Comparação entre os resultados experimentais e do modelo matemático para valores de meia-vida para enzima imobilizada.

4.4.7.3. Temperatura de processo

Nos processos industriais é importante o conhecimento da temperatura de processo, ou seja a temperatura de compromisso entre a produtividade e a estabilidade, correspondendo assim, à temperatura ideal de trabalho. A temperatura de processo pode ser estimada a partir das curvas de meia vida, Equação 24 e atividade em função da temperatura, como ilustrado nas Figuras 54 e 55. A partir destas figuras, pode-se considerar como temperatura ideal de processo os valores de temperatura correspondentes aos pontos onde as duas curvas se cruzam.

De acordo com a Figura 54 podemos verificar que para a enzima livre a temperatura de processo encontrada ficou em torno de 53°C . E para a enzima imobilizada a temperatura de processo fica em torno de 45°C . Estes valores são bastante interessantes levando em conta que o estudo de síntese de oligossacarídeos é realizada a temperatura de 50°C .

Para a enzima livre, na temperatura de processo a atividade enzimática seria em torno de 60% da atividade máxima da enzima, enquanto que a meia vida seria em torno de 120 vezes maior. Para a enzima imobilizada, ter-se-ia 60% da atividade máxima e uma meia vida 75 vezes maior.

O aumento da meia vida na temperatura de processo representa um ganho muito grande no tempo de utilização da enzima, o que economicamente é de grande importância, ao passo que a perda de atividade, por se estar operando em temperaturas abaixo da

temperatura ótima pode ser compensada pela carga de uma concentração maior de enzima, não prejudicando, portanto, a produtividade.

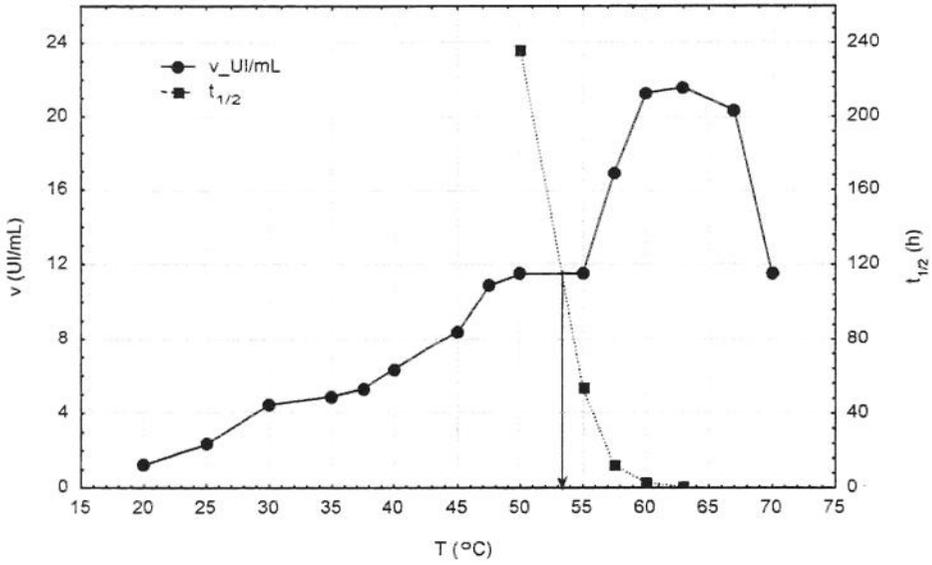


Figura 54. Perfil da temperatura em função da meia-vida e atividade enzimática da enzima livre para determinação da $T_{processo}$

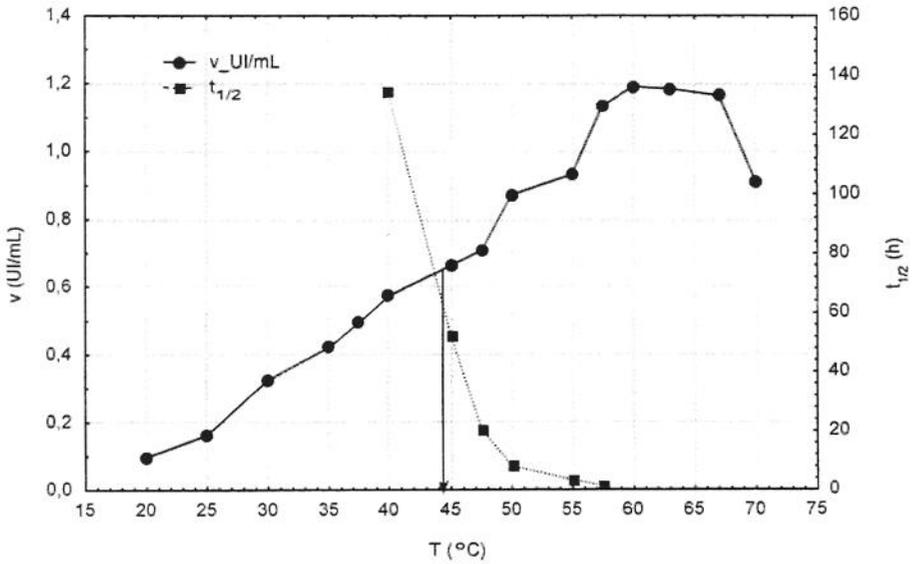


Figura 55. Perfil da temperatura em função da meia-vida e atividade enzimática da enzima imobilizada para determinação da $T_{processo}$

4.5. Estudo cinético

A cinética da inulinase livre e imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* pode ser descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, Equação 25.

$$-\frac{dS}{dt} = v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad (25)$$

V_{\max} = velocidade máxima de reação

K_m = constante de Michaelis-Menten

v = taxa da velocidade de reação

S = concentração do substrato

Para reações que ocorrem a baixas concentrações de sacarose (até 0,3 mol/L, aproximadamente), a cinética segue o modelo de Michaelis-Menten. Entretanto, para soluções de sacarose mais concentradas verifica-se o fenômeno de inibição pelo substrato (Sant'Anna, 1989). A relação entre a taxa de reação e a concentração do substrato é dada pela Equação 26.

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (26)$$

Para reações que ocorrem a baixas concentrações de substrato, quando $S \ll K_i$ a Equação 26, na forma linearizada é apresentada na Equação 27.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (27)$$

para altas concentrações, quando $S \gg K_m$, na Equação 28

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max} K_i} \cdot S \quad (28)$$

Experimentalmente, pode-se verificar que o modelo de inibição pelo substrato, não é suficiente para descrever o comportamento de inibição. As taxas de reações iniciais observadas em altas concentrações de sacarose são inferiores às taxas previstas pelo modelo. Bowski *et al.*, (1971) estudaram o comportamento deste desvio, considerando

como correção do modelo os efeitos da mudança do coeficiente de difusão molecular da sacarose, viscosidade e concentração de água livre. O ajuste do modelo cinético foi obtido quando se considerou um fator de correção em termos de água livre sobre o modelo de inibição por excesso de substrato. Cabral (1989) e Ribeiro (1989) estudaram o efeito da inibição pelo substrato utilizando sacarose com invertase comercial e ajustou seus dados experimentais de taxas iniciais pelo o modelo de inibição corrigido por um fator $f(S)$, para $T= 50^{\circ}\text{C}$, definido pela Equação (29).

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_0} = 1 - 0,4274 \frac{S}{1 + 0,1275.S} \quad (29)$$

onde: $D(S)$ = difusividade molecular da sacarose à concentração S .

D_0 = difusividade molecular da sacarose à diluição infinita.

Desta forma a equação da velocidade de reação poderá ser escrita da seguinte forma:

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \cdot f(S) \quad (30)$$

A relação $D(S)/D_0$ foi derivada a 40 e 50°C baseando-se em dados experimentais de $D(S)$, obtidos por English & Dole (Citato por Cabral, 1989) em que $D(S)$ decresce linearmente com a concentração de sacarose.

Desta forma, as taxas iniciais de reação observadas experimentalmente (v_{obs}), com aquelas previstas pelo modelo (v^*) podem ser relacionadas e aplicadas no modelo de inibição pelo substrato (Equação 26) e a constante de inibição K_i determinada.

a) Enzima livre

Para o estudo da influência da concentração inicial da sacarose, a inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* foi incubada em diferentes concentrações de sacarose (0,5-700g/L), diluída em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 e $T=50^{\circ}\text{C}$. Em seguida determinou-se as velocidades iniciais para o cálculo das constantes cinéticas. Os resultados experimentais de velocidades iniciais estão apresentados na Tabela 39 e Figura 56.

Tabela 39. Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração de sacarose (S).

S(g/L)	S(mol/L)	v(UI/mL)
0,5	0,00146	6,8
0,75	0,00219	7,14
1,0	0,00292	8,98
1,5	0,00438	14,21
2,0	0,00584	20,67
3,0	0,00877	26,39
4,0	0,01169	29,45
5,0	0,01461	39,45
7,5	0,0219	41,96
10	0,0292	44,28
15	0,0438	47,67
20	0,0584	52,71
25	0,0731	53,73
30	0,0876	54,21
35	0,1023	54,34
50	0,1421	48,09
70	0,2046	47,09
100	0,2922	40,14
200	0,5845	36,61
300	0,8767	31,61
500	1,4611	2,03
700	2,0456	0,97

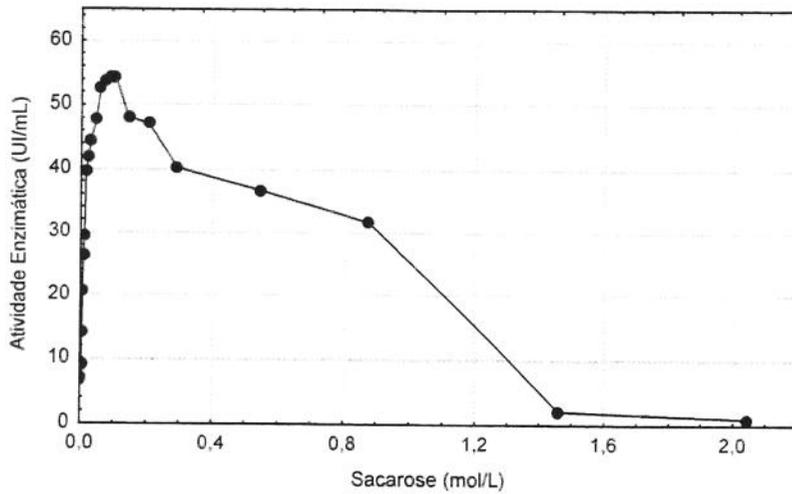


Figura 56. Velocidade de reação da inulinase livre a $T=50^{\circ}\text{C}$, em função da concentração de substrato.

Verifica-se pela Figura 56, que a atividade enzimática da inulinase começa diminuir a partir de 35 g/L ($0,1023\text{ M}$). Este decréscimo da atividade é caracterizado pela inibição pelo substrato sacarose que a enzima sofre a partir de uma determinada concentração.

Após a obtenção dos dados experimentais das taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato foram determinadas as constantes cinéticas. Inicialmente tentou-se aplicar o modelo de inibição pelo excesso de substrato (Equação 30), graficando-se os dados da Tabela 39, na forma de Lineweaver-Burk, para baixas e altas concentrações com o objetivo de descrever a cinética de hidrólise da sacarose por inulinase.

Os dados experimentais das taxas iniciais de reação das Tabelas 40 e 41 foram graficados na forma de Lineweaver-Burk para baixas e altas concentrações (Figura 57 e Figura 58).

Tabela 40. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo de Michaelis-Menten para taxas iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T=50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_i$.

$1/S$ (L/mol)	$1/v$ (L/UI)
454,55	0,140
344,83	0,111
136,99	0,040
114,94	0,038
85,47	0,034
68,49	0,025
45,66	0,024
34,48	0,023

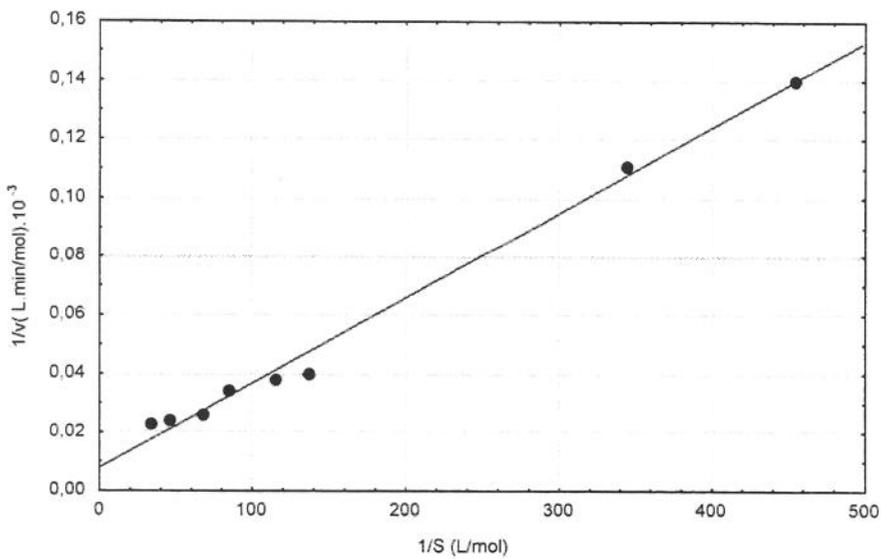


Figura 57. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, a $T=50^{\circ}\text{C}$, $S \ll K_i$.

Tabela 41. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo cinético para velocidades iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T=50^{\circ}\text{C}$, para $S \gg K_m$.

$1/v$ (L/UI)	S (L/mol)
0,0438	0,021
0,054	0,019
0,073	0,019
0,0876	0,018
0,1022	0,018
0,1461	0,021
0,2041	0,021
0,2921	0,025
0,5843	0,033
0,8764	0,032
1,4607	0,493
2,0459	1,031

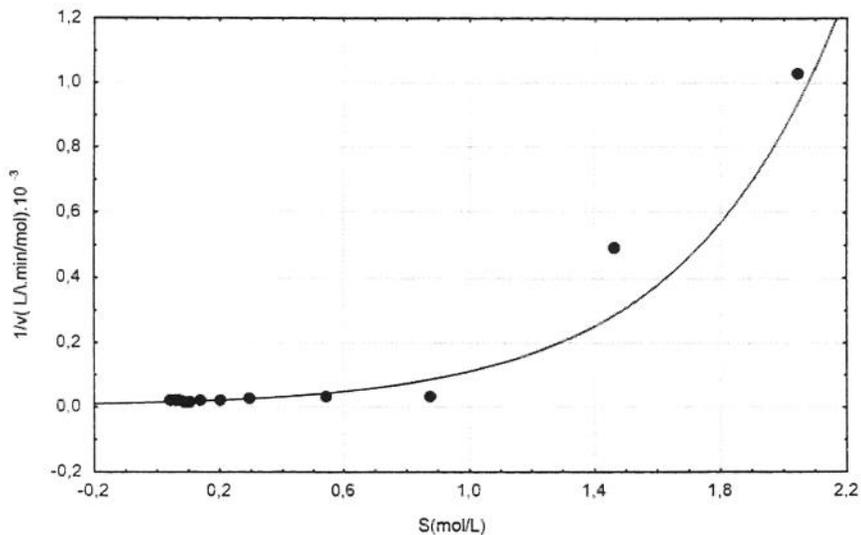


Figura 58. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, a $T=50^{\circ}\text{C}$, $S \gg K_m$

De acordo com os gráficos da equação de Lineweaver-Burk representados nas Figuras 57 e 58 verifica-se que para baixas concentrações o modelo apresentou um bom ajuste (Figura 57). Entretanto, para altas concentrações de substrato (Figura 58) não foi

verificado um ajuste do modelo de inibição pelo substrato. Assim, podemos concluir que o modelo de inibição pelo substrato por si só não é adequado para descrever a cinética da inulinase para altas concentrações de sacarose. Straathof *et al.*, (1986), quando estudaram a cinética da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* verificaram que a enzima apresentava um desvio da cinética de Michaelis-Menten, pois, com o aumento da concentração de sacarose ocorria um decréscimo da taxa de hidrólise que poderia estar relacionado com o decréscimo da concentração de água agregada à molécula da sacarose.

