

URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
USANDO ESTRATÉGIAS DE FERMENTAÇÃO BATELADA E BATELADA
ALIMENTADA EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

VIVIANE ASTOLFI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

JULHO DE 2010

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
USANDO ESTRATÉGIAS DE FERMENTAÇÃO BATELADA E BATELADA
ALIMENTADA EM BIORREATOR DE LEITO FIXO**

Viviane Astolfi

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D. Sc.
(Orientadora)

Débora de Oliveira, D. Sc.
(Orientadora)

Marcio Antonio Mazutti, D. Sc.
(URI-Campus de Erechim)

Vera Maria Rodrigues, D. Sc.
(UPF)

Erechim, 04 de Agosto de 2010.

A maior de todas as torres começa aqui no solo.

(Provérbio Chinês)

Dedico esta conquista ao Rubens...

*Por cada Dia... por todos os Dias... pelo Amor...
pela Amizade... pelo seu Tempo dedicado a
mim... por Você... Simplesmente: Obrigada por
existir e agigantar nosso desejo de viver,
“crescer” e vencer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ti Deus, que Faz existir e acontecer. Por conduzir-me a um caminho útil e cercado de pessoas as quais, como eu, são ferramentas de Seu Trabalho neste meu ignorante (ou insuficiente) entender a respeito da Vida e do Viver.

Desejo expressar minha gratidão aqueles que generosamente me ajudaram a desenvolver este trabalho com os fragmentos de seus conhecimentos e técnicas:

Aos meus familiares...

À Angela, minha irmã do coração.

Ao Rubens.

Em especial, às minhas orientadoras Professoras Débora e Helen pela oportunidade e por compartilharem de seus conhecimentos, incentivarem e nortearem a realização deste trabalho, pelo respeito, confiança e amizade.

Ao Professor Márcio, pelas sugestões, atenção e amizade.

Aos Professores Altemir e Rogério pelas oportunidades na Iniciação Científica, pois a partir desta, é que me despertou o interesse pela pesquisa.

À Gabriela, Giovani e Ricardo pelo desenvolvimento de parte do trabalho e pela disponibilidade em me ajudar.

Aos demais colegas e amigos do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI Campus de Erechim e dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Vegetal, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelas experiências compartilhadas.

À URI – Campus de Erechim e ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

À CAPES, órgão financiador deste projeto, e que possibilitou a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação Apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo

Viviane Astolfi

Agosto/2010

Orientadoras: Helen Treichel

Débora de Oliveira

A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina e na produção de frutooligossacarídeos, produto utilizado como ingrediente funcional em alimentos, sendo considerado um alimento prebiótico. Nas duas últimas décadas houve um aumento considerável no emprego de fermentação estado sólido (FES) para a obtenção de enzimas de interesse em alimentos, incluindo a inulinase. No entanto, poucos trabalhos reportados na literatura abordam a produção de inulinase por FES empregando batelada alimentada. O objetivo deste trabalho foi a avaliação do desempenho do processo de produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Inicialmente foram realizados estudos preliminares para a produção de inulinase por FBS e FBA em pequena escala. A partir dos resultados obtidos foram realizados 7 experimentos em biorreator de leito fixo para a avaliação da produção de inulinase e avaliação cinética do processo. A caracterização parcial do extrato enzimático bruto obtido por FBA foi realizada como última etapa no desenvolvimento deste trabalho. Entre os resultados obtidos na produção de inulinase usando estratégias de FBS e FBA em biorreator tem-se que a melhor condição de fermentação encontrada foi a de estratégia de FBA com entrada de ar úmido resultando em uma produção máxima de $586 \pm 62,6$ U.gds.⁻¹, após 24 horas. A produção de inulinase mostrou diferenças significativas em relação à altura do biorreator. Na avaliação cinética do processo foi verificado que em fermentações com entrada de ar seco (FBS) o aumento da temperatura do ar de entrada mostrou ter influência no tempo

onde as taxas máximas foram verificadas, sendo que quanto mais alta a temperatura menor foi esse tempo. A temperatura máxima obtida na corrente de ar na saída do biorreator (FBA) atingiu valores próximos a 50°C, não afetando o teor de umidade do substrato, o qual se manteve acima de 65%. Para o extrato enzimático obtido por (FBA) definiu-se pH e temperatura ótimo de 4,5 e 55°C, respectivamente. A temperatura de maior estabilidade foi de 40°C e o pH de maior estabilidade foi 4,5. Os resultados mostraram que inulinase apresenta alta estabilidade em temperatura de congelamento e resfriamento (-80; -10 e 4°C) e a atividade enzimática aumenta gradativamente chegando ao dobro da atividade inicial após 225 dias de armazenamento. No estudo cinético os valores para as constantes cinéticas foram K_m 2,94 e 8,71 mM, e V_{max} 0,0527 mol.L.min⁻¹ e 0,0175 mol.L.min⁻¹, para sacarose e inulina, respectivamente.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

Production of inulinase by solid state fermentation in batch and fed-batch mode in fixed-bed bioreactor

Viviane Astolfi

August/2010

Advisors: Helen Treichel

Débora de Oliveira

Inulinases are important enzymes for the production of fructose by the enzymatic hydrolysis of inulin and in the production of fructooligosaccharides, a functional ingredient for food industries, considered a prebiotic compound. On the last two decades, a considerable enhancement on the use of solid state fermentation (SSF) for production of enzymes of interest for food industries was observed. However, just a few works reported in the literature mention the production of inulinases by fed-batch fermentation. The objective of this work was to evaluate the performance of the process of production of inulinases by SSF using strategies of batch (BF) and fed-batch fermentation (FBF) in fixed-bed bioreactor using the yeast *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Initially preliminary studies were carried out for the production of inulinases by BF and FBF in small scale. From the results obtained, 7 experiments were performed in fixed-bed bioreactor for evaluation of inulinase production and kinetic evaluation of the process. The partial characterization of the crude enzymatic extract obtained by FBF was also carried out. The results obtained for inulinase production using strategies of BF and FBF in bioreactor showed that the best experimental condition was by FBF with wet air inlet, resulting in a maximum production of 586 ± 62.6 U.gds.⁻¹, after 24 hours of fermentation. The inulinase production points out significant differences in relation to the bioreactor height. The kinetic evaluation of the fermentations with dry air inlet permitted observes that an increase in air temperature showed high negative influence on fermentation time. The highest temperature obtained in the air flow in the outlet of the bioreactor reached values near to 50°C, do not affecting the moisture content of the substrate, kept above 65%. The enzymatic extract obtained by FBF showed an optima pH and temperature of 4.5 and

55°C, respectively. The temperature and pH of stability were 40°C and 4.5, respectively. Results showed that the extract presents high stability to low temperatures (-80, -10 and 4°C) and the enzymatic activity enhances gradually, reaching two times the original one after 225 days of storage. The constant kinetics were determined as K_m 2.94 and 8.71 mM, and V_{max} 0.0527 mol.L.min⁻¹ and 0.0175 mol.L.min⁻¹, for sucrose and inulin, respectively.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	x
LISTAS DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
II.1 A inulina	6
II.2 Inulinase	7
II.2.1 Produção de Inulinase	8
II.2.2 Aplicações das inulinasas e produtos derivados	12
II.3 Aspectos importantes relacionados à fermentação em estado sólido	14
II.3.1 Biorreatores para FES	15
II.3.2 Vantagens, desvantagens e desafios no processo de FES.....	16
II.3.3 Aplicação de FES e alguns exemplos na indústria de alimentos	18
II.4 Fermentação em batelada alimentada	20
II.5 Avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e temperatura na reação e estabilidade enzimática	23
II.6 Considerações finais	25
III MATERIAL E MÉTODOS	27
III.1 Micro-organismo, pré-inóculo e substratos	28
III.2 Testes preliminares para produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA)	28
III.3 Produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo	29
III.3.1 Fermentação batelada simples (FBS), fermentação batelada alimentada (FBA) e diferentes estratégias de aeração	29
III.3.2 Determinação da temperatura	30

III.3.3 Determinação de CO ₂	30
III.3.4 Determinação da umidade	31
III.4 Caracterização da inulinase	31
III.4.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática	31
III.4.2 Efeito da estabilidade térmica da enzima	32
III.4.3 Efeito do pH na estabilidade da enzima	33
III.4.4 Efeito da estabilidade da enzima bruta a baixas temperaturas	33
III.4.5 Determinação de K _m e V _{max}	33
III.5 Métodos analíticos.....	33
III.5.1 Determinação da atividade enzimática para as fermentações	33
III.5.2 Determinação da atividade enzimática para caracterização da enzima.....	34
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
IV.1 Produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA): Testes preliminares	36
IV.2 Produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo	39
IV.2.1 Produção de inulinase.....	39
IV.2.2 Avaliação cinética para temperatura e produção de CO ₂	42
IV.3 Caracterização parcial da inulinase	45
IV.3.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática	46
IV.3.2 Temperatura de estabilidade para a enzima inulinase	50
IV.3.3 Influência do pH no estudo da estabilidade para a enzima inulinase.....	54
IV.3.4 Estabilidade da enzima a baixas temperaturas	56
IV.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos K _m e V _{max}	57
V CONCLUSÕES.....	62
VI SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
VII REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS	66

LISTAS DE FIGURAS

Figura II.1: Fórmula estrutural da Sacarose (GF), Inulina (GFn) e Oligofrutose (GFn, Fm), onde G = Glicose e F = Frutose.....	6
Figura II.2: Fórmula estrutural da inulinase.....	7
Figura III.1: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo: a) compressor; b) umidificador; c) controle de vazão, temperatura e umidade; d) sensores de temperatura; e) medidor de CO ₂ , temperatura e umidade.....	30
Figura IV.1: Cinética da fermentação batelada simples (100%) e fermentação em batelada alimentada (50; 33,3 e 25%) para produção de inulinase.....	37
Figura IV.2: Perfis experimentais para umidade obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase durante as 36 horas de fermentação em béquer por fermentação batelada simples (100%) e fermentação em batelada alimentada (50; 33,3 e 25%).	38
Figura IV.3: Produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos de atividade enzimática em cada uma das zonas dentro do biorreator: Zona 1 (0-10 cm), Zona 2 (10-20 cm), Zona 3 (20-30 cm) e Zona 4 (30-40 cm).	40
Figura IV.4: Valores para umidade avaliados em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator: Zona 1 (0-10 cm), Zona 2 (10-20 cm), Zona 3 (20-30 cm) e Zona 4 (30-40 cm).	41
Figura IV.5: Perfis experimentais para temperatura obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase. Para os perfis de temperatura medida na entrada e saída de fluxo de ar (T0 e T4) e no interior do biorreator a 10, 20 e 30 cm (T1, T2 e T3, respectivamente).....	43
Figura IV.6: Perfis experimentais para CO ₂ obtidos nos experimentos da avaliação cinética.....	45
Figura IV.7: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de inulinase por FBA no biorreator leito fixo: Efeito da temperatura e do pH.	48
Figura IV.8: Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius.....	53
Figura IV.9: Tempo de meia vida (horas) experimental versus a temperatura.	54

Figura IV.10: Influência do pH na estabilidade do extrato enzimático obtido por FBA. ...	56
Figura IV.11: Velocidade de reação de inulinase (atividade enzimática) à temperatura de 50°C em função da concentração de substrato sacarose.....	58
Figura IV.12: Velocidade de reação de inulinase (atividade enzimática) à temperatura de 50°C em função da concentração de substrato de inulina.	59
Figura IV.13: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para sacarose.....	60
Figura IV.14: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para inulina.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1: Substrato, forma de cultivo e micro-organismos que expressam a inulinase referente a trabalhos publicados.	9
Tabela II.2: Principais aplicações de FES na indústria de alimentos.	19
Tabela III.1: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização da atividade.	31
Tabela IV.1: Variáveis investigadas no processo de produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo.	39
Tabela IV.2: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura.	46
Tabela IV.3: Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para atividade da inulinase em termos do pH e da temperatura...	47
Tabela IV.4: ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o DCCR.	48
Tabela IV.5: Valores de temperatura e pH ótimos para inulinasas obtidas por diferentes micro-organismos, referentes a trabalhos publicados na literatura nos últimos anos.	49
Tabela IV.6: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 40°C.	50
Tabela IV.7: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 50°C.	51
Tabela IV.8: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 60°C.	52
Tabela IV.9: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 70°C.	52
Tabela IV.10: Valores de K_d em função de cada temperatura estudada.	52
Tabela IV.11: Valores de K_d e tempos de meia vida estimados para enzima inulinase.	54
Tabela IV.12: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados.	55
Tabela IV.13: Atividade enzimática em função da concentração da sacarose [S].	57
Tabela IV.14: Atividade enzimática em função da concentração da inulina [I].	58

Tabela IV.15: Valores de K_m e V_{max} obtidos para hidrólise de sacarose e inulina publicado em trabalhos nos últimos anos.....	61
--	----

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Os conceitos sobre nutrição mudaram nos últimos anos. Atualmente, o foco está no uso de alimentos que promovam bem-estar, saúde e redução de risco de doenças. Esses conceitos se tornaram populares para o consumidor e há uma crescente consciência sobre os benefícios adicionais e potenciais no mercado alimentício. O desenvolvimento de alimentos funcionais, por exemplo, é uma sugestão para a contribuição da melhoria de qualidade de saúde e do bem-estar dos consumidores.

Geralmente, um alimento funcional pode ser definido como “qualquer alimento que tenha um impacto positivo na saúde do indivíduo, desempenho físico ou estado de espírito para além do seu conteúdo nutricional”. Os alimentos funcionais, além de seu teor nutricional e ser natural, irão conter o equilíbrio de ingredientes e ajudarão a melhorar muitos aspectos no organismo do ser humano, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças.

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) e a inulinase são carboidratos de reserva encontrados em algumas espécies vegetais. São homopolímeros lineares formados por unidades de frutose na posição β -2,1 e, eventualmente, por uma unidade de glicose terminal em posição β -1,2. Pela atuação das enzimas exo- e endo-inulinases a molécula de inulina é hidrolisada resultando frutose livre e FOS que, pelas suas propriedades físico-químicas podem ser usados como ingredientes funcionais, substituindo tanto o açúcar como a gordura nos alimentos. Em função de sua configuração espacial, inulina e oligossacarídeos apresentam resistência à atividade hidrolítica das enzimas digestivas intestinais, porém são fermentados por determinados grupos de bactérias (*Bifidobacterium*), produzindo ácidos graxos de cadeia curta e gases, além de aumentar a energia metabólica, crescimento e proliferação dessas bactérias (ROBERFROID, 2002) classificando-os como prebióticos. Assim, uma grande atenção vem sendo dada a dieta dos carboidratos, especialmente, oligossacarídeos, em particular, os fruto-oligossacarídeos.

Historicamente, a inulinase é obtida por fermentação submersa, usando meios sintéticos e resíduos agroindustriais como substratos. Os micro-organismos do gênero *Kluyveromyces* destacam-se como os maiores produtores de interesse na produção de inulinase, sendo que a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 apresenta elevada produção, devido crescerem rapidamente em altas concentrações celulares e produzirem grandes quantidades desta enzima, principalmente em meios contendo resíduos agroindustriais. Recentemente o surgimento de trabalhos de produção de inulinase por

Fermentação Estado Sólido (FES) tem apresentado perspectivas para a aplicação industrial e prevê uma boa alternativa, principalmente no sentido de agregação de valor deste.

Ainda, a produção de inulinase reportada na literatura refere-se à produção em pequenos frascos ou em mini-reatores onde são usadas poucas gramas de substrato e gradientes de massa e temperatura são minimizados. Sendo assim, para ocorrer a transição entre as escalas: bancada, piloto e indústria, faz-se necessário um aprofundado estudo de comportamento do processo em cada estágio de desenvolvimento. Na transição das escalas bancada, piloto, um dos objetivos da pesquisa é o custo-eficácia de bioprodutos, assim, é importante estudar uma técnica de fermentação que permita a produção do produto desejado com uma alta concentração e rendimento.

Os biorreatores de leito fixo apresentam uma configuração promissora, pois permitem analisar empiricamente a evolução global do processo e determinar parâmetros no controle de temperatura e umidade do meio sólido. Além disso, também é possível estudar fenômenos de transferência de calor, massa e difusão de oxigênio (DURANT, 2003).

Muitas vezes, em processos fermentativos de bateladas convencionais, as baixas concentrações de metabólicos estão provavelmente relacionadas com a elevada concentração inicial de substrato presente no meio. De acordo com Hensing *et al.* (1994), *K. marxianus* CBS 6556 possui forte tendência para produzir piruvato e acetato quando expostos à quantidades excessivas de açúcar. Sendo a síntese de inulinase por *K. marxianus* inibida quando o meio de crescimento não possui fonte limitada de sacarose (PAREKH e MARGARITIS 1985). Em razão disso, estudos que empregam condições de crescimento em meios com limitadas concentrações de carbono para produção da enzima são necessários.

Com base nestes aspectos, o principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do desempenho do processo de produção de inulinase por fermentação estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo, através do desenvolvimento das seguintes etapas:

- 1) Estudo preliminar para produção de inulinase por FES em pequena escala usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA).
- 2) Produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo usando FBS e FBA testando diferentes estratégias de aeração na entrada do biorreator.

3) No intuito de conhecer algumas propriedades da inulinase proveniente da fermentação batelada alimentada realizar a caracterização parcial da enzima.