Desta maneira, para determinar o modelo cinético, considerou-se uma cinética de inibição pelo substrato, porém com adição de um fator de correção $f(S)$. A equação da cinética de inibição pelo substrato com fator pode ser escrita da seguinte da Equação 31.

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \cdot f(S) \quad (31)$$

Rearranjando tem-se:

$$\frac{f(S)}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S}, \text{ para } S \ll K_i \quad (32)$$

$$\frac{f(S)}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{K_i V_{\max}} \cdot S, \text{ para } S \gg K_m \quad (33)$$

Algumas considerações foram feitas em relação ao fator $f(S)$ (ANEXO 1) e a partir destas considerações utilizou-se a que apresentou um melhor ajuste. Os dados estão apresentados na Tabela 41.

Quando se considera o efeito da concentração de água livre, surgem algumas complicações, já que esta é função do número de hidratação (n) das moléculas de sacarose, devendo, portanto, conhecer-se inicialmente o número de hidratação e sua variação com a concentração. Entretanto, alguns valores apresentados diferem significativamente entre si, como mostrado por Allen & Wood (1974) e Bowski *et al.* (1971), que assumiram um número de hidratação igual a sete, para soluções diluídas. Para soluções concentradas, o valor foi determinado de tal forma que apresentasse um bom ajuste em relação aos dados experimentais.

Para o ajuste da Equação (26), utilizou-se o fator de correção $f(S) = D(S)/D_0$. Neste caso pode-se determinar os valores de $f(S)$ para cada concentração utilizada no experimento. As velocidades iniciais foram recalculadas, onde y corresponde a velocidade inicial corrigida ($y = v/f(S)$).

Tabela 42. Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração de sacarose (S).

S(g/L)	S(mol/L)	v(UI/mL)	y(UI/mL)*
0,5	0,00146	6,80	6,80
0,75	0,00219	7,14	7,14
1,0	0,00292	8,98	8,99
1,5	0,00438	14,21	20,72
2,0	0,00584	20,67	24,54
3,0	0,00877	26,39	26,46
4,0	0,01169	29,45	29,59
5,0	0,01461	39,45	39,68
7,5	0,0219	41,96	42,36
10	0,0292	44,28	44,84
15	0,0438	47,67	48,59
20	0,0584	52,71	54,06
25	0,0731	53,73	55,46
30	0,0876	54,21	56,31
35	0,1023	54,34	56,82
50	0,1421	48,09	51,29
70	0,2046	47,09	51,59
100	0,2922	40,14	45,86
200	0,5845	36,61	48,79
300	0,8767	31,61	50,54
500	1,4611	2,03	5,403
700	2,0456	0,97	7,723

***valores de velocidades iniciais de reação corrigidos**

A partir dos novos valores corrigidos da atividade enzimática, efetuou-se a linearização para o cálculo da constante de inibição (Tabela 43 e Figura 59).

Tabela 43. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo cinético para velocidades iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_i$.

$1/v$ (L./UD)	S (L/mol)
0,054	0,019
0,073	0,019
0,0876	0,019
0,1022	0,019
0,1461	0,022
0,2041	0,023
0,2921	0,028
0,5843	0,044
0,8764	0,0051

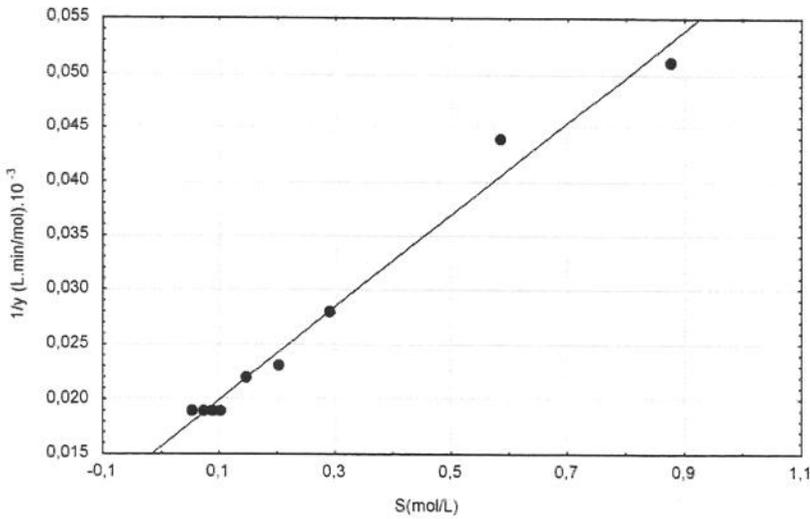


Figura 59. Cinética enzimática da inulinase purificada livre, a $T= 50^{\circ}\text{C}$, $S \gg K_m$, para determinação de K_i .

Pela análise da Figura 59, verifica-se que o modelo corrigido pelo fator $f(S)$ apresenta um bom ajuste em relação aos dados experimentais.

Para o cálculo das constantes de Michaelis-Menten e V_{\max} , partiu-se da Equação 32 e Figura 57. Para determinação da constante de inibição utilizou-se a Equação 33 e Figura 59. Os valores obtidos para as constantes cinéticas da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foram $K_m = 0,0389$ M, $V_{\max} = 126,87 \cdot 10^{-9}$ mol/min.L e $K_i = 0,3855$ M.

Contieiro (1992) para inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* onde obteve os seguintes valores cinéticos: 2037 UI/mL para V_{\max} , 0,662 mol/L para K_m . Ribeiro (1989) para invertase comercial (Novo Ferment) obteve os seguintes valores cinéticos: $K_m = 0,024$ mol/L, $V_{\max} = 11,064 \mu\text{mol}/\text{min}$ e $K_i = 0,275$ mol/L. Cruz-Guerrero *et al.* (1995), para inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278, encontrou os valores de K_m 3,04 mM para inulina e 40,18 mM para sacarose como substrato. Azhari *et al.* (1989) para inulinase de *Aspergillus niger* encontrou $K_m = 570$ mM (endo-inulinase) e $K_m = 60$ mM (exo-inulinase).

b) Enzima imobilizada

Para o estudo da influência da concentração inicial da sacarose, a inulinase purificada e imobilizada em alginato de cálcio foi incubada em diferentes concentrações de sacarose (0,5-700g/L) e diluída em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 e $T = 50^{\circ}\text{C}$. Em seguida determinou-se as velocidades iniciais para o cálculo das constantes cinéticas. Os resultados experimentais de velocidades iniciais estão apresentados na Tabela 44 e Figura 60.

Tabela 44. Velocidades iniciais de reação (v) em função da concentração de sacarose (S).

S(g/L)	S(mol/L)	v (UI/mL)	1/S(L/mol)	1/ v
1,0	0,0029	0,9619	342,3	1,039
1,5	0,0044	1,5539	228,2	0,644
2,0	0,0058	2,015	171,1	0,496
3,0	0,0088	2,5045	114,1	0,399
4,0	0,0012	3,3583	85,56	0,298
5,0	0,0146	4,4967	68,46	0,222
7,5	0,0219	6,1474	45,64	0,163
10	0,0292	8,5949	34,23	0,116
15	0,0438	10,9287	22,82	0,092
20	0,0584	14,2869	17,12	0,067
25	0,0730	15,8807	13,69	0,063
30	0,0876	15,4823	11,41	0,065
50	0,1461	19,7901	6,85	0,051
70	0,0205	20,0432	4,890	0,049
100	0,2921	21,4098	3,420	0,047
150	0,4382	22,7763	2,280	0,044
200	0,5843	21,4097	1,710	0,047
250	0,7304	20,853	1,369	0,048
300	0,8764	19,2334	1,140	0,052
350	1,0225	19,9419	0,978	0,050
450	1,3146	18,7272	0,760	0,053
500	1,4607	17,6643	0,685	0,057
700	2,0445	12,7547	0,489	0,078

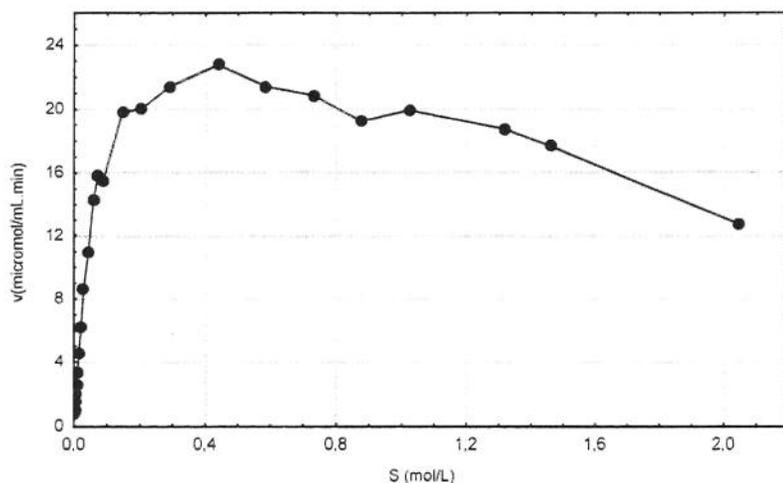


Figura 60. Velocidade de reação da inulinase imobilizada em alginato de cálcio a $T=50^{\circ}\text{C}$, em função da concentração de substrato.

As constantes K_m e V_{\max} para a inulinase imobilizada foram determinadas de forma similar à enzima livre, sendo que para a enzima imobilizada, em altas concentrações de sacarose, não foi necessário adicionar o fator de correção $f(S)$, como no caso da enzima livre.

Os resultados experimentais nas formas de $1/v$ em função de $1/S$ e $1/v$ em função de S estão apresentados na Tabela 45 e 46 e Figura 61 e 62 para o cálculo das constantes cinéticas aparentes.

Tabela 45. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo de Michaelis-Menten para taxas iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_m$.

$1/S$ (L/mol)	$1/v$ (L/UD)
342,16	1,039
228,11	0,644
171,08	0,496
114,05	0,399
85,54	0,298
68,43	0,222
45,62	0,163
34,22	0,116
22,81	0,091
17,11	0,0699
11,41	0,0645
6,85	0,0505
4,89	0,0498
3,42	0,0439

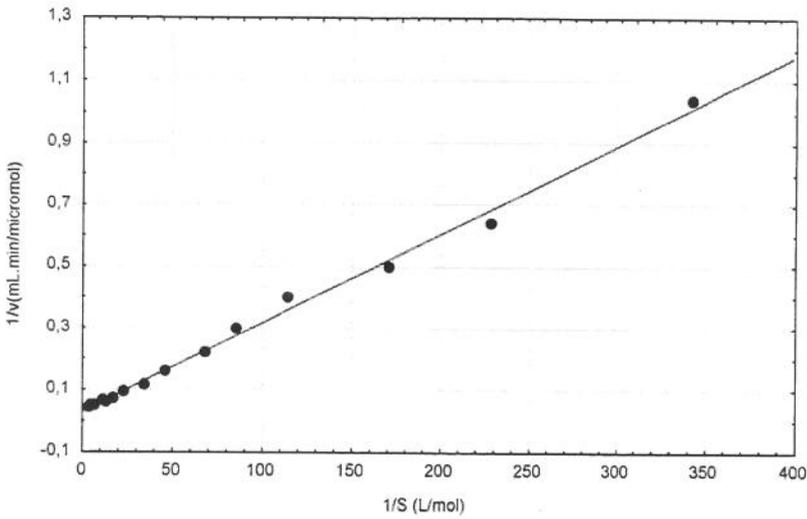


Figura 61. Velocidade de reação da inulinase imobilizada em alginato de cálcio a $T=50^{\circ}\text{C}$, em função da concentração de substrato.

Tabela 46. Forma de Lineweaver-Burk aplicada ao modelo cinético para taxas iniciais de reação para cinética de inibição pelo substrato a $T= 50^{\circ}\text{C}$, para $S \ll K_i$.

$1/v$ (L/UI)	S (L/mol)
0,0439	0,438
0,0467	0,584
0,0479	0,730
0,0519	0,876
0,0501	1,022
0,0534	1,314
0,0566	1,461
0,0784	2,045

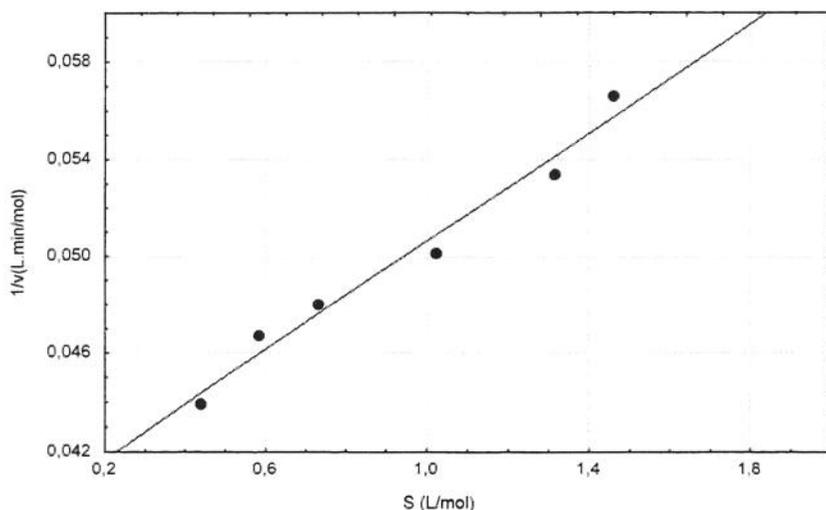


Figura 62. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para inulinase purificada de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, a $T=50^{\circ}\text{C}$, $S \gg K_m$

De acordo com a Figura 61 o modelo de inibição pelo substrato apresentou um bom ajuste sem a necessidade de adicionar um fator de correção $f(S)$ para altas concentrações de substrato, fator este necessário no ajuste da equação para a enzima livre. Assim, os valores obtidos para a enzima imobilizada foram: $K_m^{\text{ap}}=0,0969\text{M}$, $V_{\text{max}}^{\text{ap}}=33,44 \cdot 10^{-9} \text{ mol/min.L}$ e $K_i^{\text{ap}}=3.527\text{M}$.

Estes resultados foram similares aos encontrados por Cabral (1989), que estudou a cinética da invertase comercial (Novo Nordisk) imobilizada em alginato de cálcio obtendo os seguintes valores para as constantes cinéticas ($K_m=0,053 \text{ mol/L}$ e $38,17 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L.s}$). Ortega *et al* (1998), no estudo da imobilização da β -glicosidase livre ($V_{\text{max}}=202,3 \mu\text{g pNPM}^{-1}\text{gel h}^{-1}$ e $K_m=4,15 \text{ mM}$) e imobilizada ($V_{\text{max}}=130,7 \mu\text{g pNPM}^{-1}\text{gel h}^{-1}$ e $K_m= 5,0 \text{ mM}$). De acordo com os autores, esta diferença encontrada nos valores das constantes cinéticas entre a β -glicosidase livre e imobilizada deve-se ao efeito de partição interna na enzima imobilizada.

A Tabela 47 apresenta os resultados dos parâmetros da inulinase em termos de energia de ativação (E_a), energia de desativação térmica (E_d), constante de Michaelis (K_m), velocidade máxima (V_{max}) e constante de inibição (K_i).

Tabela 47. Parâmetros cinéticos para inulinase livre e imobilizada em alginato de cálcio.

Parâmetros Cinéticos	Inulinase Livre	Inulinase Imobilizada ^(a)
K_m (M)	0,0389	0,0969
K_i (M)	0,3855	3,527
V_{max} (mol/min.L). 10^{-9}	126,87	33,44

^(a) valores aparentes

A partir dos resultados da Tabela 47, verificou-se que a constante de Michaelis (K_m), aumentou de 0,0389 M para 0,0969 M. Entretanto este aumento no valor de K_m , que pode estar relacionado a um acesso restrito do substrato a enzima imobilizada no gel, foi observado por outros autores (Ortega *et al*, 1998, Cabral, 1989, Jain *et al*, 1984). Quanto à inibição pelo substrato, verifica-se um efeito menor na reação com enzima imobilizada, podendo influenciar significativamente na produção de frutooligossacarídeos em altas concentrações de sacarose. Esta diminuição da inibição do substrato na enzima imobilizada se deve principalmente à resistência difusional encontrada no interior da partícula, que diminui a velocidade de transferência de massa da sacarose, do meio externo para o interno, o que implica que a concentração de sacarose no interior das partículas é provavelmente menor que no meio exterior.

4.5.1. Modelo cinético para inulinase livre e imobilizada

As constantes cinéticas (V_{max} , K_m e K_i) determinadas experimentalmente foram utilizadas para o ajuste do modelo cinético, onde novos valores para V_{max} , K_m e K_i foram obtidos de forma tal que o modelo apresentou um melhor ajuste aos dados experimentais.

a) Enzima livre

Para o ajuste do modelo cinético da inulinase purificada e livre foi utilizado o modelo cinético, considerando a inibição pelo substrato e o fator de correção ($f(S)$). Os valores das constantes cinéticas foram inseridos na equação 47.

Os novos valores das constantes cinéticas obtidas a partir da metodologia de regressão não-linear foram: $K_m = 0,0389$ M, $K_i = 0,5857$ M e $V_{max} = 86,956 \cdot 10^{-9}$ mol/min.L.

Em seguida estes valores foram substituídos na Equação 31, obtendo o modelo dado pela Equação 34.

$$v^*(S) = 86,956 \cdot 10^{-9} \frac{S}{0,039 + S + \frac{S^2}{0,5857}} \left(1 - 0,4274 \frac{S}{1 + 0,1275 \cdot S} \right) \quad (34)$$

Na Figura 63, estão apresentados os resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S)$, para a enzima livre a 50°C.

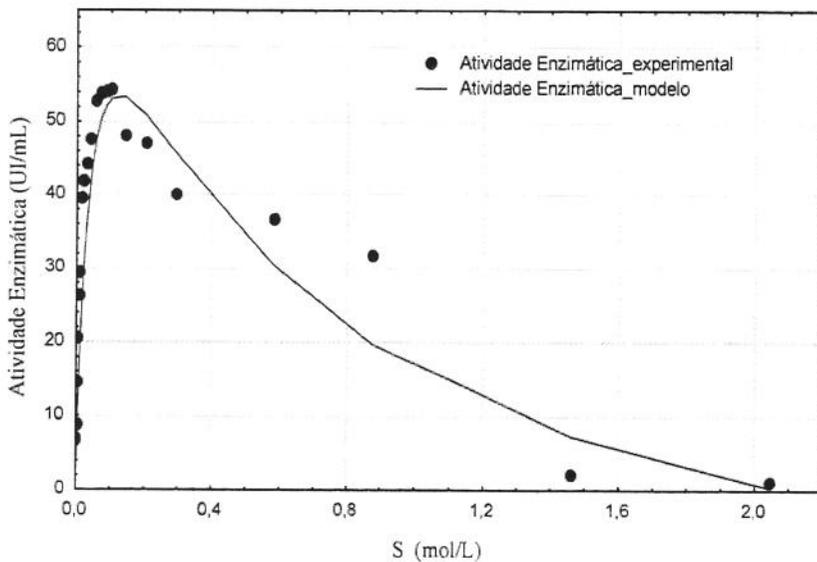


Figura 63. Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S)$ para a enzima livre, a 50°C.

Verifica-se pela Figura 63 que existe uma boa concordância entre os valores experimentais e o previsto pelo modelo cinético representado pela equação 34.

b) Enzima imobilizada

Para a inulinase imobilizada foi utilizado o modelo cinético considerando apenas a inibição pelo substrato. Inserindo os valores das constantes cinéticas experimentais ajustadas na Equação 26, podemos verificar, analisando a Figura 46, que o modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

Valores das constantes cinéticas ajustadas utilizando a metodologia de regressão não-linear foram: $K_m^{ap}=0,1070M$, $V_{max}^{ap}=36,90.10^{-9}mol/min.L$ e $K_i^{ap}=1,3548M$

Utilizando o mesmo procedimento da enzima na forma livre, onde os parâmetros cinéticos ajustados foram substituídos na equação 35 e em seguida construiu-se a Figura 46.

$$v_{obs} = 36,90.10^{-9} \frac{S}{0,1070 + S + \frac{S^2}{1,3548}} \quad (35)$$

Na Figura 46 estão apresentados os resultados experimentais e previstos pelo modelo (Equação 35), para a enzima imobilizada em alginato de cálcio a 50°C. Pode-se verificar que houve um bom ajuste entre os dados experimentais e os valores previstos pelo modelo, demonstrando a adequação do modelo, tanto para enzima imobilizada quanto para a enzima livre.

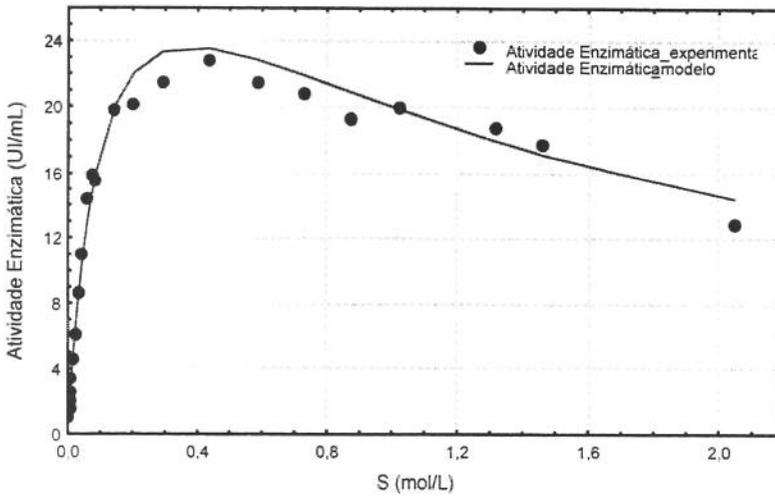
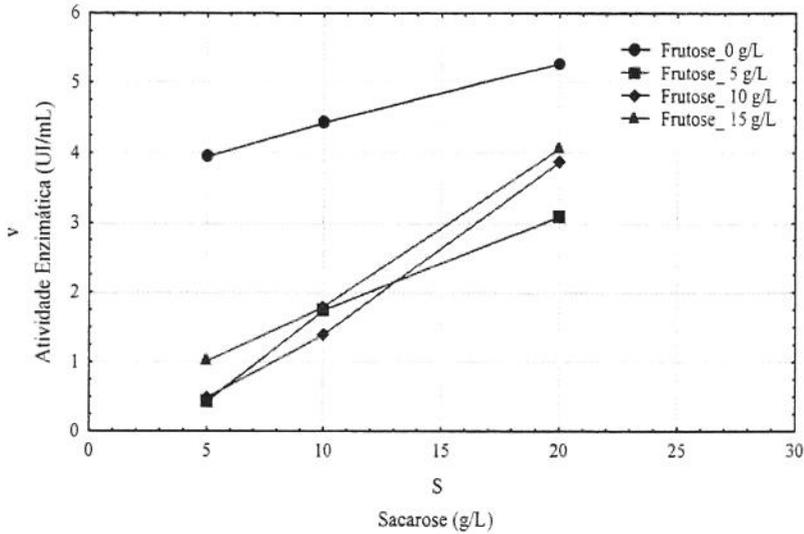


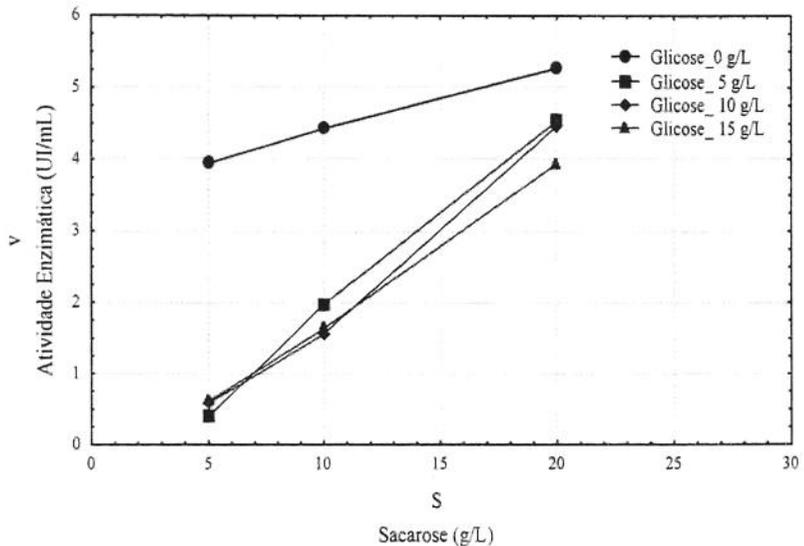
Figura 64. Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S)$ para a enzima imobilizada em alginato de cálcio a 50°C.

4.6. Estudo da influência da glicose e sacarose na velocidade inicial da inulinase

O estudo da influência das concentrações de glicose e frutose na atividade enzimática foi realizado fixando-se a concentração de glicose e frutose (5, 10 e 15g/L) e variando-se a concentração de sacarose (5, 10 e 20 g/L). Em seguida foram medidas as velocidades iniciais. Todas as análises foram realizadas em um sistema de cromatografia de íons (HPLC-PAD). Os resultados da cinética estão apresentados nas Figuras 65a e b.



(a)



(b)

Figura 65. Velocidades iniciais de reação para baixas concentrações de sacarose (5, 10 e 20 g/L) e (a) frutose (5, 10 e 15 g/L) e (b) glicose (5, 10 e 15 g/L).

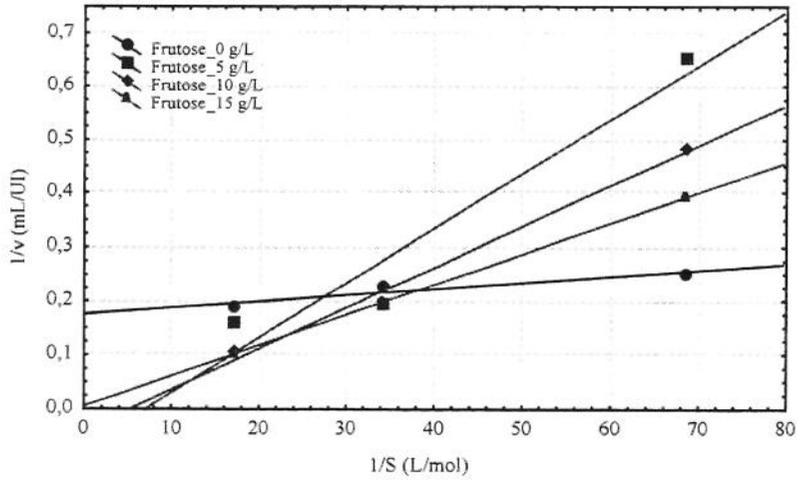
A glicose e frutose foram adicionadas em baixas concentrações de sacarose (5, 10 e 20 g/L), onde não é verificada a inibição pela sacarose. Analisando-se a Figura 65a, que representa os resultados com a frutose nas concentrações de 5 a 20 g/L, podemos verificar que a medida que a concentração de frutose aumenta ocorre uma redução na atividade enzimática. Este mesmo efeito foi observado para a glicose (Figura 65b). O efeito inibidor, no entanto, não é significativamente diferente para as três concentrações destes açúcares testadas, podendo-se até afirmar que existe uma certa semelhança entre as três retas que representam a inibição de glicose e frutose. Porém, verifica-se que à medida que a concentração da sacarose aumenta ocorre um efeito de diminuição da inibição provocada tanto no caso glicose como da frutose, com tendência a contrabalançar ou eliminar o efeito inibidor. Este fenômeno é interessante e escassamente relatado na literatura, não havendo elementos que possam explicar este comportamento da inulinase.

Todo este estudo foi realizado numa baixa concentração de sacarose, evitando desta forma a inibição pelo substrato. Portanto, o que pode estar ocorrendo é uma limitação da ação da enzima devido à baixa concentração da sacarose o que é paulatinamente aliviado a medida em que se aumenta sua concentração. A inibição pela glicose e a frutose é leve, de forma que é facilmente eliminada pelo aumento da concentração de sacarose.

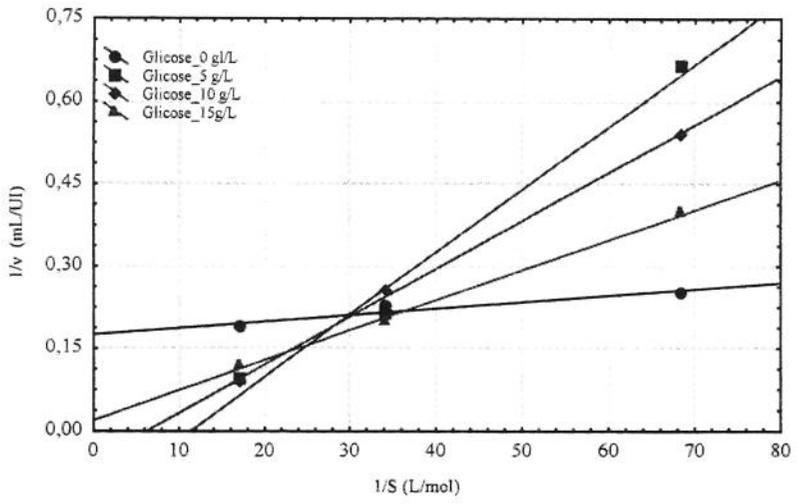
Este efeito da frutose e glicose em relação a atividade da inulinase também foi estudado por Gupta *et al* (1980) com frutossiltransferase de *Fusarium oxysporum*. Os autores observaram que a presença de frutose (0,05 M e 0,1 M) favorecia um aumento da atividade enzimática, no entanto, a adição de glicose apresentava uma inibição competitiva. Verificaram também que o alto grau de inibição, apresentado pela glicose indicava que após a glicose ligar-se mais firmemente ao centro ativo, a transferência de frutose poderia ser feita mais fácil, provavelmente favorecendo a produção de frutooligossacarídeos.