Como forma de apresentação, o presente trabalho foi dividido em capítulos. O Capítulo II apresenta uma revisão da literatura sobre os principais assuntos abordados neste trabalho. São apresentados temas como a importância e aplicação da inulina e inulinase para a indústria alimentícia e farmacêutica, discutidos aspectos importantes de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação em batelada alimentada (FBA), a produção de inulinase por estes tipos de fermentações, além da avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e temperatura na reação e estabilidade enzimática. O Capítulo III apresenta os materiais e metodologias empregadas para o desenvolvimento de todas as etapas do trabalho. No Capítulo IV são apresentados e discutidos os resultados para a produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada e fermentação batelada alimentada em biorreator de leito fixo. Os Capítulos V; VI e VII apresentam as conclusões obtidas com a realização deste trabalho juntamente com as sugestões para trabalhos futuros e as referências bibliográficas, respectivamente.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 A inulina

A inulina é uma frutana polidispersa, constituída de uma mistura de polímeros e oligômeros superiores lineares de frutose. As unidades de β -D-frutofuranosil são mantidas entre si por ligações do tipo β (2 \rightarrow 1), e possuem uma molécula de glicose na porção inicial de cada cadeia linear de frutose, a qual é unida por uma ligação tipo (α 1- β 2), como na molécula de sacarose (ROBERFROID, 1998). Sua estrutura pode ser representada conforme a Figura II.1, onde estas unidades de frutose podem variar de 2 a 60 (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

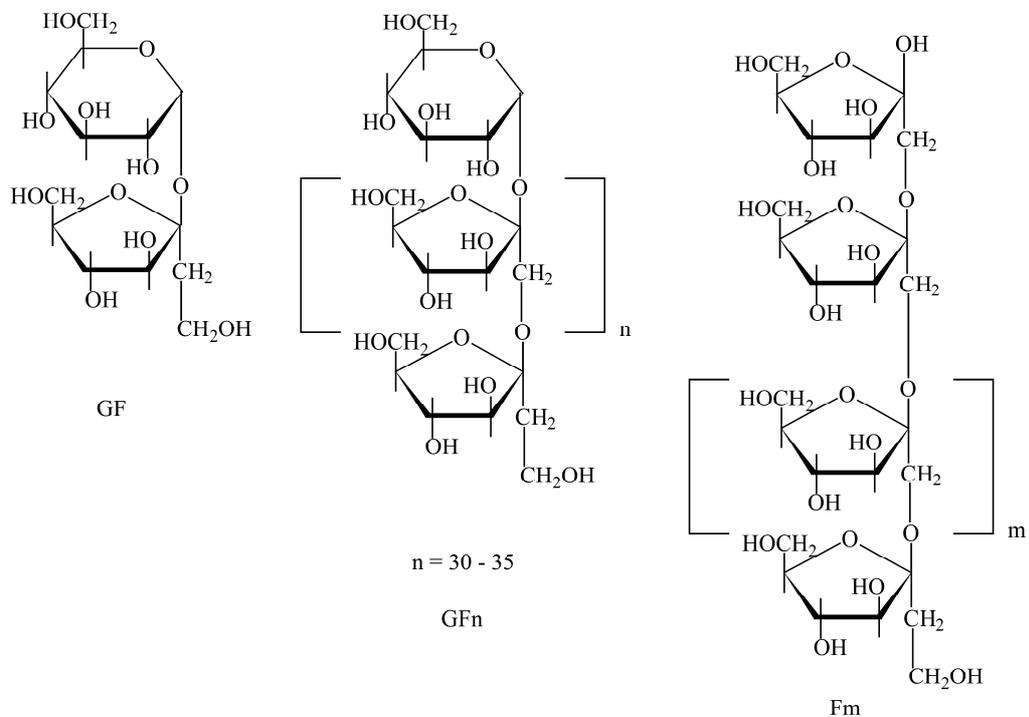


Figura II.1: Fórmula estrutural da Sacarose (GF), Inulina (GFn) e Oligofrutose (GFn, Fm), onde G = Glicose e F = Frutose.

Além disso, é um importante carboidrato de reserva em plantas, por isso muitas plantas que a contêm, fazem parte da dieta humana básica há muito tempo. É sintetizada por uma grande variedade de plantas, que representam 10 famílias e aproximadamente 36.000 espécies, tais como alcachofra de Jerusalém, aspargo, alho, cebola, trigo, centeio, cevada, dália e chicória (CARPITA; KAMABUS e HOUSLEY, 1989).

II.2 Inulinase

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos, envolvendo reações com substratos. Estas são geralmente de natureza protéica, altamente específica e apresentam grande poder catalítico (BEST *et al.*, 1994).

As inulinases (Figura II.2) são 2,1- β -D frutano furohidrolase (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero de frutose ligadas em β -2,1, liberando moléculas de frutose (ETTALIBI e BARATTI, 2001).

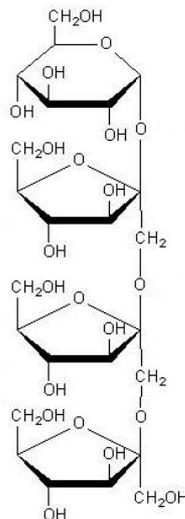


Figura II.2: Fórmula estrutural da inulinase.

A hidrólise (ácida ou enzimática) da inulina produz oligômeros de frutose e são denominados de fruto-açúcar, fruto-oligossacarídeos (FOS) ou, de forma simplificada, oligofrutoses (ROBERFROID *et al.*, 1998).

A hidrólise ácida da inulina não é um método adequado para a produção de frutose, pois resulta em formação de anidridos difrutose, que não têm capacidade edulcorante, mas a causa de cores indesejáveis (VANDAMME e DERYCKE, 1983). Assim, o uso de inulinases microbianas tem sido proposto como a abordagem mais promissora para a obtenção de frutose e fruto-oligossacarídeos a partir de inulina.

De acordo com seus mecanismos catalíticos, estas enzimas podem ser incluídas entre as transferases (EC 2.4.1), com produção de anidrido difrutose, ou entre as hidrolases (EC 3.2.1), com hidrólise de polifrutosanas baseada em um processo de endo ou exo-degradação (VERACHTERT e DE MOT, 1990).

As inulinases microbianas são classificadas de acordo com seu modo de ação. As exo-inulinases (2,1 β -D-frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.80) são específicas para a hidrólise de inulina e quebram as ligações entre as unidades de frutose que estão localizadas longe das extremidades da rede de polímero, para a produção de oligossacarídeos. As endo-inulinases (β -D-frutano-frutanohidrolase; EC 3.2.1.7) agem de forma randômica sobre o acoplamento interno na molécula de inulina, liberando inulotriose, inulo-tetraose e inulo-pentaose como produtos principais (ETTALIBI e BARATTI, 2001; OHTA *et al.*, 2002; JING *et al.*, 2003; CHI *et al.*, 2009).

II.2.1 Produção de Inulinase

As inulinases têm sido produzidas por diversos micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras, sendo esta última uma das mais relatadas, provavelmente devido ao fácil cultivo e elevados rendimentos da enzima. A Tabela II.1 apresenta um resumo dos principais micro-organismos produtores de inulinases, os principais substratos empregados e a produção máxima alcançada em cada trabalho.

Os micro-organismos do gênero *Kluyveromyces* têm despertado grande interesse na produção de inulinase por pertencerem ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e serem aceitos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), além de serem retratados como bons produtores de inulinase. Esta designação significa que há poucas restrições na aplicação deste micro-organismo e grande potencial no setor de biotecnologia (LANE e MORRISSEY, 2010). Nos trabalhos apresentados na Tabela II.1 as maiores produções foram alcançadas com estes micro-organismos.

Atualmente, as inulinases comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria-prima com um alto valor agregado. Os trabalhos apresentados na Tabela II.1 mostram um forte tendência da substituição da inulina e outros substratos sintéticos por resíduos agroindustriais, visando uma diminuição nos custos de produção da enzima. Dentro dos substratos industriais destacam-se os resíduos gerados pelas indústrias de processamento de cana de açúcar e milho, onde o Brasil é conhecido como um dos maiores produtores mundiais.

Tabela II.1: Substrato, forma de cultivo e micro-organismos que expressam a inulinase referente a trabalhos publicados.

Micro-organismos	Substratos	Formas de Cultivo	Atividade Enzimática	Referências
Bactérias				
<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	Inulina, frutose, glicose, sacarose, extrato de levedura, uréia, peptona CDA+ extrato em pó do alho + trigo,	FS	0,552 U.mL ⁻¹	GILL <i>et al.</i> (2003)
<i>Staphylococcus</i> sp.	banana, dália, chicória, cebola	FS	52,4 U.L ⁻¹	SHARMA <i>et al.</i> (2006)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Casca de cebola e casca de alho	FES	117,0 U.g ⁻¹	AYYACHAMY <i>et al.</i> (2007)
<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> KM 24	3% sacarose e 2,5% triptona	FS	21,865 U L ⁻¹ h ⁻¹	NAIDOO <i>et al.</i> (2009)
Fungos				
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	Inulina 2%; extrato de levedura 2%; (NH ₄)H ₂ PO ₄ , 0,5%	FS	25 U mL ⁻¹	JING <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus niger</i> NK-126	Extrato vegetal da raiz (<i>Taraxacum officinale</i>) + ext. levedura	FS	55 U mL ⁻¹	KANGO (2008)
Leveduras				
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	AMM e melão de cana de açúcar	FES	250 U gds ⁻¹	MAZUTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>Kluyveromyces</i> sp. S120	Farelo de trigo	FES	409,8 U gds ⁻¹	XIONG <i>et al.</i> (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	Inulina, extrato de carne, CaCl ₂ e dodecil sulfato de sódio (SDS).	FS	55,4 U mL ⁻¹	SINGH <i>et al.</i> (2007)
<i>Pichia guilliermondii</i>	Água marinha + extrato de levedura +inulina	FS	60 U mL ⁻¹	GONG <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	YPD + água marinha + inulina bruta	FS	85 U mL ⁻¹	SHENG <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	Farelo de trigo e casca de arroz	FES	420,9 U gds ⁻¹	SHENG <i>et al.</i> (2009)

Tabela II.1: Continuação.

Micro-organismos	Substratos	Formas de Cultivo	Atividade Enzimática	Referências
Leveduras				
<i>Pichia guilliermondii</i>	Água marinha + inulina + extrato de levedura + NaCl	FS	127,7 U L ⁻¹	YU <i>et al.</i> (2009)
<i>Pichia guilliermondii</i> M-30	Farelo de trigo e casca de arroz	FES	455,9 U gds ⁻¹	GUO <i>et al.</i> (2009)
<i>Pichia pastoris</i>	Obtida da cultura sobrenadante de <i>P. pastoris</i> X-33	FS	58,7 ± 0,12 U mL ⁻¹	ZHANG <i>et al.</i> (2009a)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	AMM e melaço de cana de açúcar	FS	1317 ± 65 U mL ⁻¹	TREICHEL <i>et al.</i> (2009a)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	AMM e melaço de cana de açúcar	FES	463 U gds ⁻¹	MAZUTTI <i>et al.</i> (2010a)

Dentre os micro-organismos estudados, as leveduras têm sido amplamente utilizadas na produção de inulinases. As inulinases de leveduras mais estudadas são aquelas produzidas pelo gênero *Kluyveromyces*, sendo descritos como os micro-organismos mais promissores na produção desta enzima. As leveduras deste gênero podem crescer rapidamente atingindo alta concentração celular em um curto período de tempo, produzindo grandes quantidades da enzima inulinase (HENSING *et al.*, 1994). Muitos trabalhos foram realizados com leveduras, podendo-se citar a utilização de *Pichia* sp., *Cryptococcus* sp. e principalmente de *Kluyveromyces* sp.

Silva-Santisteban e Maugeri (2005) usaram planejamento fatorial e análise de superfície de resposta e otimizaram a produção de inulinase com sacarose como fonte de carbono e obtiveram como melhor produção uma atividade de 176 U.mL⁻¹.

Mazutti *et al.* (2007) avaliaram os efeitos dos parâmetros de processo sobre a produção de inulinase pelo micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 usando bagaço de cana como substrato. Foram investigados os efeitos de tamanho de partícula, densidade de inóculo, concentração de água de maceração de milho (AMM) e concentração de farelo de soja. Todos os experimentos foram realizados a 36°C e 65% de umidade. A máxima atividade obtida foi de 250 U.gds⁻¹ em meio contendo 20% de AMM e 5% de farelo de soja. O uso de farelo de soja reduziu o tempo máximo de fermentação de

96 para 24 horas, o que permitiu um aumento de 2 vezes na produtividade do processo quando comparado com o trabalho anterior (MAZUTTI *et al.*, 2006), mesmo com a atividade atingindo valores menores (MAZUTTI *et al.*, 2007).

Sheng *et al.* (2009) otimizaram a produção de inulinase por FES usando a levedura *Cryptococcus aureus*, a qual foi isolada de uma alga. Após o processo de otimização, onde foi empregada a metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de respostas, foi possível a obtenção de uma atividade enzimática de 420,9 U.gds⁻¹ após 120 horas de fermentação.

Treichel *et al.* (2009a) estudaram a otimização da produção de inulinase através *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 usando um meio de cultura industrial pré-tratado em um biorreator de batelada e empregaram uma estratégia seqüencial de planejamento fatorial. A condição otimizada para a produção de inulinase foi: 250 g.L⁻¹ de melaço de cana, 80 g.L⁻¹ de AMM, 6 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 300 rpm de agitação e 1.5 vvm de vazão volumétrica de ar, na qual resultou uma atividade enzimática de 1,317 ± 65 U.mL⁻¹.

Mazutti *et al.* (2010a) estudaram o crescimento celular e a produção de inulinase por FES com a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em biorreator de leito fixo. Para isto, foram realizados sete ensaios experimentais para verificar a influência da temperatura e a vazão volumétrica de entrada de ar na dinâmica do processo. Os resultados mostraram que as variáveis afetaram o desempenho do processo significativamente. A melhor condição para produção da enzima foi em temperatura e vazão volumétrica de ar de entrada de 30°C e 3 bm³.h⁻¹, respectivamente, alcançando uma atividade de 463 U.gds⁻¹. Os resultados obtidos pelos autores mostram que o biorreator de leito fixo é tecnicamente viável para a produção de inulinase.

Tem sido verificada também a obtenção de cepas mutantes, com o intuito de melhorar a produção da enzima. Guo *et al.* (2009) produziram uma linhagem mutante a partir de *Pichia guilliermondii*, através de luz UV e LiCl₂. A cepa mutante *P. guilliermondii* M-30 apresentou atividade 1,5 vezes maior (455,9 U.gds⁻¹) em relação à linhagem selvagem.

Também foram relatadas linhagens de fungos produtores de inulinase. Kango (2008) observou a atividade da inulinase a partir de *Aspergillus niger* NK-126, com crescimento celular em diferentes substratos, tendo obtido uma produção máxima de 55 U.mL⁻¹ com o extrato vegetal obtido da raiz de *Taraxacum officinale*. Jing *et al.* (2003)

estudaram a produção de exo e endoinulinase por *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, e relataram produção de 25 U.mL⁻¹.

A produção de inulinase por bactérias não são comparáveis à grande disponibilidade de leveduras e fungos produtores desta enzima. Porém, foram realizados vários estudos para a produção de inulinase envolvendo gêneros de bactérias, como *Staphylococcus* sp. (SHARMA *et al.*, 2006) e *Xanthomonas campestris* (AYYACHAMY *et al.*, 2007; NAIDOO *et al.*, 2009).

II.2.2 Aplicações das inulinasas e produtos derivados

A aplicação industrial de enzimas é determinada pela sua especificidade, atividade, estabilidade de armazenamento e uso, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é determinada pela sua concentração e a do seu substrato, concentração de cofatores, efeitos alostéricos, a presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação. A maneira como cada um destes parâmetros afeta a atividade enzimática é objeto de estudo da cinética enzimática.

Assim sendo, a maior aplicação de inulinasas está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose. A indústria utiliza-se de grande quantidade de polissacarídeos naturais e novas fontes têm sido procuradas com o intuito de suprir a demanda. A utilização das inulinasas apresenta-se como uma alternativa para sua obtenção (CONTIERO, 2004).

O processo mais utilizado para obtenção de xaropes de frutose envolve a hidrólise ácida do amido de milho, incluindo a ação de enzimas como α -amilases e amiloglicosidasas para melhorar o rendimento desta reação. Em seguida, ocorre a isomerização, através da ação de glicose-isomerases, obtendo-se uma mistura equimolar de frutose e glicose. Após a obtenção do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido), a separação da frutose é realizada em colunas cromatográficas, produzindo-se xaropes com 42 até 90% de frutose, denominados como “*high fructose corn syrup*” (HFCS) (VICENTE, 2000).

Outro processo para a produção de xaropes com alto teor de frutose foi desenvolvido, utilizando a inulina como matéria-prima. A conversão deste polímero ocorre a partir de uma única etapa, empregando-se a enzima inulinase, apresentando um rendimento superior a 95% na produção de frutose. A hidrólise realizada pela inulinase

tornou-se uma boa alternativa, considerando-se a qualidade do produto obtido, pois o processo de hidrólise ácida provoca propriedades indesejáveis no xarope obtido, como sabores e odores residuais, coloração escura, devido à caramelização de açúcares, e reação de Maillard com proteínas. A utilização de minerais ácidos e subsequentes neutralizações dos mesmos interfere nas etapas posteriores de purificação do produto final (VERACHTERT e DE MOT, 1990).