4.6.1. Estudo cinético da inibição da glicose e frutose na velocidade inicial da inulinase

Para determinar o tipo de inibição que ocorre na presença de glicose e frutose, foram construídos gráficos de $1/v$ em função de $1/S$ e de S/v em função de S . Os resultados estão apresentados nas Figuras 66a e b e 67a e b. A partir das análises das Figuras 66 e 67 não foi possível identificar o tipo de inibição exercido pela frutose e glicose, em baixas concentrações tanto de sacarose como destes dois açúcares

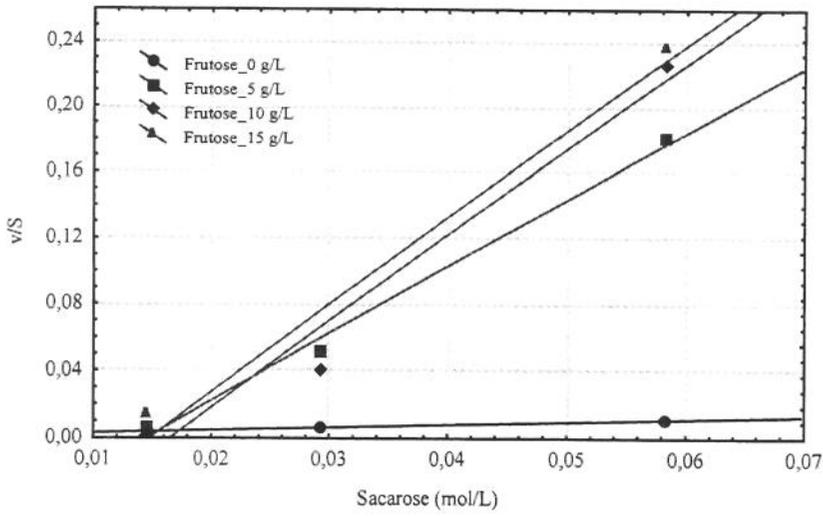


(a)

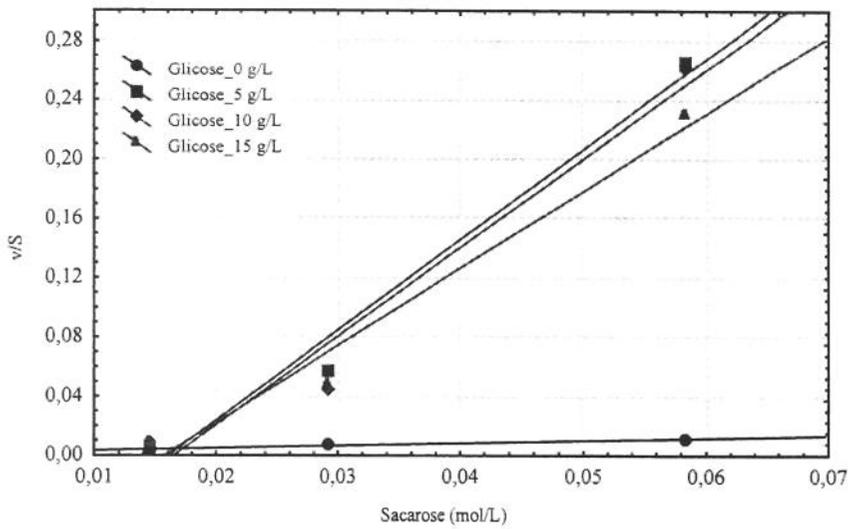


(b)

Figura 66. Gráfico aplicado para as taxas iniciais de reação para a inulinase na presença de (a) frutose e (b) glicose em baixas concentrações de sacarose.



(a)



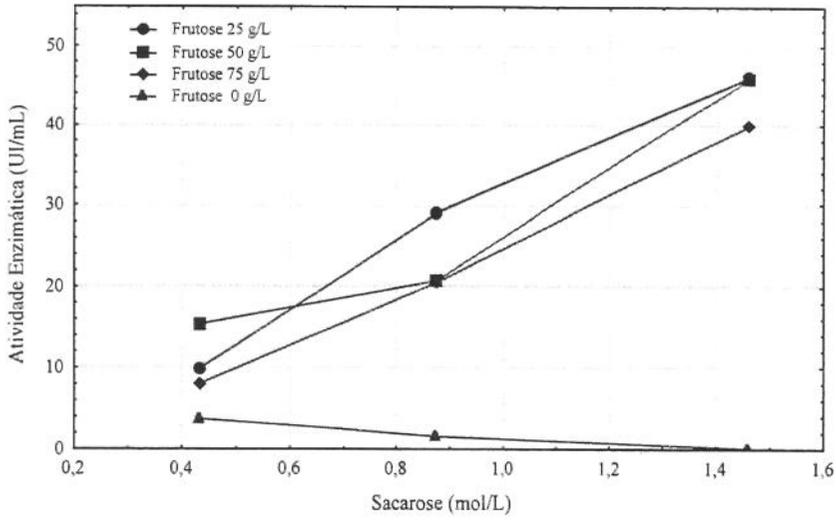
(b)

Figura 67. Gráfico aplicado para as taxas iniciais de reação para a inulinase na presença de (a) frutose e (b) glicose em baixas concentrações de sacarose.

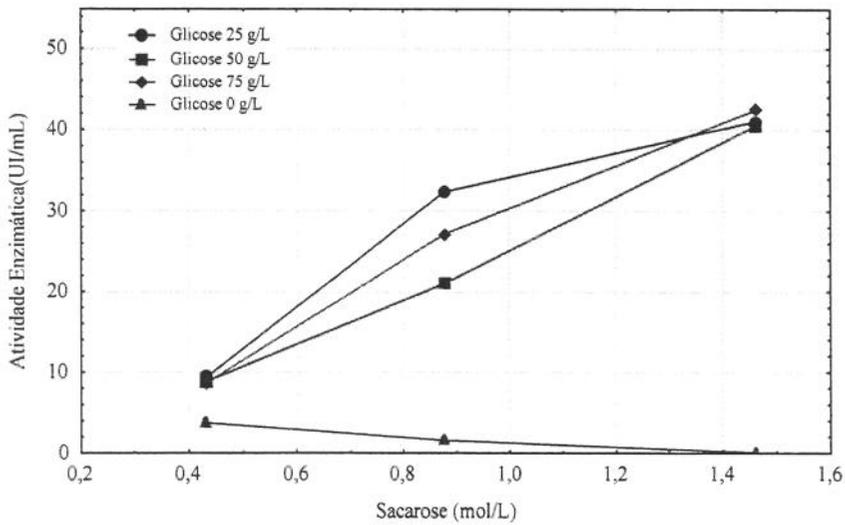
Como uma nova tentativa de avaliar a inibição e também para o estudo da atividade de transfrutossilacção da enzima, foi realizado um novo estudo utilizando altas concentrações de sacarose (150, 300 e 500 g/L) e adição de frutose e glicose (25, 50 e 75 g/L). Em seguida foram medidas as velocidades iniciais. As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia de íons (HPLC-PAD) (Figuras 68a e b).

Nesta faixa de concentração de sacarose (150, 300 e 500 g/L) é visível a inibição da enzima pelo substrato. Na Figura 68a estão apresentados os resultados do estudo cinético realizado com a frutose. De acordo com os resultados, pode-se verificar uma diminuição da atividade enzimática com o aumento da concentração de frutose. Sendo que a 50 g/L de frutose, verificou-se uma maior atividade quando comparado com 25 e 75 g/L. Em relação a glicose (Figura 68b), pode-se verificar que a atividade enzimática na presença de 75g/L de glicose foi maior do que a 25 g/L e 50 g/L. Este aumento não foi proporcional ao aumento da concentração do aceptor no meio de reacção. Devido a poucas informações encontradas na literatura a respeito do comportamento cinético da inulinase, torna-se interessante um estudo mais detalhado de forma a obter resultados mais conclusivos em relação a esta enzima.

O estudo da capacidade de hidrólise e de transfrutossilacção desta enzima foi realizada com maiores detalhes no capítulo de Síntese de oligossacarídeos.



(a)



(b)

Figura 68. Velocidades iniciais de reação para sacarose (150, 300 e 500g/L) e (a) frutose (25, 50 e 75 g/L) e (b) glicose (25, 50 e 75 g/L).

4.7. Síntese de frutooligossacarídeos a partir da inulinase

A síntese dos frutooligossacarídeos vem sendo amplamente estudada, utilizando enzimas com alta capacidade de transfrutossilacção, que são enzimas obtidas principalmente de fungos, tais como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum* (Hidaka *et al.*, 1988; Su *et al.*, 1990; van Blaken *et al.*, 1991, Gupta *et al.*, 1994). A cinética de acção destas enzimas desperta grande interesse, pois é através dela que se conhece o mecanismo de acção destas enzimas. Um dos estudos cinéticos mais importante encontrado na literatura foi o realizado por Jung *et al.*, (1989) e confirmado por Duan *et al.*, (1994). Jung *et al.*, (1989) estudaram a acção de transfrutossilacção da enzima de *Aureobasidium pullulans*. Os autores propuseram um mecanismo para a reacção de produção de frutooligossacarídeos, cuja formação ocorre de uma maneira desproporcional. A partir da sacarose, que atua tanto como doador quanto acceptor, verifica-se a formação de glicose e kestose. Em seguida, à medida que a concentração de kestose no meio reacional vai aumentando verifica-se a formação de nistose. A formação de 1-frutosilnistose é favorecida pela concentração de nistose, sendo que a glicose acumulada no meio de reacção atua como inibidor competitivo. Duan *et al.*, (1994) estudaram também a acção de transfrutossilacção, de uma enzima obtida de *Aspergillus niger* que apresentou um comportamento similar ao verificado realizado por Jung *et al.*, (1984), onde o modelo proposto prediz de maneira bastante satisfatória o comportamento da enzima. Estes dois processos podem ser esquematizados da seguinte forma:

1. $2GF \rightarrow GF_2 + F$ (transfrutossilacção)
2. $GF_2 \rightarrow GF_3 + GF$ (transfrutossilacção)
3. $GF_3 \rightarrow GF_4 + GF_2$ (transfrutossilacção)
4. $GF_3 \rightarrow GF_2 + F$ (hidrólise)

Baseando-se em dados da literatura, estudou-se neste trabalho, a cinética de síntese de frutooligossacarídeos pela enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Em trabalhos anteriores verificou-se que esta enzima apresentava uma acção hidrolítica, além daquela de transfrutossilacção (Santos, 1998). Pelos resultados observados

neste e nos trabalhos anteriores, pode-se sugerir um mecanismo de reações durante a síntese dos frutooligossacarídeos pela ação da inulinase como segue:

1. $GF \rightarrow G + F$ (hidrólise)
2. $GF + F \rightarrow GF_2$ (transfrutosilação)
3. $GF_2 + F \rightarrow GF_3$ (transfrutosilação)
4. $GF_3 \rightarrow GF_2 + F$ (hidrólise)
5. $GF_2 \rightarrow GF + F$ (hidrólise)

Este mecanismo proposto difere dos mecanismos encontrados na literatura, já que a ação hidrolítica das outras enzimas não é tão acentuada quanto a observada na inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. É importante ressaltar que a ação de transfrutosilação, tanto para as enzimas obtidas de fungos quanto para as enzimas obtidas a partir de leveduras, só é favorecida quando a síntese ocorre em altas concentrações de substrato (acima de 45% de sacarose), e na medida em que a concentração de sacarose diminui no meio de reação verifica-se a hidrólise dos oligossacarídeos, apresentando no final do processo apenas glicose e frutose. Em relação a inulinase, a ação hidrolítica atua simultaneamente à ação de transfrutosilação, já que durante a síntese verifica-se a formação de glicose, frutose, kestose e nistose. Assim, com o objetivo de conhecer melhor o comportamento desta enzima, foram realizados vários estudos aplicando técnicas de planejamento experimental para síntese com a enzima livre e imobilizada. Para um estudo comparativo realizou-se a síntese dos frutooligossacarídeos utilizando a enzima em reator de mistura e em coluna empacotada. Os resultados estão apresentados a seguir.

4.7.1. Produção de frutooligossacarídeos utilizando a técnica de planejamento experimental

Para o estudo da síntese foi realizado um planejamento fatorial fracionário para verificar quais as variáveis que apresentam efeitos significativos na produção dos frutooligossacarídeos. Assim, foi estudada a influência da temperatura, pH, concentração de sacarose e concentração de enzimas na produção dos frutooligossacarídeos. O planejamento 2^{4-1} é um exemplo de fatorial fracionário de resolução quatro. Neste tipo de planejamento

os efeitos principais não se misturam com as interações de dois fatores, mas estes, por sua vez, misturam-se entre si. Quem determina a resolução de um fatorial são as suas relações geradoras.

O planejamento fracionário é uma excelente ferramenta quando se deseja avaliar dentre as quatro variáveis estudadas quais são as estatisticamente significativas para a realização de um planejamento fatorial completo.

As respostas avaliadas foram hidrólise da sacarose, produção de frutooligossacarídeos, glicose e frutose.

Na Tabela 48 estão apresentados os resultados obtidos no planejamento experimental fracionário em função da porcentagem de produção de frutooligossacarídeos e na Tabela 49 estão os valores dos efeitos estimados.

Tabela 48. Resultados do planejamento experimental (2^{41}) em porcentagem de frutooligossacarídeos produzidos.

ensaio	Variáveis independentes				Variáveis dependentes (%)			
	pH	T (°C)	C _S	C _E	glicose	frutose	sacarose	FOS
01	5,0	40	450	4	38,31	29,83	25,88	5,98
02	6,0	40	450	6	21,14	12,16	59,99	5,92
03	5,0	50	450	6	35,48	28,77	26,92	8,81
04	6,0	50	450	4	38,56	31,33	17,46	12,65
05	5,0	40	650	6	32,27	29,59	33,17	5,00
06	6,0	40	650	4	16,34	14,76	66,64	4,26
07	5,0	50	650	4	32,00	30,88	33,24	3,87
08	6,0	50	650	6	32,62	30,13	31,29	4,63
09	5,5	45	550	5	31,59	31,48	22,59	4,95
10	5,5	45	550	5	33,96	35,17	26,39	4,47
11	5,5	45	550	5	33,71	35,41	26,50	5,21

FOS= frutooligossacarídeos: kestose + nistose + frutossilnistose

Tabela 49. Efeitos estimados para síntese de frutooligossacarídeos no planejamento experimental fracionário.