O xarope de frutose tem efeitos benéficos em pacientes diabéticos, aumenta a absorção de ferro em crianças, tem elevada capacidade adoçante para que possa ser usado na dieta de pessoas obesas, estimula a absorção de cálcio em mulheres pós-menopáusicas, estimula o crescimento de bifidobactérias no intestino grosso e delgado e evita câncer do cólon (ROCHA *et al.*, 2006). A frutose também é amplamente usada em muitos alimentos, medicamentos e bebidas, em substituição à sacarose (GILL *et al.*, 2006b; CHEN *et al.*, 2009).

De acordo com Sangeethaa, Ramesha e Prapullaa (2005), as inulinases também são aplicadas na produção de FOS pois apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, não podem ser considerados carboidratos ou açúcares nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos.

A inulina e a oligofrutose são ingredientes que oferecem uma série de importantes benefícios nutricionais, bem como contribuem para propriedades funcionais que aumentam a vida útil e perfil de sabor de vários produtos alimentares, como barras de cereais, sorvetes, geléias *light*, balas e chocolates. Também substituem carboidratos e geram produtos de teor reduzido de açúcar e de baixo valor energético (SANGEETHAA, RAMESHA e PRAPULLAA, 2005).

Para países produtores de cana-de-açúcar, como o Brasil, surge como nova possibilidade, o emprego de sacarose como matéria-prima na produção de xaropes de frutose. A obtenção de açúcar invertido (glicose e frutose) a partir da sacarose pode ser efetuada através da inversão química por ácidos ou pela inversão biológica, utilizando inulinases ou invertases. Industrialmente, a inversão química torna-se um processo mais simples, porém conversões biológicas a partir da ação enzimática resultam em produtos de maior qualidade (VANDAMME e DERYCKE, 1983).

II.3 Aspectos importantes relacionados à fermentação em estado sólido

Historicamente, é creditado à fermentação em estado sólido (FES) o início do uso de fermentação para a produção de metabólitos. No entanto, em meados de 1940 ocorreu uma redução drástica dos estudos envolvendo FES, principalmente devido ao desenvolvimento de processos de produção de penicilina por fermentação submersa (FS), em meio à Segunda Guerra Mundial.

O processo de FES é definido como a fermentação envolvendo sólidos na ausência (ou quase ausência) de água livre. Contudo, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e metabolismo do micro-organismo (PANDEY, 2003).

Para Raghavarao *et al.* (2003), o conteúdo de água necessário para o crescimento encontra-se absorvido na matriz porosa do substrato, o que favorece a transferência de oxigênio no meio, pois o micro-organismo permanece em contato direto com uma corrente de ar. O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do mesmo, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (RAJARDJO *et al.*, 2005; MITCHELL *et al.*, 2006a).

Geralmente, partículas menores de substrato provêm uma área maior de superfície para o ataque microbiano, porém se a granulometria for muito pequena pode ocorrer aglomeração do substrato resultando em baixo crescimento microbiano. Em contraste, partículas maiores provêm melhor aeração, mas apresentam uma superfície limitada para o ataque microbiano. Deve-se então selecionar o tamanho da partícula para cada processo em particular (PANDEY *et al.*, 1999a).

Existem vários fatores no processo de FES que produzem impactos sobre o sucesso desta tecnologia. Por exemplo, a seleção de micro-organismos e substratos, otimização dos parâmetros de processo e também a purificação do produto final tem sido um desafio para esta tecnologia. Outros aspectos importantes em FES são a seleção das variáveis do processo que possuem efeito sobre o mesmo, bem como a sua otimização. Nisso incluem-se os parâmetros físico-químicos e bioquímicos, tais como tamanho de partícula, umidade inicial, pH, pré-tratamento dos substratos, umidade relativa, temperatura de incubação, agitação, aeração, idade e quantidade de inóculo, suplementação de nutrientes, extração do produto e purificação do mesmo, entre outros (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

II.3.1 Biorreatores para FES

O sucesso da aplicação em escala industrial de um processo baseado em FES depende, obrigatoriamente, do bom desenvolvimento deste em escala de laboratório e, principalmente, da escolha certa da configuração do biorreator (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006b).

Os reatores comumente usados podem ser distinguidos pelo tipo de aeração ou agitação ou ainda por um sistema misto empregado. Existem quatro tipos de biorreatores para a operação no processo de FES e cada um em seu próprio projeto tenta criar condições favoráveis para o processo (COUTO e SANROMÁN, 2006):

- *Biorreator de bandejas*: o leito permanece estático durante o processo com temperatura constante e o ar umidificado circula em torno do leito. Apesar de apresentar configuração mais simples, a principal desvantagem deste processo é o de requerer uma grande área dentro da indústria para o desenvolvimento do processo, tornando-o pouco atraente para a produção em grande escala.

- *Biorreator de leito fixo*: geralmente composto de uma camisa cilíndrica com o substrato sólido mantido em uma base perfurada, o leito permanece estático durante o processo e ocorre injeção forçada de ar através do leito. De acordo com Durand (2003) estes tipos de biorreatores são muito simples e de fácil utilização, tornando-os bons sistemas para o aumento de escala do processo, pois permitem avaliar os principais efeitos de transferência e influência de parâmetros de processo sobre o comportamento dinâmico do sistema.

- *Biorreator de tambor rotativo*: o leito é continua ou intermitentemente agitado durante o processo e o ar é circulado em torno do leito. A agitação branda associada com o movimento rotacional do tambor contendo o substrato minimiza os efeitos de rompimento celular devido ao atrito, tornando-se assim a configuração ideal para os processos onde micro-organismos toleram agitação branda.

- *Biorreator de leito fluidizado*: a fim de evitar a adesão e agregação das partículas do substrato, o leito é continua ou intermitentemente agitado e ocorre injeção forçada de ar através do leito.

O biorreator seria como o coração do processo de fermentação, onde a matéria-prima, em condição adequada é convertida no produto desejado. A maximização da taxa de produto dentro do biorreator é a chave essencial para a otimização do processo. Algumas

das características desejadas de um sistema de biorreator em FES podem ser dadas como segue (RAGHAVARAO, RANGANATHAN e KARANTH, 2003):

- Contenção do substrato no leito – o material de construção de biorreatores para FES deve ser forte, resistente à corrosão e deve ser atóxico para o micro-organismo. Deve também ter custo acessível.
- Prevenção da entrada de contaminantes no processo, bem como a liberação descontrolada de organismos para o ambiente. O primeiro é praticamente difícil devido à necessidade de manuseio dos sólidos, que não podem ser bombeados como no caso da FS. O segundo é igualmente importante devido à maioria dos processos de FES envolverem esporos de fungos, que podem ser patogênicos e causar riscos à inocuidade do meio ambiente. Isto pode ser evitado através da incorporação de filtros de fluxo de saída de ar e filtragem do fluxo de entrada de ar, que, no entanto, aumentam o custo do equipamento.
- Efetiva regulação de aeração e remoção de calor para o controle dos parâmetros operacionais como temperatura, atividade de água e oxigênio gasoso. Muitas vezes, a FES sofre problemas de remoção de calor ou perda de água do substrato por evaporação, afetando o rendimento e a qualidade do produto desejado.
- Uniformidade do substrato dentro do leito - isto é conseguido através de uma mistura eficaz, que também é crucial para minimizar os gradientes térmicos, um fator que é particularmente importante para FES.
- O processo global de FES envolve a preparação do substrato, esterilização inicial do substrato e da biomassa após a recuperação do produto, a preparação do inóculo, carga e descarga do biorreator como também a recuperação do produto.

Assim, é altamente desejável um sistema de biorreator projetado para facilitar todas as operações descritas acima.

II.3.2 Vantagens, desvantagens e desafios no processo de FES

A maior atenção creditada à FES se deve ao fato de que o rendimento de bioprodutos como enzimas, compostos aromáticos, corantes e outros compostos de interesse em alimentos são muito maiores quando comparados com os rendimentos obtidos por fermentação submersa. A FES oferece numerosas vantagens por ser uma técnica mais simples e de baixo custo (possibilidade de utilização de inúmeros resíduos agroindustriais como substratos), apresenta menores problemas operacionais e alta produtividade,

apresenta melhor circulação do oxigênio e o meio assemelha-se ao hábitat natural de vários micro-organismos. Ainda, a estabilidade do produto é maior, tem-se baixa repressão catabólica, além do baixo requerimento de esterilização, devido à baixa atividade de água usada na FES (HÖLKER *et al.*, 2004; COUTO e SANROMÁN, 2006).

No entanto, a FES também apresenta desvantagens como a difícil homogeneização do meio, dificuldade em controlar parâmetros de processo como pH, calor (gerado pelo crescimento dos micro-organismos), umidade, condições de nutrientes, e poucos projetos eficientes disponíveis na literatura para biorreatores que operem em condições de estado sólido (COUTO e SANROMÁN, 2006). Viniegra-González *et al.* (2003) procuraram desenvolver uma abordagem geral para a comparação da produtividade de enzimas empregando FES e FS e tentaram explicar a razão da maior produção por FES. Segundo os autores, a alta biomassa, a alta produção de enzimas e a baixa degradação de proteínas, contribuem para a melhor produção por FES.

Os principais desafios que levam os pesquisadores a buscar soluções são *scale-up* do processo, purificação de produtos finais e estimação de biomassa. *Scale-up* em FES tem sido um fator limitante há muito tempo, porém recentemente com o avanço da engenharia bioquímica, biorreatores têm sido projetados e poderiam superar os problemas de *scale-up* desde que o monitoramento *on-line* de vários parâmetros relacionados à transferência de calor e massa fosse avaliado (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Existem ainda outros grandes desafios que precisam ser abordados para que a tecnologia de FES seja bem sucedida, como a remoção de calor devido à atividade metabólica dos micro-organismos, o que é desejável em compostagem, e muitas vezes fatal para os processos biotecnológicos, pois grande parte das enzimas produzidas durante a fermentação podem ser desnaturadas pelo calor no final do processo (SANTOS *et al.*, 2004) bem como a alta porcentagem de umidade que resulta em baixa porosidade do substrato que, por sua vez, impede a penetração de oxigênio, enquanto baixo teor de umidade pode levar à má acessibilidade de nutrientes, dificultando o crescimento microbiano (PANDEY, 2003).

Porém, a FES tem ganhado credibilidade nos últimos anos na indústria de biotecnologia devido às aplicações potenciais na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, como em alimentos, combustíveis, substâncias químicas industriais e produtos farmacêuticos e emergiu como uma alternativa atraente em relação à FS. A utilização de resíduos agro-industriais como substratos em processos de FES prevê uma

boa alternativa, considerando a possível a agregação de valor a estes subprodutos. A inovação é a chave para o sucesso e mudanças de demanda na indústria são necessárias para satisfazer suas necessidades por melhores produtos e serviços (SINGHANIA *et al.*, 2009). Ainda, para os mesmos autores, entender melhor os aspectos de engenharia bioquímica, particularmente em modelagem matemática e projetos de biorreatores (fermentadores), tornou possível o *scale-up* no processo de FES e assim desenvolver alguns projetos para a comercialização, fazendo com que esta tecnologia seja economicamente viável. No futuro, a tecnologia de FES poderá estar tão desenvolvida quanto a FS se racionalização e padronização continuarem nesta tendência atual.

II.3.3 Aplicação de FES e alguns exemplos na indústria de alimentos

A FES é um processo conhecido desde os tempos antigos onde diferentes espécies de fungos eram cultivadas por FES para a produção de alimentos. Exemplos típicos consistem na fermentação do arroz por *Aspergillus oryzae* para iniciar o processo koji e a fermentação por *Penicillium roquefortii* para a produção de queijo. Além disso, na China, a FES tem sido amplamente utilizada para produzir alimentos (como o vinho Chinês, molho de soja e vinagre) fabricados desde os tempos antigos. No Japão, a FES é utilizada comercialmente para a produção de enzimas industriais (CHEN, 1992). As principais aplicações do processo de fermentação em estado sólido na indústria de alimentos estão apresentadas na Tabela II.2.

Porém, recentemente a FES vai muito além da aplicação na indústria de alimentos. A fermentação em estado sólido se tornou uma alternativa muito atraente principalmente em aplicações específicas devido às recentes melhorias em reatores. Assim, tem sido usada em duas grandes áreas as quais incluem:

- (1) Aplicações para controle ambiental, incluindo a produção de adubo e ração animal a partir de resíduos sólidos, biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos industriais; e

- (2) Aplicações para agregação de valor, como o enriquecimento nutricional das culturas ou resíduos de culturas por biotransformação, produção de alimentos fermentados, enzimas, pigmentos, antibióticos, bioinseticidas, ácidos orgânicos e compostos de aroma (RAGHAVARAO, RANGANATHAN e KARANTH, 2003).

Tabela II.2: Principais aplicações de FES na indústria de alimentos.

Aplicação	Referências
Produção de Flavours	MEDEIROS <i>et al.</i> (2001); LARROCHE <i>et al.</i> (1999)
Produção de Enzimas	
Alfa-amilases	FRANCIS <i>et al.</i> (2003); RAMACHANDRAN <i>et al.</i> (2004)
Lipases	MAHADIK <i>et al.</i> (2002); UL-HAQ <i>et al.</i> (2002); RIGO <i>et al.</i> (2010)
Inulinases	MAZUTTI <i>et al.</i> (2010a); GUO <i>et al.</i> (2009); MAZUTTI <i>et al.</i> (2009); SHENG <i>et al.</i> (2009)
Pectinases	DEBING <i>et al.</i> (2006); AHLAWAT <i>et al.</i> (2009)
Produtos de ácidos orgânicos	
Ácido láctico	NAVEENA <i>et al.</i> (2005)
Ácido cítrico	PRADO <i>et al.</i> (2004)
Produção de Goma Xantana	STREDANSKY e CONTI (1999)

Desde 1986, no Brasil, uma série de pesquisas vem sendo desenvolvidas a fim de agregar valor aos produtos e subprodutos da agricultura tropical, principalmente pelo aumento da geração de resíduos agroindustriais na região. A utilização de resíduos da agroindústria brasileira, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para a FES, também ajudam no controle ambiental (PANDEY *et al.*, 1999b).

No Brasil os principais e mais abundantes resíduos que podem ser utilizados são as tortas derivadas dos processos de extração do óleo de milho (torta de milho), óleo de girassol (torta de girassol) e soja (torta de soja). Outros substratos que podem ser utilizados em FES são a torta de babaçu; farelo de trigo; o bagaço de mandioca, gerado pela indústria de processamento de amido, que possui entre 40 a 60% de amido residual; o bagaço de cana; e o pó de serra (gerado pela indústria madeireira). Estes representam somente uma pequena proporção dos substratos que podem ser utilizados na produção de metabólitos com aplicação industrial (GOMBERT *et al.*, 1999; CASTILHO *et al.*, 2000; MAHADIK *et al.*, 2002; UL-HAQ *et al.*, 2002; CAMMAROTA e FREIRE, 2006).

II.4 Fermentação em batelada alimentada

A indústria de biotecnologia vem desenvolvendo-se rapidamente, como na ciência farmacêutica, fermentativa, na agricultura e nos processos de substâncias químicas. Durante as últimas décadas, a otimização de processos, é fundamental no aumento de escala industrial e na produção biotecnológica, para que se possam manter as condições operacionais ótimas, aumentando assim o rendimento e assegurando a qualidade do produto (SCHMIDT, 2005).

Bioprocessos por fermentação em batelada alimentada (FBA) são utilizados para a produção de ampla gama de produtos na indústria de fermentação. A técnica foi introduzida com a indústria de fermentação, especificamente na fermentação de pães logo após a Segunda guerra. O fermento de pão é o produto mais proeminente na técnica de FBA e é usado para reduzir a repressão catabólica do açúcar por adição incremental como fonte de carbono (KARAKUZU, MUSTAFA e SITKI, 2006).

Durante o processo de FBA, um ou mais nutrientes são fornecidos para o fermentador, enquanto as células e os produtos permanecem no fermentador até o final da operação. A FBA é um método de fermentações fechadas, em que o meio é adicionado em bateladas ou de forma contínua. A adição por bateladas ocorre manualmente em tempo pré-determinado e na alimentação contínua o substrato limitante é adicionado ao reator à taxa constante, sendo este, responsável pela taxa de crescimento do micro-organismo (RUY e PAULO, 2001).

A alimentação contínua pode ser dividida em dois grupos: métodos que utilizam uma alimentação pré-determinada, e aqueles que possuem um controle por “feedback” (YEE e BLANCH, 1992). Segundo Allen e Luli (1998), alimentação pré-determinada pode ocorrer a uma taxa constante (também conhecida como alimentação por gradiente) ou através de uma taxa exponencial de alimentação. Essas taxas são definidas pelo operador no início da fermentação. Com taxa constante de alimentação, a biomassa irá aumentar linearmente com o tempo, a uma taxa especificada pela taxa de alimentação. No caso da alimentação exponencial a biomassa irá aumentar na mesma velocidade determinada pela taxa exponencial de alimentação, a menos que a mesma seja maior que a velocidade específica de crescimento máxima do micro-organismo, o que irá provocar um acúmulo de substrato no reator (YEE e BLANCH, 1992).

O tipo de alimentação tem influência na obtenção de proteínas recombinantes, bem como no acúmulo de biomassa (JUNG *et al.*, 1988). Um problema inerente a esse tipo de alimentação pré-determinada, é que não se tem controle da concentração de nutrientes dentro do reator, o que pode acarretar um acúmulo de nutrientes, principalmente se o micro-organismo não cresce à taxa especificada pelo operador. Para reduzir os problemas de alimentação pré-determinada, pode-se fazer a adição de um determinado componente ao meio de cultivo utilizando-se um controle que verifique as necessidades do micro-organismo durante o crescimento.