	Efeito Estimado	Erro padrão	t	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança + 95%
Média*	5,977	0,113	52,807	0,0035	5,490	6,464
pH	0,950	0,265	3,578	0,069	-0,192	2,092
T(°C) *	2,200	0,265	8,287	0,142	1,057	3,342
C _S *	-3,900	0,265	-14,692	0,004	-5,042	-2,757
C _E	-0,600	0,265	-2,260	0,152	-1,742	-0,542

* variáveis significativas

O estudo da eficiência da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* nas condições determinadas no planejamento fracionário foi realizado num tempo de 12 horas de síntese. Analisando os resultados deste planejamento experimental observa-se que tanto a temperatura quanto a concentração de sacarose apresentam efeitos significativos no processo. Em relação a temperatura pode-se observar um efeito positivo verificado pelo aumento na concentração de frutooligossacarídeos quando passa da condição de 40°C (nível -1) para a condição de 50°C (nível +1). Em relação a concentração de sacarose, verifica-se um efeito negativo quando passa da condição de 450 g/L (nível -1) para a condição de 650 g/L (nível +1). De acordo com os resultados obtidos, a melhor condição verificada foi: pH 6,0, temperatura 50°C, concentração de sacarose 450 g/L e concentração de enzima 4 UI/mL, com uma produção de 60g/L de frutooligossacarídeos, o que corresponde a aproximadamente 12% do total de açúcares produzidos com 5 horas de síntese.

Na Tabela 50, estão apresentados os resultados em termos de produtividade de frutooligossacarídeos, sacarose, glicose e frutose com a enzima livre. Tanto o ensaio 4 quanto o ensaio 3, apresentaram resultados bastante satisfatórios em relação a produção de frutooligossacarídeos, sendo 12 g/L.h para o ensaio 4 (pH 6,0, T= 50°C, concentração de sacarose 450 g/L e concentração de enzimas 4 UI/mL) e 10 g/L.h para o ensaio 3 (pH 5,0, T = 50°C, concentração de sacarose 450g/L e concentração de enzimas 6 UI/mL).

A partir da análise dos resultados do planejamento fracionário, onde as variáveis estudadas não apresentaram efeitos significativos ao processo, não foi necessário um novo planejamento fatorial completo com o objetivo de otimização da produção, já que os resultados obtidos foram similares ao verificado por Santos & Maugeri (1999).

Tabela 50. Resultados do planejamento em termos de produtividade de frutooligossacarídeos.

Ensaio	Variáveis independentes				Variáveis dependentes (g/L.h)			
	pH	T (°C)	C _S	C _E	Glicose	Frutose	Sacarose	FOS
01	5,0	40	450	4	16,76	13,05	11,32	2,62
02	6,0	40	450	6	12,43	7,12	35,12	3,87
03	5,0	50	450	6	40,29	32,67	30,58	10,01
04	6,0	50	450	4	36,69	29,82	16,62	12,04
05	5,0	40	650	6	25,38	23,25	26,09	3,93
06	6,0	40	650	4	15,90	14,36	62,92	4,14
07	5,0	50	650	4	29,27	28,24	30,40	3,54
08	6,0	50	650	6	30,38	29,33	29,11	4,31
09	5,5	45	550	5	29,51	29,39	30,63	3,88
10	5,5	45	550	5	29,42	30,47	22,87	3,87
11	5,5	45	550	5	26,34	27,66	20,70	3,42

FOS= frutooligossacarídeos: kestose + nistose + frutossilnístose

4.7.2. Influência de aceptores (maltose, lactose, glicose e frutose) na produção de frutooligossacarídeos

Nesta etapa foi estudado o comportamento da inulinase na presença de aceptores. É importante ressaltar que ao se utilizar maltose como acceptor, tanto a identificação quanto a quantificação ficou comprometida pela superposição dos picos da maltose e do frutooligossacarídeo identificado como kestose (GF₂). Para a lactose não ocorreu uma alteração significativa na produção de frutooligossacarídeos. Entretanto, quando foram utilizadas frutose e glicose como aceptores foi verificado um comportamento bastante interessante, principalmente em relação à glicose. A partir destes resultados, foi realizado um estudo mais detalhado com a glicose e frutose. Os resultados estão apresentados no item 4.7.3.

4.7.3. Síntese de frutooligossacarídeos utilizando glicose ou frutose como acceptor

O estudo da síntese de frutooligossacarídeos foi realizado fixando a concentração de sacarose em 500 g/L e variando-se as concentrações de glicose e frutose (50, 150 e 200 g/L a 50°C e pH 6,0). As amostras foram analisadas por cromatografia líquida (HPLC-PAD). Nas Figuras 69 a 74 estão apresentados os resultados da síntese.

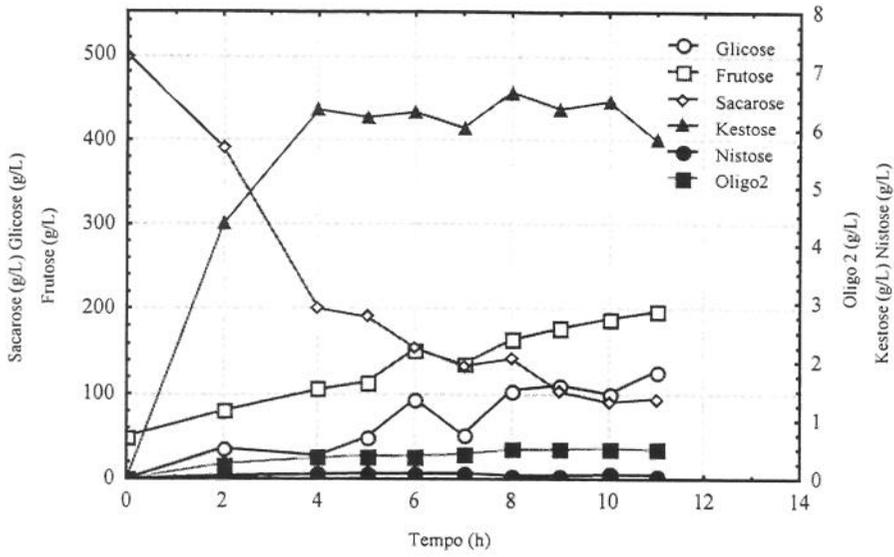


Figura 69. Síntese de oligossacarídes a 500 g/L de sacarose e 50 g/L de frutose.

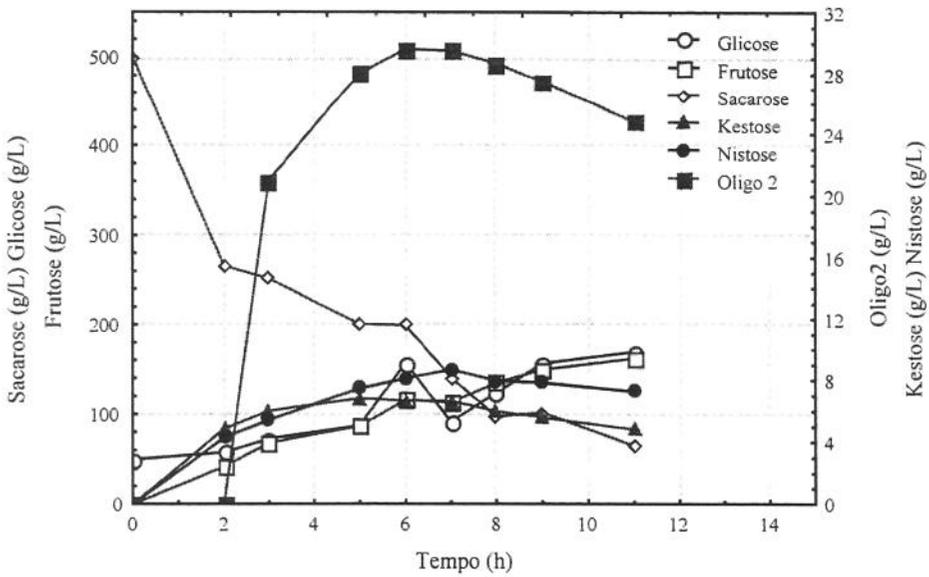


Figura 70. Síntese de oligossacarídes a 500 g/L de sacarose e 50 g/L de glicose.

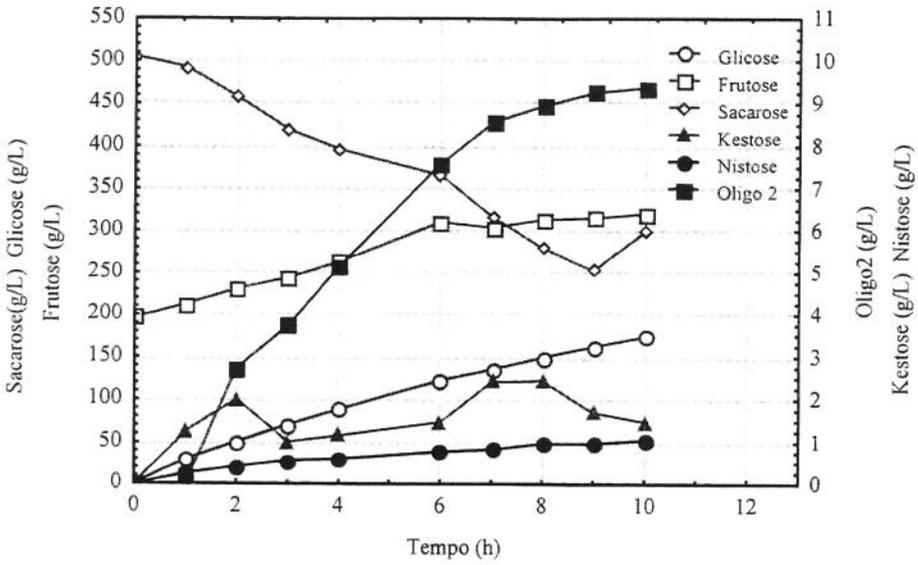


Figura 71. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 150 g/L de frutose.

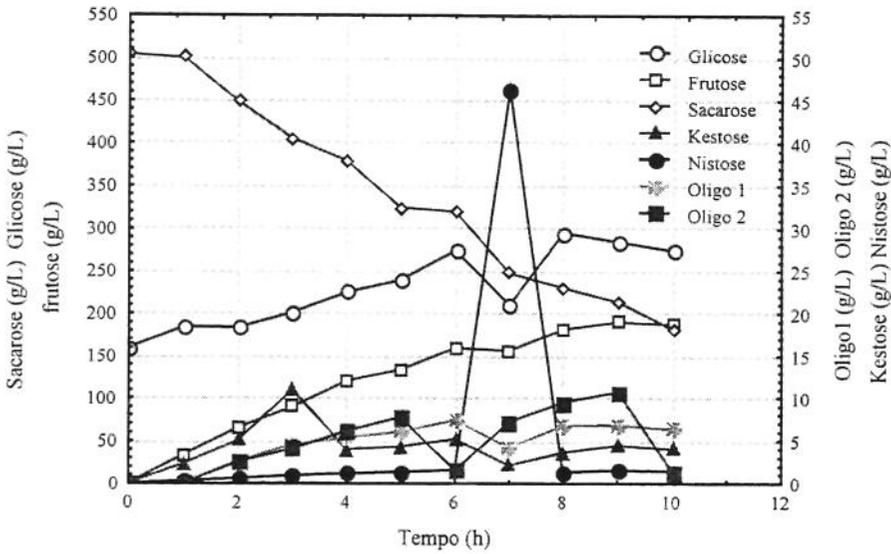


Figura 72. Síntese de oligossacarídeos a 500 g/L de sacarose e 150 g/L de glicose.

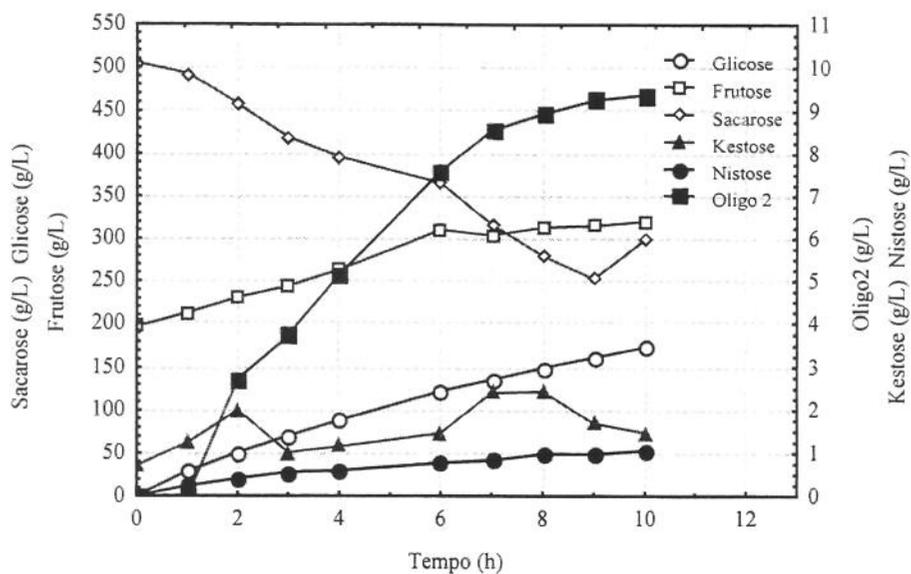


Figura 73. Síntese de oligossacarídes a 500 g/L de sacarose e 200 g/L de frutose.

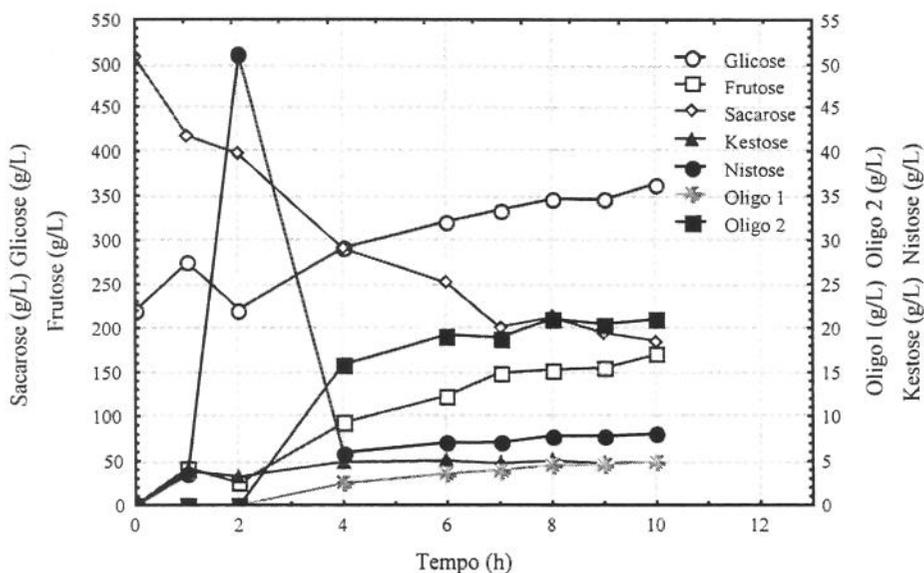


Figura 74. Síntese de oligossacarídes a 500 g/L de sacarose e 200 g/L de glicose.