A FBA geralmente conduz a resultados superiores ao processo de fermentação em batelada, especialmente benéfica devido às alterações das concentrações de nutrientes afetando a produtividade e o rendimento do produto desejado (YAMANE e SHIMIZU, 1984; CARVALHO e SATO, 2001).

O processo de produção, assim como o de outros metabólitos secundários, é caracterizado pela relativa dissociação entre as fases subseqüentes de crescimento celular (trofofase) e de produção (idiofase). Desta forma, a batelada alimentada é uma operação alternativa à batelada que possibilita, através da suplementação adequada de nutrientes, prolongar a idiofase e contornar efeitos de repressão e/ou inibição causados por altas concentrações do substrato limitante e controlar as velocidades de crescimento celular e de consumo de oxigênio, intimamente relacionadas no caso de micro-organismos aeróbicos (YAMANE e SHIMIZU, 1984).

Existem diversas maneiras de se obter informações de parâmetros de processo (oxigênio dissolvido, coeficiente respiratório, concentração de substrato, concentração de produtos metabólicos no meio, calor metabólico e evolução de CO₂) para controle da adição de nutrientes no reator. O método mais simples é quando se tem alimentação ligada diretamente a um sensor (MENDES, 2006).

Ao longo dos últimos 20 anos muitas técnicas foram desenvolvidas para estimativa de reatores em batelada alimentada. De acordo com Shimizu *et al.* (1993) o controle do desenvolvimento do sistema para a FBA não é simples devido à: (i) a falta de modelos precisos para descrever o crescimento celular e formação do produto, (ii) a natureza não-linear do bioprocessamento, (iii) a lenta resposta do processo, e (iv) uma carência de sensores para a quantificação de variáveis de estado.

O principal objetivo da pesquisa em fermentação é o custo-eficácia de bioprodutos, assim, é importante desenvolver um método de cultivo que permita a produção do produto

desejado com uma alta concentração e rendimento. A FBA tem sido amplamente utilizada para a produção de bioprodutos, incluindo vários biopolímeros primários e metabólitos secundários, proteínas e outros (RUY e PAULO, 2001).

A literatura é relativamente escassa em relação à produção de inulinase por FBA, principalmente em se tratando de FBA por FES. A carência de trabalhos é influenciada principalmente pela dificuldade de se estimar os parâmetros cinéticos, uma vez que o micro-organismo utiliza várias alimentações durante a fermentação (MENDES, 2006).

No entanto, o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* CB6556 foi estudado por Hensing *et al.* (1994) com o intuito de modelar a produção de inulinase em alta densidade celular no processo batelada alimentada. Em razão disso, estudos que empregam condições de crescimento em meios com limitadas concentrações de carbono para produção da enzima são necessários para investigar a possibilidade de obtenção de uma maior produtividade enzimática a partir do processo em batelada alimentada.

Hensing *et al.* (1995) desenvolveram um modelo baseado na equação de Monod, descrevendo a relação entre a taxa de crescimento específico e taxa de produção de inulinase num biorreator batelada alimentada com alta densidade celular. O modelo descreveu adequadamente a produção de biomassa no biorreator batelada alimentada. Porém, a produção de enzima foi maior que a predita pelo modelo. Os autores não apresentaram a dinâmica do consumo de substrato do meio, onde a sacarose foi considerada como sendo a única fonte de carbono.

Mendes *et al.* (2005) estudaram a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 a partir de meios industriais compostos por melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho realizada em reatores operando em batelada alimentada. Após o estudo de estratégias de alimentação do reator de bancada pela taxa exponencial pré-determinada e por “feedback” de pH, verificaram que o processo fermentativo com alimentação para controle de pH 4,5 alcançou atividade enzimática máxima igual a 562 U.mL^{-1} , utilizando-se subprodutos industriais de baixo custo. Além disso, os autores notaram que a taxa de produção da inulinase foi maior quando as condições do meio apresentavam concentração de açúcares redutores inferior a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ e em altos níveis de oxigênio dissolvido.

II.5 Avaliação dos parâmetros cinéticos e influência do pH e temperatura na reação e estabilidade enzimática

As enzimas, como qualquer outra proteína, sofrem desnaturação térmica, perdendo sua atividade parcial ou totalmente. Desta forma, é de grande importância o conhecimento da estabilidade térmica no projeto de reatores catalíticos (SANTOS, 2002).

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

Existem dois grandes problemas associados à aplicação industrial de inulinas para produção de frutose: (i) a inulina tem uma solubilidade limitada à temperatura de armazenamento, e (ii) há uma grande chance de contaminação microbiana na temperatura de armazenamento. Porém, o processo industrial para produção de frutose e fruto-oligossacarídeos é realizado em torno de 60 °C. A maioria das inulinas perde a atividade depois de poucas horas a esta temperatura e conseqüentemente é preciso o reabastecimento da enzima, aumentando assim o custo de produção. No entanto, há um crescente interesse na produção e caracterização de inulinas termoestáveis (GILL *et al.*, 2006a).

Deste modo, o conhecimento de temperatura e influência de pH na atividade de enzima é mesmo importante para determinação de taxas de reação ótimas. Temperatura alta e pH baixo podem diminuir o risco de contaminação, melhorando a solubilidade de alguns substratos, e podem também reduzir a formação de cor em alguns xaropes (VANDAMME e DERYCKE, 1983). Por determinar melhor as condições operacionais e a dimensão de reatores é necessário saber, pelo menos, o tempo de redução decimal (valor D) e a taxa constante de desativação, k (JING *et al.*, 2003).

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

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

onde $K(T)$ é a constante cinética a temperatura T , E_a é a energia de ativação, R é a constante dos gases ideais ($R = 1,9872 \text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{K})$), K_0 é a constante de proporcionalidade e T é a temperatura absoluta (K).

Verifica-se experimentalmente, que a atividade enzimática não aumenta indefinidamente com a temperatura, como prevista pela equação de Arrhenius. A partir de uma determinada temperatura (denominada temperatura ótima), verifica-se um decréscimo na atividade com o aumento de temperatura (CABRAL, 1989). A expressão de Arrhenius se ajusta aos dados experimentais numa ampla faixa de temperatura, sendo sugerida, como uma primeira aproximação para a dependência real da temperatura (SANTOS, 2002).

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

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

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

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

Como visto, a caracterização da enzima é essencial tanto para o estabelecimento das condições de trabalho e aplicações como para a determinação da temperatura e pH ótimos e de estabilidade.

Zhang *et al.* (2004) estudaram a purificação e as propriedades enzimáticas de uma inulinase recombinante. O gene *inuA1* que codifica uma exoinulinase obtida a partir de *Aspergillus niger* AF10 foi expresso em *Pichia pastoris*. A atividade enzimática foi de 316 U.mL⁻¹ em um fermentador de 5 L, e apresentou 35% de proteína de inulinase do total de proteína da fermentação. A taxa de hidrólise de inulina foi de 92%, com a adição de 25 U.g⁻¹ de enzima, e 90% de conteúdo de frutose depois de 6 h. A glicose pode inibir significativamente a hidrólise enzimática da inulina, sendo este o primeiro trabalho que apresenta a inibição da glicose pela hidrólise catalisada por uma inulinase.

Chen *et al.* (2009) estudaram a purificação e a caracterização de três exoinulinases (Exo-I, Exo-II, e Exo-III) e duas endoinulinases (Endo-I e Endo-II) obtidas a partir de *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. Foram determinados os pesos moleculares e os valores de K_m para cada enzima. As cinco inulinases apresentaram-se estáveis abaixo de 50°C com atividade ótima a 45°C, e mantiveram a estabilidade a uma gama de pH 4-8 com um pH ótimo a 4,5 para exoinulinase e 5,0 para endoinulinase. A atividade de inulinase foi completamente inibida por Ag⁺, Fe²⁺ e Al³⁺, porém para K⁺, Ca²⁺, Li²⁺, EDTA e uréia não tiveram influência significativa na atividade de inulinase.

Mazutti *et al.* (2009) realizaram um estudo comparativo da caracterização parcial do extrato enzimático bruto entre duas diferentes inulinases obtidas por FES e FS usando resíduo agroindustrial como substrato. O extrato bruto enzimático obtido por FS apresentou pH ótimo e temperatura para atividade hidrolítica de 4,5 e 55°C, respectivamente; e o extrato obtido por FES apresentou pH ótimo e temperatura de 5,0 e 55°C, respectivamente. Ambas enzimas apresentaram termoestabilidade alta, com um valor *D* de 230,4 h e 123,1 h para FS e FES, respectivamente. A produção de inulinase por FS apresentou alta estabilidade a pH 4,4, enquanto que a inulinase obtida por FES foi mais estável a pH 4,8. Os resultados mostraram que a inulinase obtida por FS é menos susceptível ao efeito do pH e a inulinase obtida por FES é mais resistente a altas temperaturas.

II.6 Considerações finais

Com base no apresentado no decorrer deste capítulo, alguns aspectos são evidenciados. Existe um grande interesse na obtenção da enzima inulinase devido a sua

potencial aplicação industrial. A busca pela redução dos custos de produção de inulinase faz com que aumente as investigações sobre substratos e principalmente formas de fermentações para que a obtenção da enzima se torne viável economicamente.

Atualmente, os processos de fermentação em estado sólido vêm ganhando espaço e a atenção de pesquisadores por apresentar vantagens econômicas perante a fermentação submersa, porém é necessário estudos mais aprofundados no que se refere comportamento do processo em aumento de escala e emprego de biorreatores. O aumento de escala, por sua vez, requer o desenvolvimento de modelos matemáticos confiáveis que possam ser utilizados como ferramentas de projeto, otimização e controle do processo. A escolha certa da configuração do biorreator, obrigatoriamente, determinará o bom desenvolvimento deste tanto na escala laboratorial como na industrial.

A fermentação por batelada alimentada é uma operação alternativa à batelada e busca desenvolver um método de cultivo que permita a produção do produto desejado com uma alta concentração e rendimento.

Portanto, é de grande valia a busca de estratégias para o aumento de escala de processos envolvendo FES e conseqüentemente a caracterização desta enzima possibilitando maior conhecimento referente às suas propriedades.

III.1 Micro-organismo, pré-inóculo e substratos

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase por FES e é pertencente ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAZUTTI *et al.*, 2007). O micro-organismo foi mantido a 4°C em caldo YM contendo: 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de ágar. O meio para o pré-inóculo contém: 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ sacarose, 5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 1,5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 1,15 g.L⁻¹ de KCl e 0,65 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Cada tubo de caldo YM foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, o qual foi incubado a 30 °C, 150 rpm por 24 horas.

O meio sólido usado como substrato para a produção de inulinase era composto por bagaço de cana suplementado com 15% (p/p) de melação de cana pré-tratado, 30% (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20% (p/p) de farelo de soja (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007). O bagaço de cana, adquirido na COTREL Ltd. (Erechim, RS) foi seco sob temperatura ambiente e triturado mecanicamente, de maneira a uniformizar o tamanho de partículas. A AMM foi adquirida na Corn Products Internacional – Mogi Guaçu (SP); o melação de cana foi adquirido na Refinaria Éster – Campinas (SP); o farelo de soja foi adquirido na empresa Olfar – Erechim (RS). A umidade inicial dos substratos foi corrigida para 65% conforme determinada em trabalho anterior (MAZUTTI *et al.*, 2006).

O melação de cana foi pré-tratado preparando-se uma solução 200 g.L⁻¹ em ácido sulfúrico pH 5,0. Esta solução permaneceu em repouso por 24 horas. Após esse período, o pH final foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico.

III.2 Testes preliminares para produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA)

As fermentações foram conduzidas em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica. Os béqueres para a FBS continham 10 g de bagaço de cana seco, suplementados com 3 g de AMM, 1,5 g de melação de cana e 2 g de farelo de soja. Para a realização das suplementações, a AMM e o melação de cana foram diluídos na quantidade de água a ser adicionada para corrigir a umidade e adicionados ao bagaço com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Para a FBA, os béqueres foram alimentados com 25; 33,3; 50 e 100% (p/p) do total de substrato e os tempos de adições foram fixados em 6, 12 e 18 horas após o início da fermentação, dependendo da estratégia de alimentação.

Todos os béqueres com o meio foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Cada béquer foi inoculado com 6 mL de suspensão de células e incubado por 36 horas em estufa com controle de umidade (injeção de ar umidificado: 65%) a uma temperatura de 36°C.

Para a avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FBS e FBA conduzidas em béqueres de polipropileno foram realizadas fermentações destrutivas, ou seja, cada intervalo de tempo avaliado corresponde a uma nova fermentação.

III.3 Produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo

III.3.1 Fermentação batelada simples (FBS), fermentação batelada alimentada (FBA) e diferentes estratégias de aeração

As fermentações foram realizadas em biorreator de leito fixo com capacidade útil de 3kg de bagaço de cana seco. O biorreator consiste de um cilindro inoxidável de 34 cm de diâmetro e 50 cm de altura. A Figura III.1 apresenta um diagrama esquemático do biorreator de leito fixo.

O biorreator foi conectado a duas estratégias de aeração: umidificador de ar e/ou a um secador de ar.

1) O umidificador de ar: o qual fornece ar com umidade relativa entre 95-100%, consiste de um cilindro de PVC disposto horizontalmente antes da entrada do ar no biorreator. O ar seco fornecido por um compressor de ar foi bombeado diretamente dentro do umidificador usando um difusor, onde o ar permanecia em contato com a água por um tempo suficiente para que fosse obtido ar saturado a uma temperatura de 30°C.

2) O secador de ar: consistia de uma resistência disposta antes da entrada de ar no biorreator. O ar seco, também fornecido por um compressor de ar, foi bombeado para dentro da resistência em diferentes temperaturas (30; 35; 40; 45°C).

Independente do tipo de ar injetado para dentro do biorreator, o mesmo percorria todo o leito, até sua saída no topo.

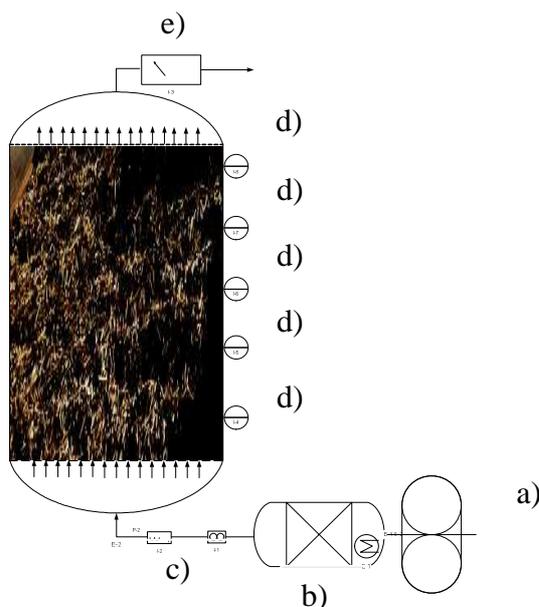


Figura III.1: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo: a) compressor; b) umidificador; c) controle de vazão, temperatura e umidade; d) sensores de temperatura; e) medidor de CO₂, temperatura e umidade.

O biorreator foi carregado com 2 kg de bagaço de cana seco devidamente suplementado. A umidade dos substratos foi corrigida para 65% (Base seca - p/p) e autoclavado a 121°C por 15 minutos. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo correspondente a 14 g de massa inicial de células (MAZUTTI *et al.*, 2010a). Todos os experimentos foram conduzidos por 24 h sendo que nas FBA o biorreator foi alimentado após 6 h do início da fermentação com 50% (p/p) da carga/volume total do substrato.

III.3.2 Determinação da temperatura

As temperaturas de entrada (0 cm) e saída do biorreator (40 cm), bem como as temperaturas ao longo da altura do biorreator (10, 20, e 30 cm), foram constantemente monitoradas através de um sensor de temperatura PT100 (NOVUS, Brasil).

III.3.3 Determinação da produção de CO₂

Também foi avaliado o metabolismo respiratório do micro-organismo, determinando a produção de CO₂, de modo que o ar de saída do biorreator foi analisado por um sensor de CO₂ gasoso baseado na refração das ondas de infravermelho

(CARBOCAP GMT220, VAISALA, Inc., Finlândia) com sinal de saída linearmente convertido para 4-20 mA. O sensor foi conectado a placa de aquisição de dados (FIELDLOGGER NOVUS, Brasil), com um intervalo de 1 minuto entre cada aquisição.

III.3.4 Determinação da umidade

A umidade foi determinada pelo método da AOAC 934.01, o qual se baseia na secagem em estufa a 105°C até a amostra atingir peso constante. Para as fermentações em biorreator leito fixo, a umidade foi avaliada após 24 horas de fermentação em quatro diferentes alturas do biorreator, com coleta de amostras a 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm e 30-40 cm.

III.4 Caracterização da inulinase

O estudo do extrato enzimático bruto foi realizado em termos de temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo, e estabilidade de pH. O extrato enzimático usado para os ensaios foi obtido da condição experimental ótima (FBA - 637,48 U.gds⁻¹). A atividade da inulinase foi determinada como descrito no item III.5.1.

III.4.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática realizou-se um delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), totalizando 11 experimentos, (2² ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes). O tempo total de reação foi de 10 minutos e as faixas de pH e temperatura estudadas são apresentadas na Tabela III.1. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc., e através da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos destas variáveis para máxima atividade enzimática.

Tabela III.1: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², para otimização da atividade.

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

III.4.2 Efeito da estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da inulinase foi testada incubando a enzima em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 nas temperaturas 40; 50; 60 e 70°C. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo, para as medidas de atividade. O estudo foi interrompido quando foi verificada a perda de mais de 50% da sua atividade enzimática inicial. A partir dos valores obtidos pode-se calcular as constantes de desativação térmica, a meia-vida e a energia de desnaturação térmica para as diferentes temperaturas.