Em todas os experimentos foram identificados dois novos oligossacarídeos, que de acordo com o tempo de retenção não correspondia nem a kestose, nistose ou 1-frutossilnistose. Assim, foram denominados de oligo1 e oligo2. O oligo1 foi formado quando a síntese foi realizada nos experimentos contendo glicose nas concentrações de 150 e 200 g/L (Figura 72 e 74), sendo que a máxima concentração encontrada do oligo1 ficou em torno de 9 g/L com 150 g/L de glicose. Entretanto, a formação de oligo2 alcançou a máxima concentração de 30 g/L com 50 g/L de glicose (Figura 70).

Também nesta condição verificou-se um pico significativo de nistose, aproximadamente 43 g/L, e com 200 g/L de glicose obteve-se, para o mesmo pico, aproximadamente 50 g/L. Uma outra diferença encontrada nestas duas condições de síntese foi quanto ao tempo em que a máxima concentração de nistose é atingida. Para 150 g/L de glicose a nistose alcança a máxima concentração com 7 horas (Figura 72) de síntese enquanto que para 200 g/L de glicose a máxima concentração de nistose é alcançada com apenas 2 horas de síntese (Figura 74). Em ambos os casos a hidrólise é bastante acentuada logo após o pico de máxima concentração. Para a kestose, a máxima concentração foi obtida após 3 horas de síntese na presença de 150 g/L de glicose.

Para as sínteses com adição de frutose, o comportamento foi totalmente inverso ao esperado (Figuras 69, 71 e 73). A máxima produção de kestose foi verificada na concentração de 50 g/L de frutose e com um tempo de 3 horas de reação obteve-se 8 g/L. Para oligo2, a máxima produção (9,5 g/L) foi obtida com 150 e 200 g/L de frutose, após 10 horas de síntese.

Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, verificou-se que a presença de glicose estimulava a produção dos oligossacarídeos enquanto que a frutose inibe. Este comportamento foi oposto ao verificado por outras enzimas com atividades de transfrutossilacção, ou seja, a glicose atua como inibidor competitivo e inibe a produção dos frutooligossacarídeos. São os casos das enzimas de *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus japonicus* TIT-KJI, *Aureobasidium pullulans* (Gupta *et al.*, 1989, Jung *et al.*, 1989, Duan *et al.*, 1994).

Dos resultados apresentados na Tabela 51, verifica-se que a melhor condição para a síntese de oligossacarídeos foi 500 g/L de sacarose mais 200 g/L de glicose no pH 6,0, a

50°C. É importante ressaltar a necessidade de mais estudos para que se possa chegar a resultados mais conclusivos.

Tabela 51. Valores dos Oligossacarídeos em diferentes condições de síntese.

Oligossacarídeos	Frutose (g/L)			Glicose (g/L)		
	50	150	200	50	150	200
Kestose	8	2,5	2,5	7	10	6
Nistose	1	1	1	9	43	50
Oligo 1	-	-	-	-	9	6
Oligo 2	1	9,5	9,5	30	9	20
Total	10	13	13	46	71	82

4.8. Síntese de frutooligossacarídeos com inulinase imobilizada

4.8.1. Síntese de frutooligossacarídeos com a inulinase imobilizada em reator de mistura

A síntese foi realizada em batelada utilizando um reator encamisado com um volume de 200 mL. No reator foram adicionados 150 mL de solução de sacarose a 50%, mais as esferas contendo a enzima imobilizada com uma atividade enzimática inicial de 25 UI/mL de esferas, perfazendo uma atividade enzimática final de 6 UI/mL de solução de sacarose. Todo o processo foi mantido a 50°C. Na Tabela 52 e Figura 75 estão apresentados os resultados da síntese.

De acordo com os resultados podemos verificar que após 7 horas de síntese mais de 90% da sacarose inicial foi hidrolisada. Com 2 horas de síntese obteve-se 25,16 g/L de kestose, sendo que a máxima concentração é alcançada com 3 horas de síntese (26,06 g/L). em relação a nistose, com 5 horas de síntese obteve-se 29,81 g/L. Entretanto, na medida em que a concentração de sacarose começa a diminuir, o processo de hidrólise dos oligossacarídeos formados torna-se mais intenso, prevalecendo assim a atividade hidrolítica verificada pela formação de glicose e frutose. No início da síntese, quando a concentração de sacarose é alta, a atividade de transfrutoseilação é mais significativa, verificando-se a formação dos oligossacarídeos. Após 7 horas de síntese pode-se verificar que praticamente

todos os oligossacarídeos foram hidrolisados (Figura 75). Este mesmo comportamento foi também verificado em vários trabalhos encontrados na literatura (Duan *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1989, Kitakano *et al.*, 1998; Park & Almeida, 1991; Hayashi *et al.*, 1992; Patel *et al.*, 1994; Yun *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2000; Euzenat *et al.*, 1997).

No entanto, a presença dos frutooligossacarídeos caracteriza a atividade de transfrutossilacção da inulinase, que é uma enzima mais conhecida pela sua atividade hidrolítica. Esta capacidade de transfrutossilacção também foi detectada em invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, enzima esta conhecida pela sua acção hidrolítica (Straathof *et al.*, 1986). Na reacção de hidrólise da sacarose com invertase, em altas concentrações de sacarose, foi identificada a formação de trissacarídeos não redutores: 1-kestose, 6-kestose e neokestose e simultaneamente os dissacarídeos redutores D-glicose e D-frutose.

Para descrever um modelo cinético que caracterize o processo de síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus*, é necessário obter informações detalhadas do processo. Até o presente estudo, sabe-se que a enzima durante a síntese de frutooligossacarídeos apresenta dois tipos de atuação (hidrólise e transfrutossilacção) em altas concentrações de sacarose (400-600 g/L), e que a formação de glicose, frutose, kestose e nistose é verificada nas primeiras horas. A concentração de glicose superior a de frutose, pois a frutose que está sendo liberada inicialmente é utilizada para formação de dos frutooligossacarídeos. O pentassacarídeo 1-frutossilnistose foi detectado em alguns processos, em concentrações inferiores a 1 g/L.

Tabela 52. Produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando inulinase imobilizada em alginato de cálcio em reator de mistura.

Amostras (h)	Glicose (G) g/L	Frutose (F) g/L	Sacarose (GF) g/L	Kestose (GF ₂) g/L	Nistose (GF ₃) g/L
0,0	-	-	500,13	-	-
0,5	19,55	24,36	407,15	11,13	6,99
1,0	24,87	36,54	317,99	17,60	12,45
2,0	94,72	87,35	246,43	25,16	13,46
3,0	128,88	116,79	183,75	26,04	24,18
4,0	146,91	150,09	125,33	23,73	26,03
5,0	171,95	179,13	67,27	5,99	29,81
6,0	199,24	201,77	47,93	1,33	9,01
7,0	215,23	211,48	41,77	1,24	7,77

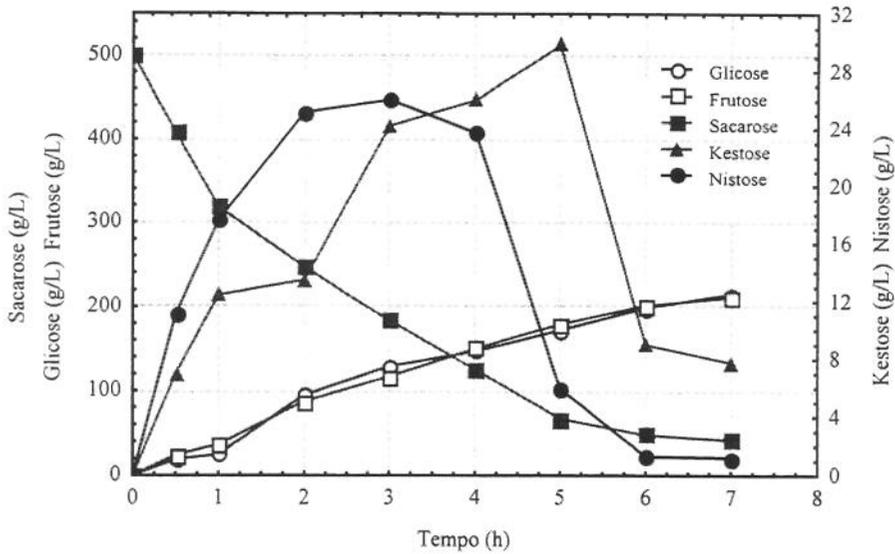


Figura 75. Produção de Frutooligossacarídeos a partir de uma de solução com 50% sacarose. A síntese foi realizada a pH 5,0 a 50°C.

4.8.2. Síntese de frutooligossacarídeos com a inulinase imobilizada em reator tubular

A síntese de oligossacarídeos utilizando a enzima empacotada foi realizada em uma coluna (2,3 x 25 cm) contendo 60 cm³ de leito com a inulinase imobilizada com uma atividade enzimática de 6 UI/cm³ de coluna. A alimentação foi realizada com uma solução de 50% de sacarose a pH 6,0 e 50°C.

Para o cálculo das taxas de conversão (τ = tempo de residência) foi utilizado o método conforme descrito por Ettalbi & Baratti (2001).

$$\tau \text{ (h)} = \frac{V_{\text{leito}}}{F}$$

Onde,

$$V_{\text{leito}} = V_{\text{coluna}} - V_{\text{esferas}}$$

V_{leito} = volume de leito (cm³)

V_{coluna} = volume total da coluna (cm³)

V_{esferas} = volume de esferas contendo a enzima imobilizada (cm³)

F (cm³/h) = vazão de alimentação da coluna (cm³/h)

Na Tabela 53 e 54 estão apresentados os resultados obtidos com a inulinase imobilizada em alginato e empacotada na coluna e no reator de mistura.

Tabela 53. Produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando inulinase imobilizada em alginato de cálcio, reator tubular.

Tempo de residência (τ) horas	Carboidratos (%)			
	Glicose	Frutose	Sacarose	Fos
0,5			100	
1,0	9,46	10,29	79,25	0,99
2,0	32,24	27,30	34,29	6,17
2,5	39,24	35,78	20,00	4,98
3,0	31,34	28,44	35,70	4,52
3,5	36,12	38,63	22,04	3,22
4,0	33,57	33,89	23,06	9,48
5,0	41,95	37,50	18,71	1,84
10,0	45,59	42,87	8,05	3,50

FOS= frutooligossacarídeos: kestose + nistose + frutossilnístose

Tabela 54. Produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando inulinase imobilizada em alginato de cálcio, reator de mistura.

Tempo horas	Carboidratos (%)			
	Glicose	Frutose	Sacarose	Fos
0,0			100	
0,5	4,17	5,19	86,79	3,86
1,0	6,07	8,93	77,66	7,34
2,0	20,28	18,70	52,76	8,14
3,0	26,87	24,35	38,31	10,47
4,0	31,12	31,79	36,55	10,54
5,0	37,79	39,49	14,83	7,89
6,0	43,38	43,93	10,44	2,25
7,0	45,08	44,29	8,73	1,89

FOS= frutooligossacarídeos: kestose + nistose + frutossilnístose

Na produção contínua de frutooligossacarídeos (Tabela 53), a formação dos frutooligossacarídeos aumenta com o decréscimo do fluxo de alimentação, o que corresponde ao aumento do tempo de residência. Com um tempo de residência de 4 horas obteve-se 9,48% de conversão em frutooligossacarídeos, o que corresponde a um fluxo de

alimentação de 0,18 mL/min. Para tempos de residências superiores a 4 horas, ocorre uma menor conversão devido o favorecimento da hidrólise dos oligossacarídeos. No processo em batelada (reator de mistura e enzima livre) os melhores resultados foram alcançados com 4 horas de síntese.

Analisando os resultados podemos verificar que a síntese de oligossacarídeos utilizando a enzima livre, atingiu o máximo com 4 horas de síntese (9,5%). Resultado similar foi encontrado com a enzima imobilizada empacotada em coluna. No reator de mistura, o máximo também foi alcançado com 4 horas (10,5%), sendo que após alcançar a máxima concentração os frutooligossacarídeos foram rapidamente hidrolisados.

Fazendo um estudo comparativo entre os três processos realizados, pode-se dizer que é bastante viável utilizar a enzima imobilizada em coluna na produção de frutooligossacarídeos. Os resultados da síntese estão apresentados na Figura 76.

Não foram, portanto, verificadas diferenças significativas entre os três processos estudados, sendo que a produção máxima de frutooligossacarídeos utilizando a enzima livre ou imobilizada em leito fixo e reator de mistura foi de aproximadamente 50 g/L.

Sabe-se que a máxima ingestão diária de frutooligossacarídeos recomendada, para humanos, é de 8 a 10 g/dia (Spigel *et al.*, 1994). Pensando em uma possível aplicação do xarope obtido por este processo, enriquecido com frutooligossacarídeos, baseando-se num refrigerante como exemplo, que normalmente contém em torno de 15% de açúcares, o que corresponde a 33% da concentração do xarope, obtido neste trabalho, o que representa uma diluição de 1/3. Assim a concentração de frutooligossacarídeos no refrigerante seria de 15 g/L. Significando que um adulto poderia tomar até quase um litro deste refrigerante por dia contendo o xarope enriquecido com frutooligossacarídeos, para obter os benefícios do produto. Assim sendo, a utilização deste xarope é tecnicamente viável, necessitando apenas de uma diluição, tornando o processo viável para possível exploração industrial.

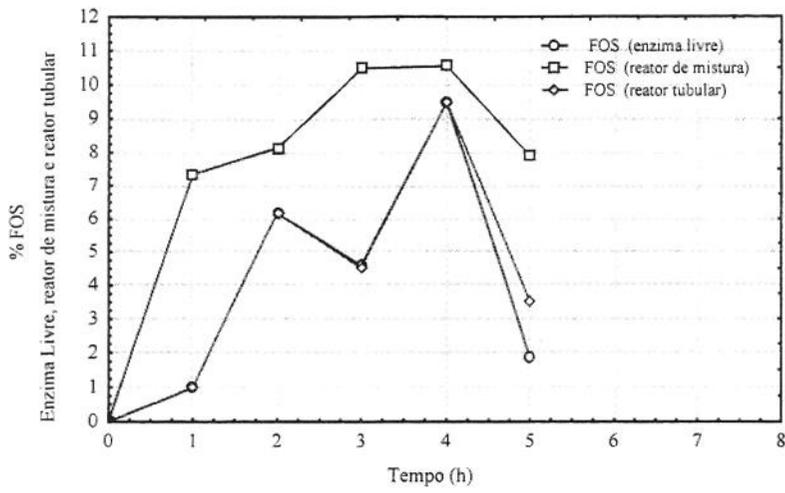


Figura 76. Perfil da produção de frutooligossacarídeos utilizando enzima livre, enzima imobilizada com alginato de cálcio em reator de mistura e tubular.

5. Conclusão

Neste trabalho, quatro enfoques principais foram explorados: produção e purificação da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus* ATCC 16045, sua caracterização quanto aos parâmetros operacionais e de estabilidade térmica, a cinética de hidrólise da sacarose e síntese dos oligossacarídeos, e a aplicação da enzima na forma livre ou imobilizada em alginato de cálcio. As conclusões são apresentadas a seguir:

Produção e purificação

Nos estudos de produção verificou-se que após a otimização por planejamento experimental em frascos agitados, foi possível a obtenção de uma alta atividade enzimática. A atividade enzimática atingiu 301 UI/mL, após 72 horas de fermentação a 23°C e pH 3,4. Esta atividade foi a maior já obtida com este microrganismo.