Construindo-se um gráfico de $\ln (A/A_0)$ em função do tempo (horas), sendo A_0 a atividade inicial e A , a atividade referente aos tempos de retirada de amostra, obtém-se o valor de K_d (constante de desativação da enzima), para cada temperatura. Posteriormente, para a determinação da energia de ativação da enzima E_d (energia de ativação para reação de desativação), grafica-se $\ln K_d \times 1/T$ (K), obtendo-se uma reta correspondente à equação de Arrhenius (Equação III.1):

$$\ln K_d = \ln K - \frac{E_d}{RT} \quad (\text{III.1})$$

sendo que:

K_d = constante de desativação da enzima

K = constante de proporcionalidade

E_d = energia de desativação enzimática

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

T = temperatura absoluta (K)

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

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

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

III.4.3 Efeito do pH na estabilidade da enzima

A estabilidade da inulinase foi testada incubando a enzima em tampão acetato de sódio 0.1 M nas faixas de pH 3.5; 4.0; 4.5; 5.0 e 5.5 a uma temperatura de 50°C. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo medindo-se a atividade pelo método DNS, como descrito no Item III.5.2.

III.4.4 Efeito da estabilidade da enzima bruta a baixas temperaturas

O efeito da estabilidade da inulinase a baixa temperatura foi realizado usando tampão acetato de sódio 0.1 M em pH 4.8, a 50°C. As amostras foram armazenadas (amostras de 2 mL) nas temperaturas: -80; -10 e 4°C e em determinados intervalos de tempo realizou-se as medidas de atividade a fim de acompanhar a estabilidade da enzima. A atividade residual de inulinase foi determinada como descrito no Item III.5.2.

III.4.5 Determinação de K_m e V_{max}

Ensaio enzimáticos com 0,5 mL de extrato enzimático bruto foram executados em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 a 50°C em diferentes concentrações de sacarose e inulina: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 g.L⁻¹, sendo que o tempo de reação foi de 10 e 30 minutos para sacarose e inulina respectivamente. A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk.

III.5 Métodos analíticos

III.5.1 Determinação da atividade enzimática para as fermentações

Após as fermentações em biorreator de leito fixo, atividade de inulinase foi determinada em quatro diferentes alturas do biorreator, com coleta de amostras a 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm e 30-40 cm.

A inulinase foi extraída do meio através da adição de 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, seguindo com a incubação à 50°C, 150 rpm por 30 minutos. A atividade enzimática foi determinada do sobrenadante, após a filtração dos sólidos, adicionando-se 0,5 mL da solução de extração adequadamente diluída em 4,5mL de uma

solução 2% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio (0,1 M pH 4,8) à 50°C (MAZUTTI *et al.*, 2006). A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para cada amostra foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por grama de sólidos seco (U.gds⁻¹).

III.5.2 Determinação da atividade enzimática para caracterização da enzima

Para a determinação da atividade de inulinase nos estudos da caracterização enzimática, adicionou-se 0,5 mL da solução de extrato enzimático bruto em estudo adequadamente diluído em 4,5 mL de uma solução 2% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio (0,1 M) com pH e temperatura variando de acordo com cada experimento (Itens III.4.2; III.4.3 e III.4.4). Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por mL de extrato enzimático bruto (U.mL⁻¹). Seguindo o mesmo procedimento, também foi determinada a atividade de inulinase usando inulina como substrato na condição experimental ótima.

Uma unidade de inulinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μmol de ART por minuto nas condições do ensaio.

A relação que caracteriza a enzima inulinase foi realizada através da taxa de atividade sobre a sacarose em relação à inulina (S/I), sendo de 12,27. Para uma inulinase a taxa S/I deve ser menor do que 50 (ETTALIBI e BARATTI, 1987)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como existem poucos trabalhos na literatura enfocando a produção de inulinase por fermentação batelada alimentada (FBA) foi preciso, inicialmente, testar a fermentação batelada alimentada em pequena escala, para que só depois de confirmar a viabilidade deste tipo de fermentação na produção de inulinase, pudesse então ser aumentada a escala de produção. Assim, o objetivo do item IV.1 é apresentar resultados referentes a testes preliminares para produção de inulinase por FES em béqueres usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA). O meio sólido usado como substrato para a produção de inulinase foi determinado por (MAZUTTI *et al.*, 2006).

IV.1 Produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA): Testes preliminares

A Figura IV.1 apresenta os valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente, os quais variaram de $30,19 \pm 2,45$ U.gds.⁻¹ (FBS - fração 100%) à $470,72 \pm 13,75$ U.gds.⁻¹ (FBA - fração de 25%). Nota-se que, independente do tipo de fermentação, os ensaios que apresentaram maior atividade enzimática foram os ocorridos em 24 horas de fermentação, e que a produção máxima de inulinase na cinética foi de $470,72$ U.gds.⁻¹ para a fermentação em batelada alimentada com quatro adições de substrato (fração de 25% do total do substrato).

Com relação aos perfis cinéticos (Figura IV.1) dois comportamentos distintos foram identificados entre os quatro experimentos. Na estratégia de FBS (100%), percebe-se que nas primeiras 6 horas de fermentação encontram-se valores de menor atividade, porém após 6 horas a produção aumenta consideravelmente até 24 horas e em seguida decresce. Já para a estratégia de FBA (fração de 25%) percebe-se o inverso, nas primeiras 6 horas de fermentação verifica-se maiores valores de produção, devido possuir $\frac{1}{4}$ menos de substrato e possuir a mesma quantidade de inóculo (6 mL) e, após 6 horas de fermentação e suas conseqüentes alimentações a produção aumenta para seu pico máximo ($470,72$ U.gds.⁻¹) no tempo de 24 horas.

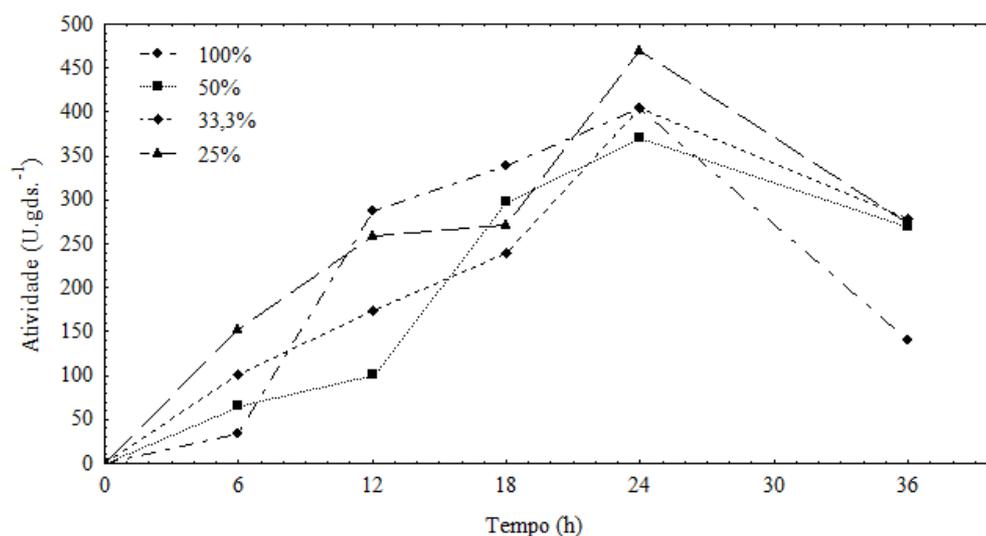


Figura IV.1: Cinética da fermentação batelada simples (100%) e fermentação em batelada alimentada (50; 33,3 e 25%) para produção de inulinase.

De acordo com os dados apresentados referentes à produção de inulinase por FBS e FBA, os resultados são comparáveis aos de Mazutti *et al.* (2006) que obtiveram 345 ± 41 U.gds⁻¹ após 96 horas de FBS usando 5 g de sólidos secos e aos Mazutti *et al.* (2007) que verificaram que o uso de farelo de soja reduziu o tempo máximo de FBS de 96 para 24 horas, conduzindo à uma atividade de 250 U.gds⁻¹.

Mendes *et al.* (2005) estudaram a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 operando em batelada alimentada. Após o estudo de estratégias de alimentação do reator de bancada pela taxa exponencial pré-determinada e por “feedback” de pH, os autores verificaram que o processo fermentativo com alimentação para controle de pH 4,5 alcançou atividade enzimática máxima igual a 562 U.mL⁻¹, utilizando-se subprodutos industriais de baixo custo como substrato.

A escassez de trabalhos na literatura referentes à produção de inulinase por FBA tornou difícil a comparação dos resultados obtidos nesse trabalho. No entanto, é possível fazer uma comparação com produção de outros produtos obtidos por FBA.

Tomás-Pejó *et al.* (2009) estudaram a produção de bioetanol a partir de palha de trigo com *Kluyveromyces marxianus* em processos simultâneos de sacarificação e fermentação em batelada alimentada. No trabalho, várias estratégias de alimentação para produção de etanol foram estudadas. A FBA pelo processo de FES com a adição de palha de trigo resultou em uma melhor configuração, alcançando a concentração de etanol mais

alta (36.2 g.L^{-1}) com um conteúdo de palha de trigo inicial de 10% (p/v) e 4% (w/v) de adição de substrato em 12 horas.

MU *et al.* (2009) avaliaram a FBS e FBA para a produção de ácido 3-fenil-lático (conhecido como agente antimicrobiano) a partir da cepa de *Lactobacillus* sp. SK007. Com a FBS, o rendimento do produto foi de $2,42 \text{ g.L}^{-1}$. Quando FBA foi introduzida em fermentador com capacidade de 3 L, a produção de ácido 3-fenil-lático alcançou rendimento de $17,38 \text{ g.L}^{-1}$.

O teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influencia o sucesso de uma fermentação em estado sólido. A Figura IV.2 apresenta os perfis experimentais para umidade obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase durante as 36 horas de fermentação em béquer. Em todos os experimentos foi verificado que houve uma diminuição no valor de umidade final em relação à inicial, obtendo-se um valor médio de 52% de umidade após 36 horas de fermentação. Porém, após 24 horas de fermentação onde se obteve os maiores valores de atividade enzimática, o valor médio encontrado é de 62% de umidade. Esta porcentagem de umidade está dentro da faixa ótima de umidade verificada na produção de inulinase por FES (entre 60-75%) para a mesma composição do meio empregada neste trabalho (MAZUTTI *et al.*, 2006).

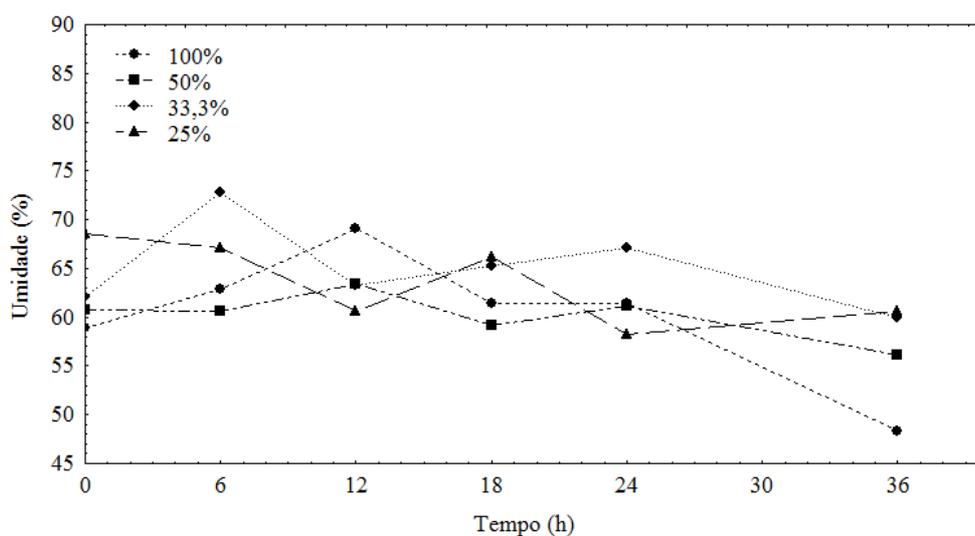


Figura IV.2: Perfis experimentais para umidade obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase durante as 36 horas de fermentação em béquer por fermentação batelada simples (100%) e fermentação em batelada alimentada (50; 33,3 e 25%).

A melhor condição de fermentação encontrada foi a de estratégia de FBA (fração de 25%) resultando em uma atividade máxima de 470,72 U.gds.⁻¹ após 24 horas. Os resultados mostram a viabilidade de se produzir inulinase por FES pela estratégia de FBA. Assim, os resultados obtidos nesta etapa serviram como base para a seqüência do trabalho. Os próximos passos foram contemplar o estudo da produção de inulinase em biorreator de leito fixo verificando a viabilidade técnica de aumento de escala e o uso de estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA).

IV.2 Produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação em batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo

IV.2.1 Produção de inulinase

A simplicidade de construção e operação dos biorreatores leito fixo é contraditória em relação às dificuldades encontradas no controle e otimização do processo, devido aos gradientes de massa e energia que ocorrem durante a fermentação. O objetivo nesta etapa do trabalho não foi estudar especificamente os efeitos dos gradientes de massa e energia inerentes à operação dos biorreatores leito fixo, mas investigar a viabilidade de se produzir inulinase neste tipo de biorreator por FBS e FBA. Neste intuito, foram realizados 7 experimentos, sendo as variáveis operacionais estudadas: temperatura, tipo de aeração na entrada do biorreator e tipo de fermentação (Tabela IV.1).

Tabela IV.1: Variáveis investigadas no processo de produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo.

Exp.	Tipo de Fermentação	Tipo de ar de entrada	Temperatura do ar de entrada (°C)	Inulinase* (U.gds⁻¹)
1	FBS	Seco	30	221±73,8
2	FBS	Seco	35	348±86,1
3	FBS	Seco	40	135±45,3
4	FBS	Seco	45	107±47,8
5	FBS	Úmido	30	447±12,0
6	FBA	Seco	36	482±95,6
7	FBA	Úmido	30	586±62,6

*Produção de inulinase em termos médios, considerando as quatro zonas dentro do biorreator.

Como pode ser visto na Tabela IV.1, os valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente variaram de $107 \pm 47,86 \text{ U.gds}^{-1}$ (experimento 4) até $586 \pm 62,6 \text{ U.gds}^{-1}$ (experimento 7). De acordo com os dados apresentados, as maiores atividades foram obtidas nas fermentações em batelada alimentada, seguida pela fermentação batelada simples com entrada de ar úmido.

Com relação à produção de inulinase em termos de atividade enzimática em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator, os quais estão apresentados na Figura IV.3, pôde-se verificar que nos experimentos 1, 2, 3, 4 e 6 (fermentações com entrada de ar seco) a produção de enzima aumenta conforme aumenta a altura do biorreator, independente do tipo de fermentação. Este aumento na produção da inulinase na parte superior do biorreator ocorre devido ao ar seco e baixa umidade nas zonas 1 e 2. Porém nos experimentos 5 e 7 (fermentações com entrada de ar úmido) ocorreu o inverso, a produção de enzima diminuiu conforme aumentou a altura do biorreator. Esta queda na produção pode ser consequência da desnaturação causada pelo aumento do calor metabólico gerado pelo micro-organismo nas zonas 3 e 4.

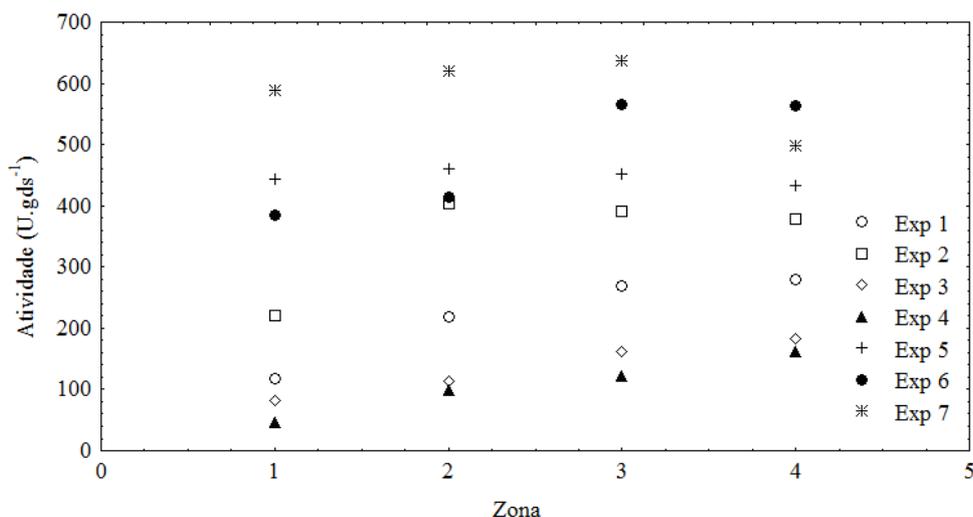


Figura IV.3: Produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos de atividade enzimática em cada uma das zonas dentro do biorreator: Zona 1 (0-10 cm), Zona 2 (10-20 cm), Zona 3 (20-30 cm) e Zona 4 (30-40 cm).

Xiong, Jinhua e Dongsheng (2007) obtiveram atividade máxima de 410 U.gds^{-1} após 72 h de fermentação usando 100 g de sólidos secos. Mazutti *et al.* (2010a) estudando a produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo, obtiveram uma atividade máxima de 436 U.gds^{-1} após 24 horas de fermentação conduzindo a uma produtividade de

18,2 U.gds⁻¹.h⁻¹. Neste trabalho, a máxima produtividade obtida foi de aproximadamente 24,4 U.gds⁻¹.h⁻¹, cujo valor é de 1,3 vezes maior à obtida por Mazutti *et al.* (2010a) e 4,3 vezes maior que à obtida por XIONG, JINHUA e DONGSHENG (2007).

A Figura IV.4 apresenta os valores de umidade obtidos ao final das fermentações considerando as 4 zonas dentro do biorreator para os sete ensaios experimentais realizados. Pode-se verificar que o teor de água do substrato sólido diminuiu acentuadamente na zona 1 dos experimentos 1 a 4, provavelmente devido ao ar seco e o respectivo aumento da temperatura do ar de entrada do biorreator. Nos experimentos 5 e 7 (fermentações com entrada de ar úmido) observa-se que a umidade diminui conforme o aumenta a altura do biorreator. Mazutti *et al.* (2010b) estudaram a avaliação cinética da produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo e também observaram que a umidade diminuiu em função da altura do biorreator e que o teor de água do substrato sólido é menor nas zonas 3 e 4. No entanto, observa-se que independente do tipo de fermentação, acima da zona 1 o teor de umidade não atingiu valores inferiores a 65%. Este aspecto é interessante tendo em vista que o intervalo ideal apresentado na literatura para a produção de inulinase por FES variou de 60% a 75% (MAZUTTI *et al.*, 2006; SELVAKUMAR e PANDEY, 1999).

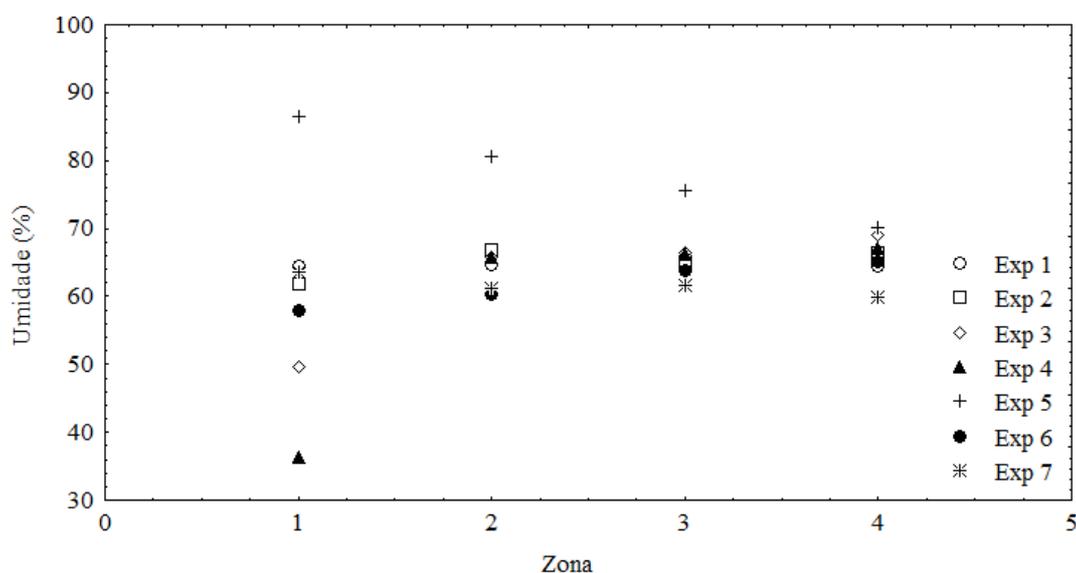


Figura IV.4: Valores para umidade avaliados em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator: Zona 1 (0-10 cm), Zona 2 (10-20 cm), Zona 3 (20-30 cm) e Zona 4 (30-40 cm).

Os resultados obtidos nesta etapa mostraram que a produção de inulinase usando biorreator de leito fixo com capacidade de 3 kg (base seca) por fermentação batelada e

batelada alimentada é tecnicamente viável, além de a FBA aumentar a produtividade do processo quando comparada com a literatura.

IV.2.2 Avaliação cinética para temperatura e produção de CO₂

A avaliação cinética é importante no aumento de escala, pois ela permite visualizar os fenômenos que ocorrem dentro do biorreator ao longo do tempo, possibilitando a inferência do controlador sobre as variáveis manipuladas com o objetivo de tentar manter o comportamento real do sistema o mais próximo possível do ótimo. As principais variáveis manipuladas num biorreator de leito fixo são a massa inicial de células, a temperatura, a vazão e a umidade do ar de entrada, além da porosidade do leito. A vazão ótima é sempre dependente da dimensão do biorreator, ou seja, quanto maior o biorreator maior será a vazão requerida para fornecer oxigênio aos micro-organismos e para a remoção do calor metabólico. A temperatura e umidade, por sua vez, têm influência direta na taxa na qual os micro-organismos se desenvolvem, logo afetam a performance do processo. A porosidade e a massa inicial de células são dependentes da quantidade de material sólido usado na fermentação.

O objetivo desta etapa do trabalho é apresentar a avaliação cinética da temperatura e produção de CO₂ em biorreator de leito fixo por fermentações em batelada e batelada alimentada. Os estudos foram realizados com base nos sete experimentos apresentados anteriormente relativos à produção de inulinase, sendo que aqui, os experimentos foram monitorados experimentalmente.

A Figura IV.5 apresenta os perfis de temperatura obtidos durante os experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase com as variáveis apresentadas na Tabela IV.1.

Observa-se que nos experimentos 1, 2, 3, 4 e 6 (fermentações com entrada de ar seco) independentemente do tipo de fermentação a temperatura não aumenta em função da altura do biorreator e que praticamente se mantém abaixo da temperatura do ar de entrada. Ao contrário disso, nos experimentos 5 e 7 (fermentações com ar úmido) a temperatura aumenta em função da altura do biorreator e no intervalo onde o metabolismo dos micro-organismos é máximo, foi verificada uma diferença em torno de 15°C entre o ar na entrada e na saída do biorreator. No entanto, o valor máximo de temperatura diferiu entre as FBS e

FBA (exp 5 e 7, respectivamente) onde observa-se que para FBA as temperaturas de saída chegaram a aproximadamente 50°C.

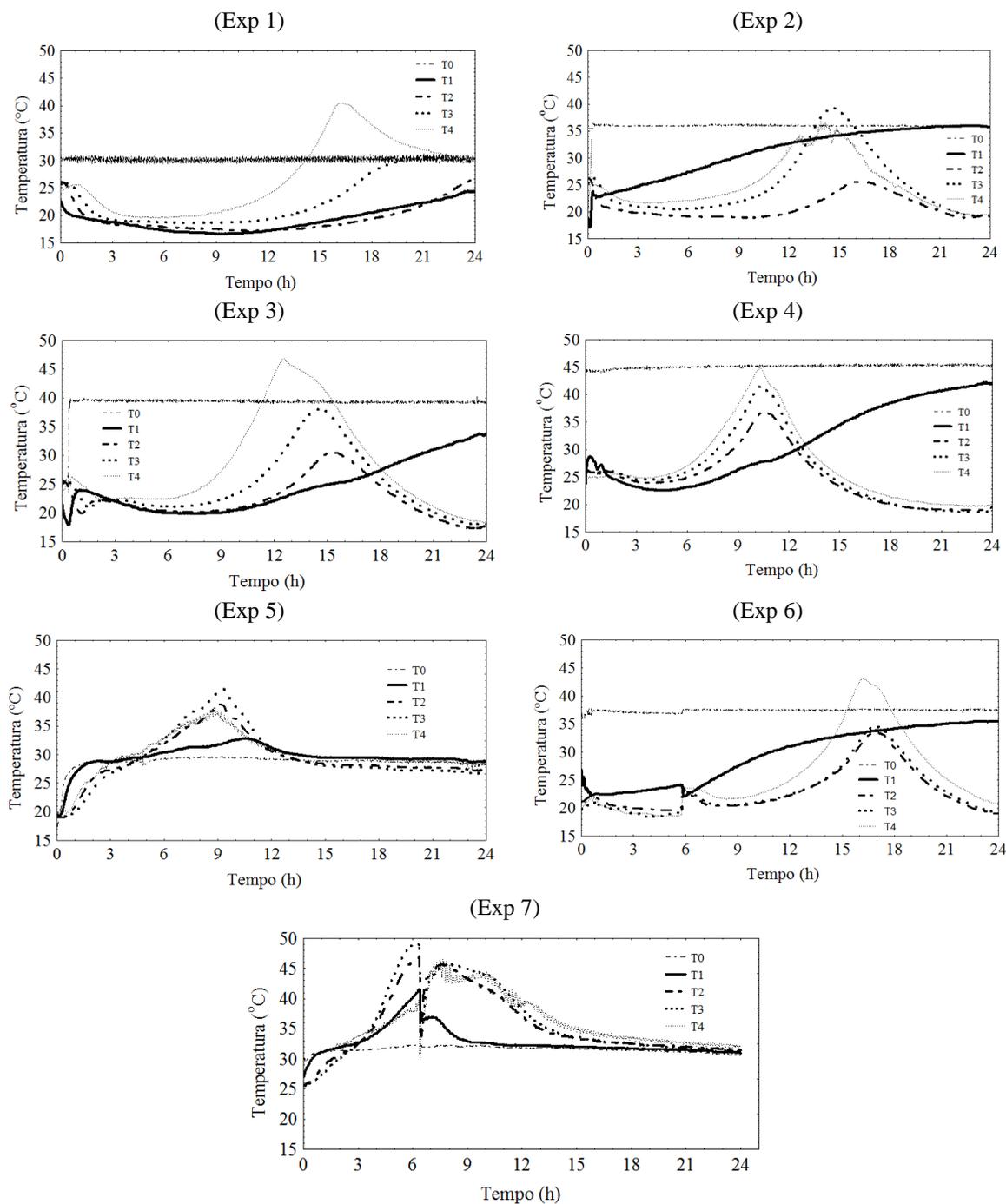


Figura IV.5: Perfis experimentais para temperatura obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase. Para os perfis de temperatura medida na entrada e saída de fluxo de ar (T0 e T4) e no interior do biorreator a 10, 20 e 30 cm (T1, T2 e T3, respectivamente).

A temperatura do ar de entrada tem influência direta no tempo onde foram verificados os picos de temperatura, tanto dentro do biorreator como na corrente de saída, os quais são resultados diretos do metabolismo da levedura. Nos experimentos 1 a 4 (FBS com entrada de ar seco a 30, 35, 40 e 45°C, respectivamente) observa-se que conforme aumenta a temperatura do ar de entrada, os picos de temperatura dentro do biorreator são observados em menores tempos (16,0; 14,7; 12,8 e 10,3 horas respectivamente). Ou seja, quanto mais alta a temperatura do ar de entrada, mais rápido a temperatura do meio atinge o valor ótimo para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, cujo valor é de 36°C (MAZUTTI *et al.*, 2006; TREICHEL *et al.*, 2009b). Já no experimento 5 (FBS com entrada de ar úmido a 30°C) o tempo foi de 9,2 horas enquanto que nos experimentos 6 e 7 (FBA com entrada de ar seco a 35°C e FBA com entrada de ar úmido a 30°C) os tempos são 16,10 e 6,15, respectivamente.

Com relação aos perfis de CO₂ (Figura IV.6) observa-se que a produção deste é diretamente proporcional aos perfis de temperatura (Figura IV.5) e provavelmente também ao consumo de açúcares redutores totais (ART) e a massa de células no meio. Nos experimentos com entrada de ar seco, (Exp. 1, 2, 3,4 e 6), observou-se menor produção de CO₂, porém nos experimentos com entrada de ar úmido, observa-se o contrário, provavelmente devido ao ar úmido favorecer o crescimento microbiano e conseqüentemente o aumento da concentração do CO₂.

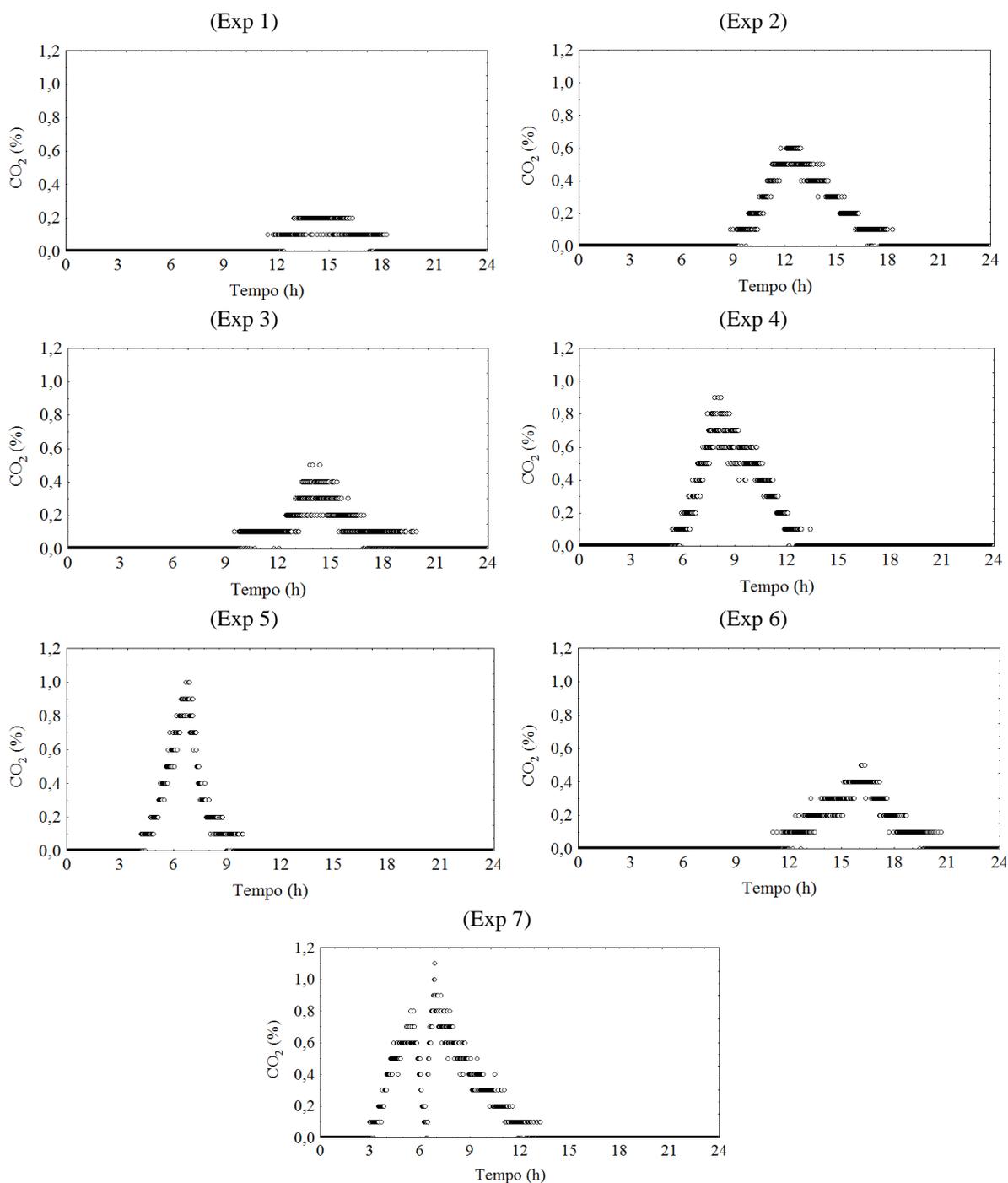


Figura IV.6: Perfis experimentais para CO₂ obtidos nos experimentos da avaliação cinética.

IV.3 Caracterização parcial da inulinase

A caracterização da inulinase baseou-se no estudo do extrato enzimático bruto com o objetivo de apresentar resultados referentes à temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo, estabilidade de pH, estabilidade a baixas temperaturas e os parâmetros cinéticos K_m

e $V_{\text{máx}}$. O extrato enzimático usado para os ensaios foi obtido da condição experimental ótima por FBA (586 U.gds^{-1}).

IV.3.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

O pH ótimo e a temperatura para atividade de inulinase foram determinados através da consecução de um delineamento composto central rotacional 2^2 , totalizando 11 experimentos, (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes). A Tabela IV.2 apresenta a matriz em termos de atividade de inulinase para efeito de pH e temperatura. Os valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente variaram de $283,21 \pm 12 \text{ U.mL}^{-1}$ (experimento 8) à $488,09 \pm 3 \text{ U.mL}^{-1}$ (experimento 11). Os resultados mostram que a máxima atividade da inulinase em função do pH e da temperatura foi obtida no ponto central em valores de 5,0 e 55°C , respectivamente.

Tabela IV.2: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura.