Quanto à purificação da enzima verificou-se que com valores de pH de 4,0 a 4,5, valores estes abaixo do ponto isoelétrico, utilizando uma coluna de troca catiônica (SP-Sepharose FF), não obteve-se bons resultados. A purificação feita em valores de pH acima do ponto isoelétrico, utilizando uma coluna de troca aniônica (Q-Sepharose) favoreceu a adsorção da enzima. O experimento a pH 6,0 apresentou os melhores valores de purificação, obtendo o fator de purificação de 23,86 vezes em relação ao caldo bruto e um rendimento de recuperação de 86,06% e uma relação de S/I de 7,27.

Imobilização em alginato de cálcio

Em relação à enzima imobilizada em alginato de cálcio verificou-se que as melhores condições que proporcionaram melhor estabilidade em alginato de cálcio, foram 3,5% de alginato e 0,02M de CaCl₂.

Caracterização da inulinase na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio

Os estudos realizados com a finalidade de caracterização da enzima livre mostraram que a inulinase purificada e do caldo bruto apresentaram uma boa estabilidade quando foram estocadas durante 4 a 8 meses, respectivamente. A enzima do caldo bruto perdeu 38% da atividade inicial com 8 meses de congelamento. Quanto ao pH, verificou-se que a enzima livre em tampão acetato de sódio 0,1M apresentou maior atividade em uma ampla faixa de valores de pH (4,4 a 4,8). Para a enzima imobilizada em alginato de cálcio a máxima atividade enzimática foi obtida a pH 4,4.

Nos estudos do efeito da temperatura na atividade enzimática obteve-se as máximas atividades a 63 e 57,5°C para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. A estabilidade térmica foi avaliada em termos da meia vida da enzima livre e imobilizada. Verificou-se que o processo de imobilização em alginato de cálcio torna a inulinase menos estável, sendo encontrada uma meia vida de 228,8 horas (9,5 dias) e 138 horas (5,7 dias), a 50°C, para enzima livre e imobilizada, respectivamente.

A modelagem matemática da atividade em função do tempo e da temperatura se ajustou bem aos dados experimentais e possibilitou prever as temperaturas ótimas de operação da enzima, sendo estas 53°C para a enzima livre e 45°C para a enzima imobilizada. Estas temperaturas de operação permitem prever uma maior utilização da enzima no tempo, mantendo uma atividade que permite boas produtividades.

Os valores das Energias de Ativação da reação (E_a) e da desnaturação (E_d) foram 16,42 e 127,66 Kcal/mol para a enzima livre e 13,53 e 74,50 Kcal/mol para a enzima imobilizada, respectivamente. A baixa energia de desnaturação da enzima imobilizada em relação a enzima na forma livre é importante no uso de reatores contínuos, tendo como um dos objetivos aumentar o tempo de vida útil do biocatalizador tornando o processo economicamente viável.

Estudo cinético

Quanto à modelagem cinética esta foi ajustada ao modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato, aplicando um fator de correção que leva em conta a variação da difusividade em função da própria concentração de substrato. As constantes do modelo são: $K_m = 0,0389$ M, $V_{max} = 126,87 \cdot 10^{-9}$ mol/min.L e $K_i = 0,3855$ M.

Quanto a modelagem cinética da enzima imobilizada, os dados experimentais foram ajustados pelo modelo de Michaelis-Menten considerando a inibição pelo substrato, sem a necessidade de adicionar um fator de correção como na enzima livre. As constantes do modelo foram: $K_m^{ap} = 0,0969$ M, $V_{max}^{ap} = 33,44 \cdot 10^{-9}$ mol/min.L e $K_i^{ap} = 3,527$ M.

Quanto à modelagem cinética o modelo de inibição pelo substrato de Michaelis-Menten apresentou um bom ajuste tanto para a enzima na forma livre quanto para a enzima imobilizada. Para a enzima na forma livre foi necessário levar em conta o fator de correção que relaciona a difusividade da sacarose em função da concentração.

Síntese de oligossacarídeos

Em relação à influência da concentração de glicose e frutose na atividade enzimática, pôde-se verificar que o aumento da concentração de glicose ou frutose em baixas concentrações de sacarose promove redução na atividade enzimática, mas com o aumento da concentração de sacarose este efeito de inibição provocada pela glicose ou frutose diminui.

No estudo realizado para a produção de frutooligossacarídeos utilizando a técnica de planejamento experimental, a melhor condição foi: concentração de sacarose a 45%, concentração de enzimas 4,0 UI/mL, temperatura de 50°C e pH 6,0. Convém ressaltar que, de acordo com o planejamento experimental apenas a temperatura apresentou efeito significativo.

A influência de aceptores na síntese enzimática apresentou resultados muito interessantes, sendo que a glicose estimula a formação de oligossacarídeos e a máxima concentração obtida foi de 82 g/L com 500 g/L de sacarose e 200 g/L de glicose. Em todas as condições observou-se a formação de dois novos oligossacarídeos denominados de oligo1 e oligo2.

Para o estudo realizado com a enzima imobilizada em alginato de cálcio, verificou-se que não houve diferenças significativas na produção de frutooligossacarídeos tanto para a síntese em reator tubular, reator de mistura e enzima na forma livre. Estes resultados são importantes visto as vantagens ao se trabalhar com a enzima imobilizada.

Quanto à viabilidade do processo, pode-se verificar que a aplicação industrial do produto obtido neste trabalho é bastante interessante. O xarope contendo glicose e frutose e enriquecido com frutooligossacarídeos, pode ser utilizando nas indústrias alimentícias, possivelmente como um substituto do xarope convencional, em produtos como: cereais, iogurtes, achocolatados, doces, bebidas carbonatadas ou não, entre outros.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMI, A., CAVAZZONI, V., TREZZI, M., CRAVERI, R. Cellobiose Hydrolysis by *Trichosporon pullulans* cells immobilized in calcium alginate, *Biotechnology and Bioengineering*, v.32, 391-395, 1988.
- ALLEN, A. T. & WOOD, R. M. Molecular Association in the Sucrose-Water system *Sugar Technology Reviews*, 2, 165-180, 1974.
- AZHARI, R.; SZLAK, A. M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 11, n. 1, p. 105-117, 1989.
- BAJPAI, P. & MARGARITIS, A. Characterization of molecular-sieve-bound inulinase, *Journal fermentation technology*, 65, 239-242, 1987.
- BARATTI, J.C; ETTALIBI, M. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1987, 26,13-20.
- BARUQUE FILHO, E. A. , Transferência de Massa e Cinética em Reator Diferencial de Leito Fixo com amiloglucosidase Imobilizada em Quitina, Tese de Mestrado, Coppe, Rio de Janeiro-RJ, 1991.
- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production on Inulinase by New Mold of *Penicillium rugulosum*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v72. No.6, 491-494, 1991.
- BLAKESLEY, R.W. & BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrilamide gels using Cromassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry*, v82, 4, 580-582, 1977.
- BOWSKI, L.; SSAINI, R.; RYU, D. Y. and VIETH, W.R. Kinetic Modeling of the Hydrolysis of Sucrose by Invertase, *Biotechnology and Bioengineering*, XIII, 641-659, 1971.
- CABRAL, F. A. Estudo Cinético da Invertase Livre e Imobilizada em Alginato de Cálcio, tese de Mestrado, Unicamp, Campinas-SP, 1989.
- CARRARO, C. H. Probióticos e Prebióticos. www.enteral.com.br, capturado em agosto 2002.

- CARREA, G. & COLOMBO, G. Coupling High Enzyme activity and Stability: challengin target, *Tibetch* October. v.18, 401-402, 2000.
- CHIEN, CHING-SHAN; LEE, WEN-CHIEN; LIN, TSAO-JEN Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides, *Enzyme and Microbial and Technology*, 29, 252-257, 2001.
- CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Liquido de Alto Desempenho HPLC, Editora Edgard Blücher Ltda, 1ªedição, p14-15, 1998.
- COLLINS, C.H.; BRAGA,G.L.; BONATO, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos, Campinas, Editora da Unicamp, 6ª ed., 1995.
- CONTIERO, J. Estudo da Produção da Enzima Invertase Extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*, Tese de Doutorado, FEA/UNICAMP, 1992.
- COSTA, F., A. A. Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras, Dissertação de Mestrado, FEA-UNICAMP, 1986.
- CRITTENDEN, R.G. & PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides, *Trends in Food Science and Tecnology*, November,v7,353-361,1996.
- CRUZ-GUERRERO, A.; GARCIA-PEÑA, I.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-LUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A Wild Inulinase Hyperproduction Strain, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v80,no.2, 159-163, 1995.
- DIONEX CORPORATION, Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Eletrochemical Detector, *Tecnical Note* 21, 1994.
- DRAGET, I. K. , SKJAK-BRAEK,G., SMIDSRØD,O. Alginate based new materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 47-55,1997.
- DUAN, K. J; CHEN, J.S and SHEW, D.C. Kinetic Studies and Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose, *Enzyme Micrbioal Technology*, v16, 334-339, 1994.

- EFSTAHIOU, I.; REYSSET, G.; TRUFFAUT, N. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8, Applied Microbiology and Biotechnology, 25:143-149, 1986.
- EKHART, P.F. & TIMMERMANS, E. Techniques for the production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) in: Bulletin of the IDF 313, 59-64, 1996.
- ERTESVÁG, H., VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates, Polymer Degradation and Stability, 59, 85-91, 1998.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*, Applied Microbiological Biotechnological, 23:13-20, 1987.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinase from *Aspergillus ficuum*, enzyme and Microbial Technology, 28, 596-601, 2001.
- EUZENAT, O. GUIBERT, A. COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4, Process Biochemistry, 32, 237-243, 1997.
- FERREIRA, C.L.L.F. & TESHIMA, E. Prebióticos – Estratégia dietética para manutenção da microbiótica colônica desejável, Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, ano III, no.16, 22-25, 2000.
- FUTAGAWA, M. Estudo da Imobilização da Enzima Inulinase, Relatório Científico, Fapesp, 2002.
- GASPARI, J. W.; GOMES, L. H; TAVARES, F. C. A. Imobilização da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de Extratos de *Helianthus tuberosus* L. Scientia Agricola, v56, no.4, 1999.
- 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 Microbiological Technological, v2, 45-53, 1980.
- GUPTA, A. K., BHATIA, I. S. Glucofructosan Biosynthesis in *Fusarium oxysporum*, Phytochemistry, v19, 2557-2563, 1980.

- GUPTA, A. N.; DAVINDER, P.S.; KAUR, N. e SINGH, R. Production, purification and Immobilisation of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal Chemical Technology Biotechnology, 59: 377-385, 1994.
- HARTMEIER, W. Immobilized biocatalyses: An Introduction, Springer-Verlag, Heidelberg, 1988.
- HAYASHI,S., NONOGUCHI,M., TAKASAKI,Y., UENO,H., IMADA,K. Purification and Properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* TCC 20524. Journal Industrial Microbiology., v.7, p.251-256, 1991.
- HENLEY,P.J., SADANA,A. Seires-type enzyme deactivations: influence of intermediate activity deactivation kinectics, Enzyme Microbiology, v6, 35-41, 1984.
- HENLEY,P.J., SADANA,A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism, Enzyme Microbiological Technological, v7, 50-60, 1985.
- HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. Applied and Microbiology Biotechnology, Berlin, v. 42, n. 4, p. 516-521, dec., 1994.
- HEWITT, G.M., GROOTWASSINK, J.W.D. Simultaneous production of inulinase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*, Enzyme Microbiological Technological, v6, 263-269, 1984.
- HIDAKA,H. & HIRAYAMA,M. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. Biochemical Society Transaction, v.19, p.561-565, 1991.
- HIDAKA,H., HIRAYAMA,M., SUMI,N. A Fructoligosaccharide Producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20661. Agricultural Biological Chemical , v.52(5), p.1181-1187, 1989.
- HIDAKA,H.; HIRAYAMA,M; SUMI, N. A fructoligosaccharides Producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611, Agricultural Biological Chemical, v52 (5), 1181-1187, 1988
- HIRAYAMA,M., SUMI,N., HIDAKA,H. Purification and Properties of a Fructoligosaccharide from *Aspergillus niger* ATCC 20661. Agricultural Biological Chemical.,v.53(3), p.667-673, 1989.

- JAIN, D., GHOSE, T. K. Cellobios Hydrolysis Using *Pichia etchellsii* cells immobilized in calcium alginate, *Biotechnology and Bioengineering*, v.XXVI, 340-346, 1984.
- JUNG,H.K., YUN,J.W., KANG,K.R., LIM,J.Y., LEE,J.H. Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose., *Enzyme Microbiological Technolgy* , v.11, p.491-494, August,1989.
- JUNG,K.H.; LIM,J.Y.; YOO,S.J.; LEE,J.H., YOO,M.Y. Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnology Letters*, v9,703-708,1987.
- KABBE, 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 e purificação de inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- KARISSON, E., RYDÉN, L., BREWER, J. Ion Exchange Chromatography. In: JANSON, J-C & RYDÉN,L. Protein Purification, New York, VCH, 1989
- KIM, C.H. & RHEE, S.K. Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin, *Biotechnology Letters*, 11(3), 201-206, 1989.
- KIM, D.H, CHOI, Y.I, SONG, S.K, YUN, J.W. Production of inulo-oliogossacarides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, v19, 4, 369-371, 1997.
- KITAKANO, N.S.; CHEIRSILPA, B & IWAMURA, K.; KUSHIBIKI, M.; KITAKAWO, A. YONEMOTO, T. Kinetic model for oligossacarides hydrolyses using supended and immobilized enzymes, *Bichemical Engineering Journal*, 201-209-1998.
- KNIGHT, P. Chromatography: 1989 report. *Biotechnology*, v. 7, p. 243-249, mar., 1989.
- KUSHI, R.T.; TREVISAN, H.C.; MONTI, R; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, *Anais do XI SINAIFERM*, 1996,
- KUNZ, C., RUDOLFF, S., HINTELMANN, A., POHLENTZ, G., EGGE, H. High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligossacarides, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 685, 211-221, 1996.

- LEAEMLI, V.K. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, v227, 680-685, 1977.
- LEE, Y. C. Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography, A*, 720, 137-149, 1996.
- LEHNINGER, A. L. Proteínas: purificação e caracterização, In: *Bioquímica*. Editora Edgard Blucher, Ltda, cp7, 109-125, 1977.
- LEVENSPIEL, O. *Chemical Reaction Engineering*, New York, John Wiley, 1972.
- LORENÇO, C.M. Estudo do processo de obtenção de glicose e frutose a partir da sacarose, *Dissertação de Mestrado*, FEA, UNICAMP, (em andamento).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, W.J., FARR, A.L.; Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275, 1951.
- MAGNANI, D. Enzyme-Using Industries Towards 2005- applications, producers, markets, www.buscom.com, capturado em agosto 2002.
- MAKINO, Y.; TREICHEL, H., SCANAVINI, H.F.A.; MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. Otimização do meio industrial para produção da inulinase por *Kluyveromyces*, *Anais do 14º Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 25-28 de outubro, Natal-RN, 2002.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from Four Yeast, *Lebensm.-Wiss. U-Technol.*, 21, 271-274, 1988.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) Frutans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Journal Chemical Technological Biotechnological*, 54, 311-315, 1992
- MARTINSEN, A., SKAJAK-BRAEK, SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization Material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads, *Biotechnology and Bioengineering*, v33, 79-89, 1989.
- MARTENS, D.A & FRANKENBERGEN JR., W.T. Determination of Saccharides by High Performance Anion- Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, *Chromatographia*, v29, 1/2, January, 1990.
- McKELLAR, R.C.; MODLER, H.W. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.31, p.537-541, 1989.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.
- MITSOUKA, T. Bifidobacteria and their role in human health, *Journal of Industrial Microbiology*, 6, 263-268, 1990.
- MODLER, H. W. Bifidogenic factors- sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal*, v.4, p.383-407, 1994.
- MOFODI, N., AGHAI-MOGHADAM, M. SARBOLLOUKI, M.N. Mass preparation and characterization of alginates microspheres, *Process Biochemistry*, 35,885-888,2000.
- MULLER V. Alimentos Funcionais, Duas Rodas – Acontece - Ano II, número 08, agosto e setembro,p2-3, 2001.
- NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S.; MATSUO, T.; SUIKO, M., and OHTA, K. Production, Purification and Properties of an Endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that Liberates Inulotriose, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(4), 313-318, 1997.
- ÖNGEN-BAYSEL, G. & SUKAN, S. S. Production of Inulinase by Mixed Culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letters*, 18(12) 1431-1434, 1996.
- ÖNGEN-BAYSEL, G, SUKAN, S.S., VASSILEV, N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*, *Biotechnology Letters*, v19, 3, 275-280, 1994.
- ONODERA, S. & SHIOMI, N. Purification and Subsite Affinities of exo-Inulinase from *Penicillium trzebinskii*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 56(9), 1443-1447, 1992.
- O’SULLIVAN,M.G.;THORNTON,G.;O’SULLIVAN,G.C.;COLLINS,J.K. Probiotic bacteria: myth or reality? , *Trends in Food Science & Technology*, December, v2, 309-314, 1992.
- ORTEGA,N. BUSTO,M.D., PEREZ-MATEOS, M. Optimisation of β -glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gels, *Bioresource Technology*, 64,105-111,1998.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, N.; FONTANA, J. recent developments in microbial inulinase: its production, properties, and Industrial application, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v18, 35-52, 1999.
- PATEL, V.; SAUNDERS, G.; BUCKE, C. Production of Fructooligosaccharides by *Fusarium Oxysporum*, *Biotechnology Letters*, v16, 11, 1139-1144, 1994.
- PAZUR, J.H. Transfructosilation Reactions of an Enzyme of *Aspergillus orizae*. *Journal Biological Chemical*, v.199, p.217-225, 1952.
- PARK, Y.K & ALMEIDA, M.M Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v7, 331-334, 1994.
- PEREIRA, A.M.; COSTA, F.A.A.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F. *In vitro* Synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextransucrase from *leuconostoc mesenteroides*, *Biotechnology Letters*, v20:4, 397-401, 1998.
- PESSOA Jr., A.; VITOLO, M. Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction, *Biotechnology Techniques*, v11, 6, 421-422, 1997.
- PESSOA Jr., A.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extratction, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v16, no.3, 1999.
- PETER, H.W., AHLERS, J., MOREIRA, R.A *Cinética Enzimática*, Editora Universidade do Ceará, 1987.
- PLAYNE, M.J & CRITTENDEN, R.G Commercially available oligosaccharides in: *Bulletin of the IDF* 313,10-26, 1996.
- RICHARD, H, *Enzimologia e Biocatálise*, Em : *Biotecnologia* ,Editor R. Scriban, Editora Anole Ltda, 203-205, 1984.
- RIBEIRO, E.J *Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada*, Tese de Doutorado, FEA-UNICAMP, 1989.

- ROUWENHORST, R. J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 11, p. 3337-3345, 1990.
- ROUWENHORST, R. J.; VISSER, L. E.; VAN DER BAAN, A.A.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. Production, Distribution and Kinetic Properties of Inulinase in Continues Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, Applied and Enviromental Microbiology, may, 1131-1137, 1988.
- SANT'ANNA, JR. , G. L. Difusão e Cinética em Enzimas Imobilizadas e reatores com Enzima Imobilizadas, Apostila do Curso Tecnologia de Processos Enzimáticos, Coppe, UFRJ, Rio de Janeiro, 1989.
- SANTOS, A.M.P. Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Dissertação de Mestrado, FEA, UNICAMP,1998.
- SANTOS, A. M.P. & MAUGERI, F. Produção e Purificação de Inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus*, II Congresso de Engenharia de Processos do MERCOSUL, 30 de agosto a 02 de setembro – Florianópolis- SC, 1999.
- SANTOS, A. M.P.; SMIGIC, N.; MAUGERI, F. Production and Purification of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*, ESBES4, Delft, Netherlands, 28-30 august 2002.
- SANTOS,V.,M., Estudo das Condições de Hidrólise Ácida para Obtenção de Dextrana Clínica, Dissertação de Mestrado, FEA, UNICAMP,1996.
- SCHIWECK, H.; MOHAMMED, M.; RAPPA, K. M. New Developments in the use Sucrose as Industrial Bulk Chemical, In: Carbohydrates as Organic Raw Materials, ed. Lichtenthaler, F. W. p.57-94, VCH, New York, 1995.
- SCHNEIDER, A. L. S. Estudo da Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Tese de Doutorado, FEQ-UFSC, 1996.
- SOGA,T, SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection, Food Chemistry, 69, 339-344, 2000.

- SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y. Efeito da Agitação e da Aeração na Produção de Inulinase em Processo de Batelada simples por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, Dissertação de Mestrado, FEA-UNICAMP, 2001.
- SPALDING, B. J. Downstream processing: key to slashing production costs 100 fold. *BioTechnology*, v. 9, p. 229-232, mar., 1991.
- SPIEGEL, J.E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V.H.; SCHMITT, D.F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredient. *Food Technology*, v.48, p.85-89, 1994.
- SCHIWECK, H., MOHAMMED, M., RAPP, K.M. New Developments in the Use Sucrose as Industrial Bulk Chemical, In: "Carbohydrates as Organic Raw Materials", ed. Lichtenthaler, F.W., p.57-94, VCH, New York.
- STEWART, W. W. & SWAISGOOD, H. E. characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards, *Enzyme Microbiological Technological*, v15, 922-927, 1993.
- STRAATHOF, A. J. J., KIEBOM, A. P. G., VAN BEKKUM, H. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose, *Carbohydrate Research*, 146, 154-159, 1986).
- SU, Y.C., SHEU, C.S., CHIEN, Y.Y., TZAN, T.K. Production of β -fructofuranosidase with transfructosylating activity for fructooligosaccharides synthesis by *Aspergillus japonicus* NTU-1249, *life Science*, 15:3, 131-139, 1991.
- TANAKA, H., MATSUMURA, M., VELIKY, A.I. Diffusion Characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads, *Biotechnology and Bioengineering*, v.XXVI, 53-58, 1984.
- TREICHEL, H. Estudo de meios industriais para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, Dissertação de Mestrado, FEA-UNICAMP, 2001.
- Van BALKEN, J.A. M, van DOOREN, Th. J.G.M., van den TWEEL, W.J.J., KAMPHUIS, MEIJER, E.M. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1^F- fructosyltransferase, *Applied Microbiological Biotechnological*, 35, 216-221, 1991.
- VANDAMME, E., J., & DERYCKE, D. G. Fermentation Process, Properties and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 29: 139-176, 1983.

- VRANEŠIĆ, D.; KURTANJEK, Z.; SANTOS, A. M. P. & MAUGERI, F. Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces bulgaricus*, Food Technology Biotechnology, 40 (1), 67-73, 2002.
- YUN, J.W.; JUNG, K.H.; OKU, J.W.; LEE, J.H. Semi-batch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. Applied Biochemical and Biotechnology, v.24/25, p.299-308, 1990.
- WANG, X.; RAKASHIT, S.K. Iso-Oligosaccharides production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*, Process Biochemistry, 35, 771-775, 2000.
- WEI, W.; ZHENG, Z.; LIU, Y. and ZHU, X. Optimizing the culture Conditions for Higher Inulinase Production by *Kluyveromyces sp* Y-85 and Scallin-up Fermentation, Journal of Fermentation and Bioengineering, 86 (4), 395-399, 1998.
- WEISS, J. Ion Chromatography, VHC Publishers, Inc., New York, NY (USA), second edition, 1995.
- WITHAKER, J.R. Enzyme Purification, In: _____ Principles of Enzymology for the food Science, New York: Marcel Dekker INC, cp3, 65-101, 1972.
- WONG, S. S. & WONG, LEE-JUN, C. Chemical Crosslinking and the Stabilization of Proteins and Enzymes, Enzyme Microbiology Technology, v14, novembro, 2001.
- XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Purification and Characteristics of Two Exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*, Journal of Fermentation and Bioengineering, v67, n5, 331-334, 1989.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application, Enzyme and Microbial Technology, 19:107-117, 1996.
- MITSOUKA, T. Bifidobacteria and Their Role in Human Health, Journal Industrial Microbiology, v.6, p.263-268, 1990.
- ZIESENITZ, S.C., SIEBERT, G., IMFIELD, T. Cariological Assesment of Leucrose as Sugar Substitute, Caries Research, v.23(5), p.351-357, 1989.

ANEXO 1

Cabral (1989) realizou um estudo em relação a fatores de correção para taxas iniciais de reação sobre a cinética de inibição pelo substrato, utilizando trabalhos da literatura. Inicialmente escreveu-se as taxas iniciais de reação observadas como:

$$v_{obs} = v^* f(S) \quad (1)$$

Onde:

v_{obs} = taxa inicial de reação observada

v^* = taxa inicial de reação seguindo o modelo de inibição pelo substrato.

$f(S)$ = fator de correção (desvio da cinética de inibição pelo substrato)

Em seguida foram feitas três suposições em relação ao fator de correção $f(S)$.

1ª Suposição

$$f(S) = W_f/W_t \text{ (como sugerido por Bowski *et al.*, 1971)} \quad (2)$$

onde:

W_f = concentração de água livre

W_t = concentração de água total (livre + ligada)

A diferença entre a concentração de água livre (W_f) e a concentração de água total (W_t), se deve ao efeito de ligação de água na molécula de sacarose (corresponde ao número de hidratação n).

As seguintes realções a seguir, podem ser escritas:

$$W_t = \left(\frac{\rho - 342.S}{18} \right) \quad (3)$$

$$W_f = W_t - n.S \quad (4)$$

Através de tabelas da literatura sobre densidades de soluções de sacarose, pode-se escrever a densidade da mesma como uma função linear da concentração:

$$\rho = \rho_o + \delta.S \quad (5)$$

onde:

ρ = densidade da solução (g/L)

ρ_o = densidade da água (g/L)

S = concentração da sacarose (mol/L)

n = número de hidratação

δ = constante de proporcionalidade (g/mol)

$$\frac{W_f}{W_t} = \frac{W_t - n.S}{W_t} \quad (6)$$

substituindo-se as equações 3 e 5 em 6, obtém-se

$$f(S) = \frac{W_f}{W_t} = 1 - \frac{18.n.S}{\rho_o + (\delta - 342).S} \quad (7)$$

2ª suposição

$$f(S) = \frac{W_f}{W_o} \quad (8)$$

onde:

W_f = concentração de água livre

W_o = concentração de água pura

O argumento para esta suposição, é análoga a anterior, ou seja, que a água ligada não seja disponível à reação e que a mesma influencie na formação de produtos de reação, pelo seguinte mecanismo:



A partir destas suposições,

$$v = k_2 \cdot ES \cdot w_f \quad (9)$$

$$V_{\max} = k_2 \cdot E_t \cdot W_o \quad (10)$$

Desta forma:

$$v_{\text{obs}} = v \cdot \frac{W_f}{W_o} \quad (11)$$

Pelas equações 4, 5 e

$$W_o = \frac{\rho_o}{18} \quad (12)$$

obtém-se

$$W_f = \frac{\rho - 342.S}{18} - n.S \quad (13)$$

$$W_f = \frac{(\rho_o - \delta.S)}{18} - \frac{342.S}{18} - n.S \quad (14)$$

Obtém-se a equação geral na forma:

$$\frac{W_f}{W_i} = 1 + \frac{18}{\rho_o} \left[\frac{\delta}{18} - \frac{342}{18} - n \right] \cdot S \quad (15)$$

3ª suposição

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_o} \quad (16)$$

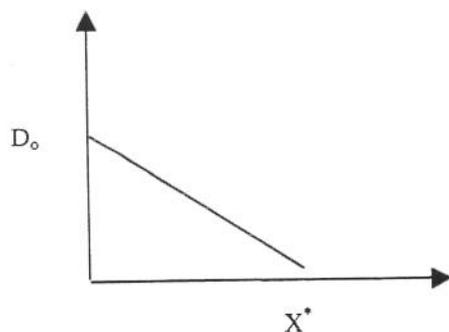
onde

$D(S)$ = difusividade molecular da sacarose à concentração S de sacarose

D_o = difusividade molecular da sacarose à diluição na infinita

Bowski *et al.*, (1971) testou esta correção de forma inadequada, já que utilizou a correção nas equações de Stokes-Einstein e Michaelis-Menten e não sobre a cinética de inibição pelo substrato.

Segundo os dados de English e Dole (citato por Cabral, 1989), em que a difusividade $D(S)$ decresce linearmente com a concentração de sacarose em % em peso, e a extrapolação de $D(S)=0$ é assumida ao redor de 81% em peso, como ilustrado abaixo.



Onde

\bar{X} = concentração de sacarose em (g/g)

$X^* = 0,81$ g/g

Assim sendo, tem-se:

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_o} = 1 - \frac{1}{x^*} \bar{X} \quad (17)$$

Como normalmente trabalha-se com a concentração de sacarose em mol/L, a relação de correção pode ser escrita na forma:

$$\bar{X} = S \frac{M}{\rho}$$

onde:

S= concentração de sacarose em mol/L

ρ =densidade da solução em g/L

M= peso molecular da sacarose (342 g/mol)

Sendo:

$$\rho = \rho_0 + \delta S$$

$$x = \frac{SM}{\rho_0 + \delta S} \quad (18)$$

obtem-se a relação geral na forma:

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_0} = 1 - \frac{M}{x^*} \frac{S}{\rho_0 + \delta S} \quad (19)$$

Através de dados de densidade tabeladas na literatura, obtém-se:

$$\text{Para } 40^\circ\text{C} \Rightarrow \rho = 9999,2 + 126,575 \cdot S$$

$$\frac{D(S)}{D_0} = 1 - 0,4255 \frac{S}{1 + 0,1276 S}$$

$$\text{Para } T = 50^\circ\text{C} \Rightarrow \rho = 9999,2 + 125,945 \cdot S$$

$$\frac{D(S)}{D_0} = 1 - 0,4274 \frac{S}{1 + 0,1275 S}$$