Exp.	pH	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Y_{EXP} (U.mL^{-1})	Y_{CALC} (U.mL^{-1})	Erro (%)
1	4,6 (-1)	44,4 (-1)	$332,86 \pm 32$	365,23	-9,73
2	5,4 (1)	44,4 (-1)	$333,64 \pm 4$	337,71	-1,22
3	4,6 (-1)	65,6 (+1)	$342,96 \pm 6$	349,60	-1,93
4	5,4 (1)	65,6 (+1)	$412,93 \pm 21$	391,27	5,25
5	4,5 (-1,41)	55,0 (0)	$461,14 \pm 25$	435,68	5,52
6	5,5 (+1,41)	55,0 (0)	$430,97 \pm 14$	445,65	-3,41
7	5,0 (0)	40 (-1,41)	$292,98 \pm 23$	269,34	8,07
8	5,0 (0)	70 (+1,41)	$283,21 \pm 12$	296,08	-4,54
9	5,0 (0)	55,0 (0)	$482,65 \pm 2$	484,90	-0,47
10	5,0 (0)	55,0 (0)	$483,83 \pm 1$	484,90	-0,22
11	5,0 (0)	55,0 (0)	$488,09 \pm 3$	484,90	0,65

Os resultados apresentados referente à atividade de inulinase foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A Tabela IV.3 apresenta a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes. Os termos significativos no modelo codificado (Equação IV.1) foram selecionados baseados no valor de p, que serve como

uma ferramenta para checar a significância de cada um dos coeficientes. Como pode ser observado o termo significativo do modelo ($p < 0,0005$) foi T^2 . Já os termos pH, pH^2 , T e pH x T não foram significativos ($p > 0,0005$).

Tabela IV.3: Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para atividade da inulinase em termos do pH e da temperatura.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	484,9	14,57	<0,0005
pH Linear (pH)	7,07	17,87	0,7084
pH Quadrática (pH^2)	-44,5	21,32	0,0912
Temperatura Linear (T)	18,96	17,87	0,3371
Temperatura Quadrática (T^2)	-203,4	21,32	0,0005
pH X Temperatura (pH x T)	34,6	25,23	0,2292

A Tabela IV.4 apresenta a análise da variância (ANOVA) e foi empregada para a validação do modelo matemático codificado usado para a predição da atividade de inulinase dentro das faixas de pH e temperatura estudadas. O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Na Tabela IV.4 o valor calculado de F foi 18,94, o qual é aproximadamente 3 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,95 sugere que o modelo gerado a partir dos dados da Tabela IV.4 pode explicar 95% da variação total dos resultados. Isto implica numa representação satisfatória do processo pelo modelo, conforme é ilustrado pela atividade enzimática calculada pela Equação IV.1 (5ª coluna) e o erro relativo (6ª coluna) da Tabela IV.2.

No entanto, outra possibilidade de se avaliar estatisticamente a validade do modelo é calculando o valor de F referente à razão da soma quadrática média devido à falta de ajuste pela soma quadrática média devido ao erro puro. Porém, nesta situação o modelo gerado neste trabalho não é estatisticamente válido, uma vez que o F calculado é aproximadamente 5 vezes maior que o F tabelado. Porém, matematicamente isto sempre vai ocorrer em situações onde o erro puro é mais baixo.

Tabela IV.4: ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o DCCR.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F
Regressão	60288,32	5	12057,66	18,94
Resíduo	3182,92	5	636,58	
Falta de ajuste	3165,98	3		
Erro Puro	16,38	2		
Total	63471,24	10		

$$R^2=0,95 \quad F_{0,95;5;5}= 5,05.$$

A Equação IV.1 apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão:

$$Y = 484,899 + 3,537 \cdot pH - 22,248 \cdot pH^2 + 9,480 \cdot T - 101,7 \cdot T^2 + 17,298 \cdot T \cdot pH \quad (IV.1)$$

Onde Y é atividade enzimática calculada (U.mL⁻¹), pH e T são os valores codificados de pH e temperatura, respectivamente.

O modelo codificado representado pela Equação IV.1 e validado pela análise de variância foi usado para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase em função da temperatura e do pH, as quais estão apresentadas na Figura IV.7. As Figuras IV.7 (a) e (b) mostra o efeito de interação do pH e temperatura na atividade de inulinase. A faixa de pH e temperatura na qual a atividade foi máxima variou entre 4,6-5,4 e 50-60°C, respectivamente.

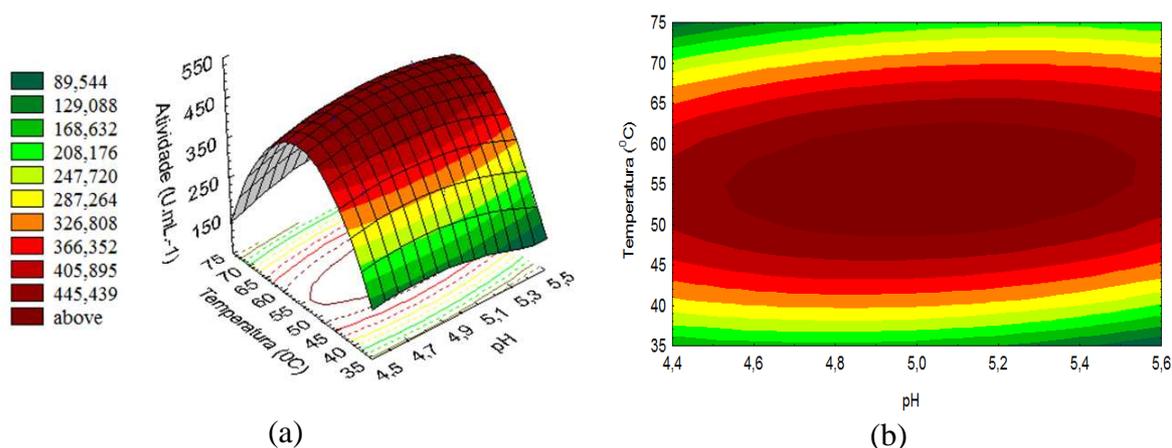


Figura IV.7: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade de inulinase por FBA no biorreator leito fixo: Efeito da temperatura e do pH.

Chen *et al.* (2009) estudaram exo- e endo-inulinase de *A. ficuum* JNSP5-06, encontrando um pH ótimo de 4,5 e 5,0 e uma temperatura ótima de 45°C, respectivamente.

Mazutti *et al.* (2009) estudaram a caracterização de inulinase obtida por FES e FS usando *K. marxianus* NRRL Y-7571 e encontraram um pH ótimo de 5,0 e 4,5 e uma temperatura ótima de 55°C.

A Tabela IV.5 apresenta vários trabalhos na literatura que relatam pH e temperatura ótimos para atividade de inulinase obtida por fermentação submersa e fermentação em estado sólido e sintetizadas por vários micro-organismos. Porém, como pode ser visto não há trabalhos sobre caracterização de inulinase obtida por fermentação em batelada alimentada, ficando assim difícil a comparação direta dos resultados aqui obtidos.

Tabela IV.5: Valores de temperatura e pH ótimos para inulinases obtidas por diferentes micro-organismos, referentes a trabalhos publicados na literatura nos últimos anos.

Micro-organismos	Formas de Cultivos	pH Ótimo	Temp. Ótima (°C)	Inulinase	Referências
Bactérias					
<i>Streptomyces</i> sp.	FS	6,0	70	Exo	SHARMA e GILL (2007)
Fungos					
<i>Aspergillus ficuum</i>	FS	4,7	60	Exo	ETTALIBI e BARATTI (2001)
<i>Aspergillus niger</i> AF10	FS	4,5	55	Exo	ZHANG <i>et al.</i> (2004)
<i>A. ficuum</i> JNSP5-06	FS	4,5	45	Exo	CHEN <i>et al.</i> (2009)
<i>A. ficuum</i> JNSP5-06	FS	5,0	45	Endo	CHEN <i>et al.</i> (2009)
Levedura					
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	FES	5,0	55	Exo	MAZUTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	FS	5,0	50	Exo	SHENG <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	FS	5,0	50	Exo	SHENG <i>et al.</i> (2008)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	FES	5,5	29	Exo	SHENG <i>et al.</i> (2008)
<i>P. guilliermondii</i> M-30	FES	6,5	30	Exo	SHENG <i>et al.</i> (2009)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	FES	5,0	55	Exo	MAZUTTI <i>et al.</i> (2009)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	FS	4,5	55	Exo	MAZUTTI <i>et al.</i> (2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FS	4,5	50	Exo	LIU <i>et al.</i> (2010)

A metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta mostrou-se útil para a otimização das variáveis da caracterização enzimática em função da temperatura e do pH. O extrato enzimático bruto obtido por fermentação em batelada

alimentada apresentou pH e temperatura ótimos de 4,5 e 55°C, respectivamente, resultando em uma atividade enzimática de $484 \pm 3 \text{ U.mL}^{-1}$.

IV.3.2 Temperatura de estabilidade para a enzima inulinase

Os resultados obtidos do decaimento da atividade enzimática da inulinase em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas, no intervalo de 40 a 70°C, estão apresentados nas Tabelas IV.6 a IV.9.

Através dos resultados encontrados para a temperatura de estabilidade para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 obtida por FBA, observou-se que dentro da faixa estudada a temperatura de maior estabilidade é a de 40°C. Santos (2002) apresentou a temperatura de 50°C como a de maior estabilidade para a enzima livre de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. Cazetta *et al.* (2005) e Mazutti *et al.* (2007) também obtiveram alta estabilidade de inulinase a temperatura de 50°C a partir de *K. marxianus*. Mazutti *et al.* (2009) estudaram a estabilidade para inulinases obtidas por FS e FES e observaram que ambas as enzimas apresentaram alta estabilidade a temperatura de 50°C.

Tabela IV.6: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 40°C.

Tempo (h)	Atividade (U.mL ⁻¹)	A/A ₀
0	5,188	1,00
0,083	5,158	0,99
0,16	5,069	0,98
0,25	5,059	0,98
0,75	5,107	0,98
1	5,090	0,98
2	5,120	0,99
3	5,090	0,98
4	5,021	0,97
5	5,067	0,98
10	5,090	0,98
20	5,076	0,98
30	5,066	0,98
40	5,021	0,97
50	5,046	0,97
60	5,006	0,96
70	5,051	0,97
80	4,977	0,96

Tabela IV.6: Continuação.

Tempo (h)	Atividade (U.mL⁻¹)	A/A₀
90	5,021	0,97
100	4,994	0,96
110	5,043	0,97
120	4,960	0,96
130	4,950	0,95
140	4,877	0,94
150	4,914	0,95
192	4,859	0,94
264	4,849	0,93
312	3,696	0,71
360	2,685	0,52
480	2,476	0,48

Tabela IV.7: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 50°C.

Tempo (h)	Atividade (U.mL⁻¹)	A/A₀
0	4,27	1,00
0,083	3,98	0,93
0,16	4,23	0,99
0,25	4,24	0,99
0,5	4,18	0,98
1	4,24	0,99
2	4,21	0,99
3	4,18	0,98
4	4,17	0,98
5	4,23	0,99
10	4,21	0,99
20	4,21	0,99
30	3,92	0,92
40	4,11	0,96
50	4,11	0,96
60	4,05	0,95
70	4,13	0,97
80	4,10	0,96
90	4,04	0,95
100	4,01	0,94
110	3,99	0,93
120	3,79	0,89
130	3,49	0,82
140	3,15	0,74
150	2,46	0,58

Tabela IV.8: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 60°C.

Tempo (h)	Atividade (U.mL ⁻¹)	A/A ₀
0	6,75	1,00
0,083	6,12	0,91
0,16	6,09	0,90
0,25	5,98	0,89
0,5	5,40	0,80
0,75	5,05	0,75
1	4,14	0,61
2	3,52	0,52
3	3,48	0,52
4	3,38	0,50
5	2,97	0,44

Tabela IV.9: Perfis de atividade da inulinase a temperatura de 70°C.

Tempo (h)	Atividade (U.mL ⁻¹)	A/A ₀
0	4,264	1,00
0,083	2,544	0,60
0,16	2,359	0,55
0,25	2,174	0,51
0,5	2,171	0,51
0,75	1,972	0,46
1	1,913	0,45
2	1,877	0,44

Os dados obtidos experimentalmente foram graficados em $\ln A/A_0$ versus tempo e desses gráficos, obteve-se um valor de K_d (constante de desativação térmica) para cada temperatura, como mostra a Tabela IV.10. Com estes valores, graficou-se o $\ln K_d$ em função de $1/T$ (K) para o cálculo de E_d (energia de ativação para a reação de desnaturação), mostrado na Figura IV.8.

Tabela IV.10: Valores de K_d em função de cada temperatura estudada.

T (°C)	T(K)	K_d Experimental	$1/T$ (K)	$\ln k_d$
40	313,15	0,0002	0,00319	-8,5172
50	323,15	0,0005	0,00309	-7,6009
60	333,15	0,1545	0,00300	-1,8676
70	343,15	0,2623	0,00291	-1,3383

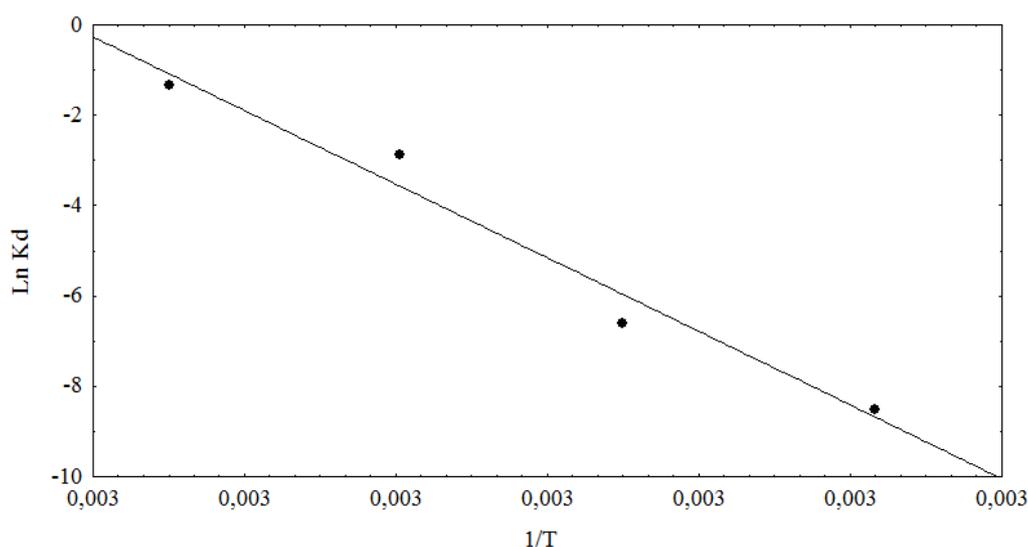


Figura IV.8: Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius.

Com os valores de Kd em função da temperatura graficou-se ln Kd em função do inverso da temperatura (Figura IV.8) para o cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação (Ed). A partir da inclinação da reta obteve-se o valor de Ed, que é 222,9 KJ.mol⁻¹.

Ettalibi e Baratti (2001) reportaram energia de ativação de 29,4 (enzima livre) e 26 (enzima imobilizada) KJ.mol⁻¹, para inulinase obtida a partir de *Aspergillus ficuum*. Treichel (2004) reportou energia de ativação de 554,1 KJ.mol⁻¹. Paula *et al.* (2008) estudando a hidrólise da sacarose com inulinase livre e imobilizada encontraram energia de ativação de 56,20 e 20,27 KJ.mol⁻¹, respectivamente.

A expressão para determinar os valores de Kd é:

$Kd(\text{teórico}) = Kdo * \exp(-Ed/RT)$, sendo T = temperatura em Kelvin.

Um parâmetro imprescindível quando se avalia a estabilidade enzimática é o tempo de meia vida, $t_{1/2}$, que corresponde ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura, para que a enzima tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial. Os valores dos tempos de meia vida (horas) foram calculados de acordo com a Equação IV.2, para as temperaturas estudadas, como mostra Tabela IV.11. A Figura IV.9 apresenta os valores de meia vida experimental.

$$t_{1/2} = -\ln 0,5 / Kd \quad (\text{IV.2})$$

Tabela IV.11: Valores de Kd e tempos de meia vida estimados para enzima inulinase.

T (°C)	T(K)	Kd Exp.	t _{1/2} (h) Exp.
40	313,15	0,0002	3465,50
50	323,15	0,0005	1386,20
60	333,15	0,1545	4,49
70	343,15	0,2623	2,64

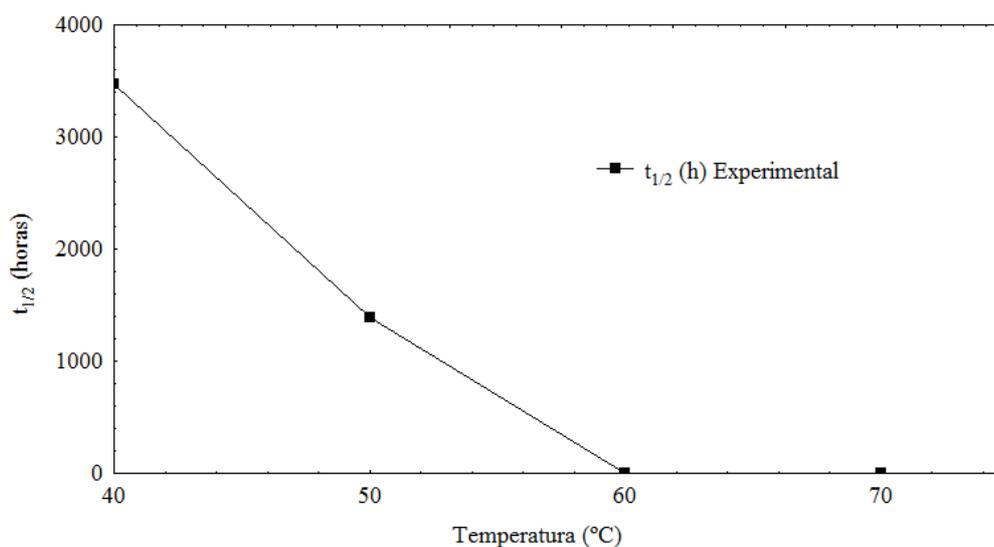


Figura IV.9: Tempo de meia vida (horas) experimental versus a temperatura.

IV.3.3 Influência do pH no estudo da estabilidade para a enzima inulinase

A influência do pH na estabilidade da inulinase obtida por FBA foi verificada nas faixas de pH 3,5-5,5, usando tampão acetato de sódio 0.1 M a 50°C em diferentes tempos de intervalos. Os resultados estão apresentados na Tabela IV.12 e na Figura IV.10. A análise dos resultados demonstram que a maior estabilidade da enzima foi verificada em valores de pH 4,0; pH 4,5; pH 5,0 e pH 5,5 depois de 150 horas de reação, com a redução de 47; 45; 48 e 44 % de atividade, respectivamente. Porém, em pH 3,5 a atividade de inulinase foi reduzida a 33% em relação à atividade inicial, depois de 60 horas de reação. Observa-se também uma ampla faixa de estabilidade se comparado com outros trabalhos na literatura, visto que a enzima começa a perder estabilidade aproximadamente após 120 horas de reação.

A estabilidade do pH para extratos obtidos a partir de fermentação em estado sólido e fermentação submersa foi recentemente reportado por Mazutti *et al.* (2009). No trabalho, a inulinase produzida por fermentação submersa apresentou estabilidade a pH 4,4 depois de 82 horas, enquanto que a inulinase produzida por FES apresentou estabilidade a pH 4,8 depois de 55 horas de exposição.

Treichel *et al.* (2009a) obtiveram estabilidade a pH 4,4 depois de 82 horas, Mazutti *et al.* (2007) obtiveram estabilidade de inulinase entre pH 4,5 e 4,8 a partir de *K. marxianus* NRRL Y-7571 por FES. Kushi *et al.* (2000) e Ettalibi e Baratti (2001) obtiveram atividade máxima em pH 4,7 para enzimas obtidas a partir de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* e *Aspergillus ficum*.

Tabela IV.12: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados.

Tempo (h)	pH				
	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
0	5,56	5,77	5,23	4,27	4,37
0,83	5,48	5,70	5,07	3,98	4,09
0,16	5,33	5,35	5,06	4,04	3,96
0,25	5,14	5,33	5,03	4,04	3,89
0,5	5,12	5,39	5,01	3,99	3,82
1	4,25	5,41	4,94	3,98	3,86
2	4,09	5,59	4,98	4,08	3,84
3	4,07	5,60	4,99	3,65	3,82
4	3,68	5,42	4,93	3,85	3,90
5	3,58	5,34	4,87	3,90	3,78
10	3,51	5,18	4,89	3,77	3,72
20	3,31	5,07	4,92	3,82	3,57
30	2,43	5,08	4,96	3,92	3,49
40	2,21	5,10	4,92	3,78	3,23
50	2,11	5,03	4,96	3,65	3,21
60	1,88	4,95	4,83	3,66	2,83
70		4,88	4,66	3,61	2,71
80		4,45	4,38	2,79	2,53
90		4,35	4,21	2,66	2,54
100		4,27	3,41	2,66	2,42
110		3,57	3,39	2,06	2,18
120		3,52	2,62	2,30	2,82
130		2,85	2,56	2,18	2,53
140		2,78	2,45	2,16	1,96
150		2,73	2,38	2,07	1,93

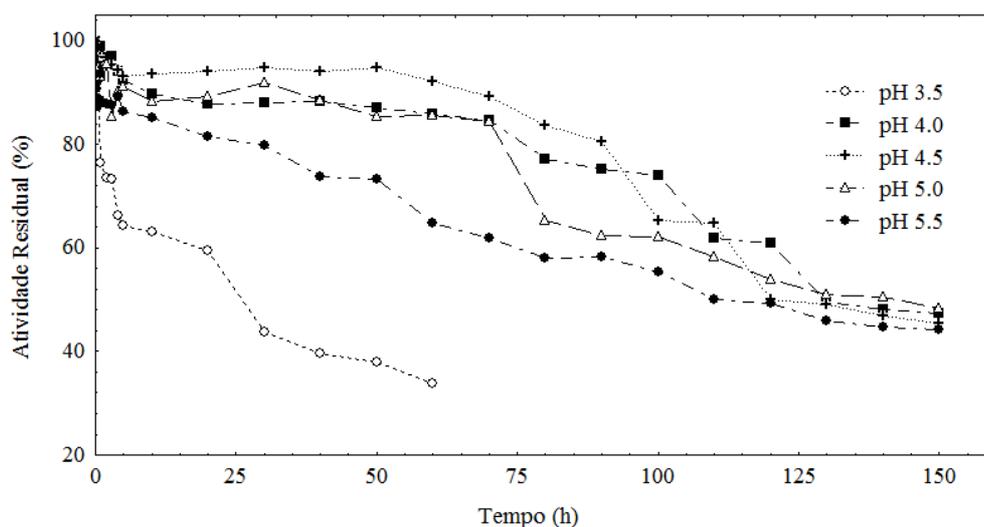


Figura IV.10: Influência do pH na estabilidade do extrato enzimático obtido por FBA.

IV.3.4 Estabilidade da enzima a baixas temperaturas

Uma característica muito importante e que deve ser avaliada é a estabilidade da enzima quando armazenada a baixas temperaturas, pois esta influenciará no tempo em que a enzima poderá ser armazenada, mantendo suas características iniciais em termos de atividade enzimática.

A estabilidade do extrato enzimático bruto à baixas temperaturas foi avaliada submetendo-se amostras (2 mL) à temperaturas de -80 ; -10 e 4°C . A atividade enzimática foi monitorada inicialmente a cada 24 horas por um período de 5 dias, em seguida a cada 5 dias por um período de 100 dias e por último a cada 10 dias até completar 225 dias.

Os resultados obtidos para a atividade enzimática nas diferentes temperaturas demonstram um comportamento variável em relação à manutenção de sua atividade durante o seu tempo de armazenamento.

Porém observou-se que não houve comportamento distinto entre as diferentes temperaturas de armazenamento em teste. As três formas de armazenamento, apresentaram em alguns momentos, diminuição da atividade e, em outros, aumento. No entanto, este aumento foi mantido durante os demais dias de armazenamento obtendo-se aproximadamente 50% a mais da atividade enzimática ao final do período em relação à atividade inicial.

O estudo da estabilidade do extrato bruto de inulinase obtida a partir de *K. marxianus* NRRL Y-7571 por FBA mostra que o extrato enzimático pode ser armazenado

em temperatura de congelamento e resfriamento (-80; -10 e 4°C) e que este aumenta gradativamente sua atividade enzimática, chegando ao dobro da atividade inicial após 225 dias de armazenamento.

IV.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max}

O efeito da concentração de sacarose e inulina na atividade enzimática foram testados na faixa de 0,5 a 35 g.L⁻¹ (Tabela IV.13 e IV.14, Figura IV.11 e IV.12, respectivamente).

Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Para a determinação dos parâmetros utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a Equação IV.3 a seguir:

$$v = \frac{V_{máx} [S]}{K_m + [S]} \quad (IV.3)$$

Através da linearização da Equação IV.3 tem-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (IV.4)$$

Então, grafica-se 1/[s] x 1/V, conforme Figura IV.11 e Figura IV.12.

Tabela IV.13: Atividade enzimática em função da concentração da sacarose [S].

Sacarose (g.L ⁻¹)	Sacarose (mol.L ⁻¹)	Atividade (U mL ⁻¹)	1/Atividade (L.min.mol ⁻¹)	1/Sacarose (mol)
0,5	0,001	21,55	46,41	684,62
0,75	0,002	22,74	43,98	456,41
1	0,003	26,48	37,77	342,31
1,5	0,004	27,81	35,96	228,21
2	0,006	31,59	31,65	171,16
3	0,009	38,45	26,01	114,10
4	0,012	39,43	25,36	85,58
5	0,015	42,42	23,57	68,46
10	0,029	45,11	22,17	34,23
15	0,044	49,51	20,20	22,82
20	0,058	50,41	19,84	17,12
25	0,073	53,63	18,65	13,69
30	0,088	54,51	18,35	11,41
35	0,102	55,44	18,04	9,78

Tabela IV.14: Atividade enzimática em função da concentração da inulina [I].

Inulina (g.L ⁻¹)	Inulina (mol.L ⁻¹)	Atividade (U mL ⁻¹)	1/Atividade (L.min.mol ⁻¹)	1/Inulina (mol)
0,5	0,0003	3,99	250,63	3200,00
0,75	0,0005	4,03	248,10	2133,33
1	0,0006	4,08	245,37	1600,00
1,5	0,0009	4,22	236,74	1066,67
2	0,0013	4,40	227,45	800,00
3	0,0019	4,88	205,03	533,33
4	0,0025	5,37	186,29	400,00
5	0,0031	5,66	176,73	320,00
10	0,0063	7,46	134,13	160,00
15	0,0094	8,80	113,64	106,67
20	0,0125	10,33	96,81	80,00
25	0,0156	11,10	90,08	64,00
30	0,0188	12,13	82,41	53,33
35	0,0219	12,90	77,53	45,71

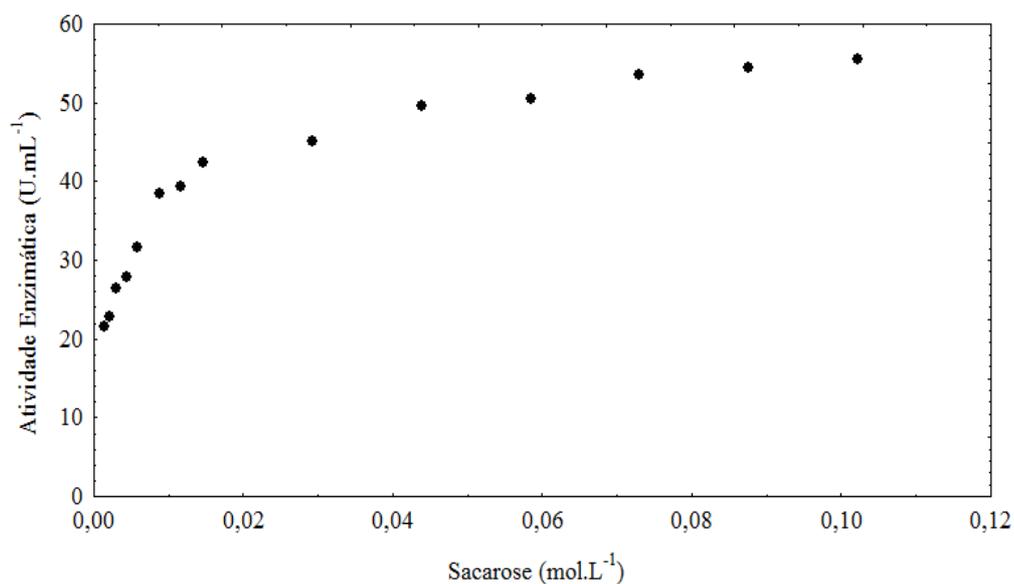


Figura IV.11: Velocidade de reação de inulinase (atividade enzimática) à temperatura de 50°C em função da concentração de substrato sacarose.

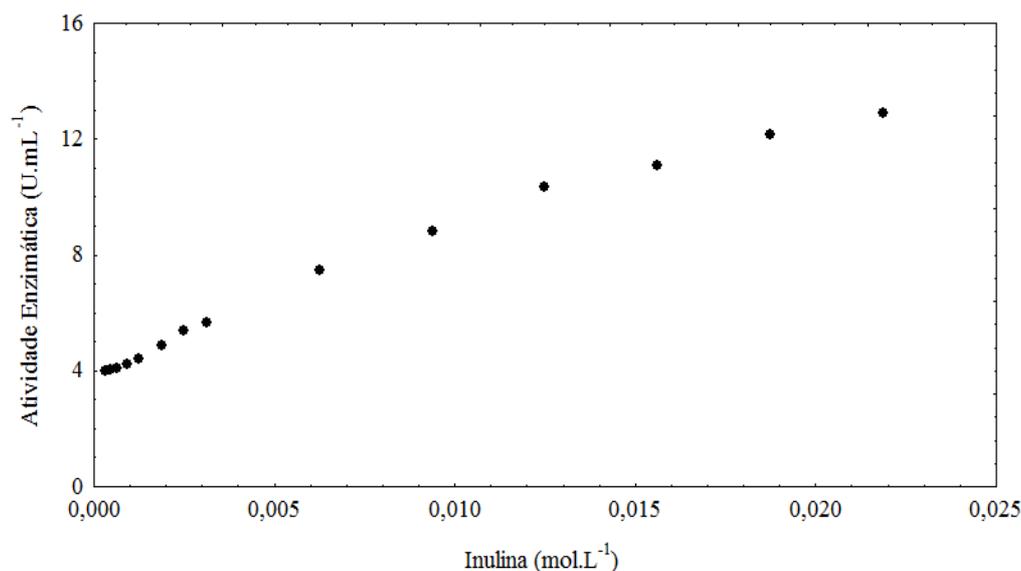


Figura IV.12: Velocidade de reação de inulinase (atividade enzimática) à temperatura de 50°C em função da concentração de substrato de inulina.

A correlação entre $1/v$ e $1/[S]$ (Figura IV.13 e Figura IV.14), forneceu os valores de K_m e V_{max} . As equações foram as seguintes:

$$1/v = 0,0558 (1/[S]) + 18,94 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para sacarose}$$

$$1/v = 0,4963 (1/[I]) + 56,938 \text{ com } R^2 = 0,98 \text{ para inulina}$$

Os valores de K_m encontrado para sacarose e inulina foram 2,94 mM e 8,71 mM, respectivamente e os valores de V_{max} foram de 0,0527 mol.L.min⁻¹ e 0,0175 mol.L.min⁻¹ para sacarose e inulina, respectivamente. Observa-se também que o baixo valor de K_m (2,94 mM) e o alto valor de V_{max} (0,0527 mol.L.min⁻¹) demonstram aproximadamente 3 vezes mais afinidade da enzima por sacarose do que por inulina.

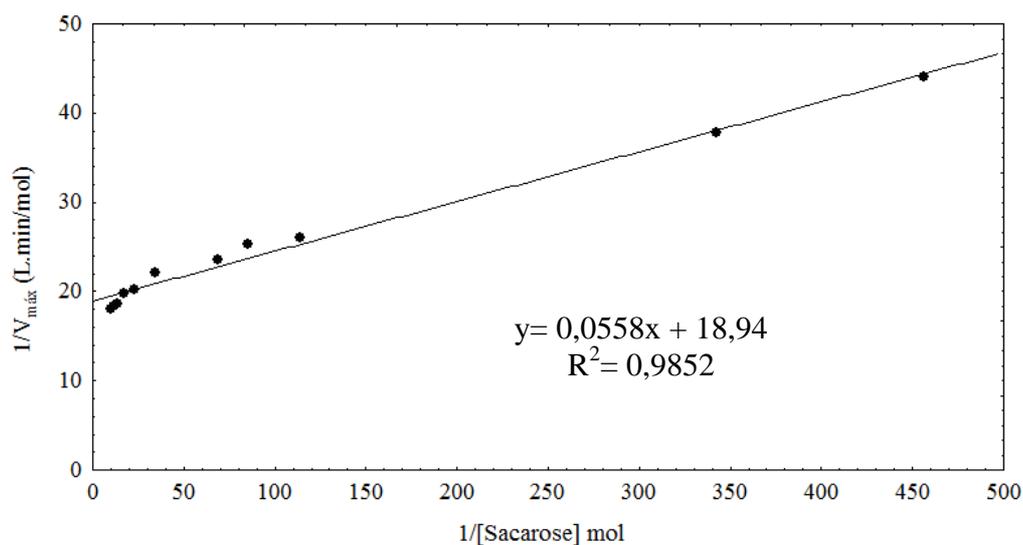


Figura IV.13: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para sacarose.

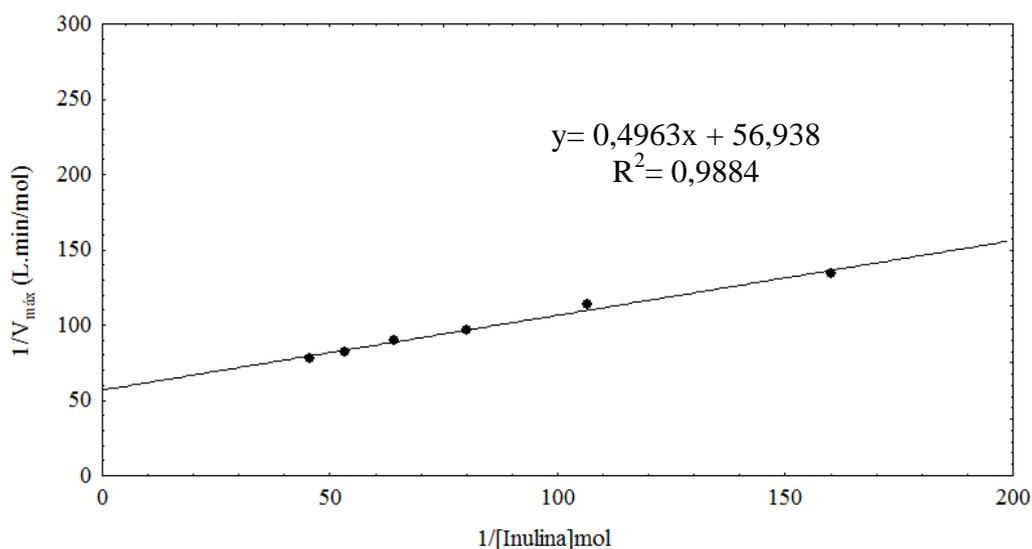


Figura IV.14: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para inulina.

Os valores de K_m determinados neste trabalho a partir do extrato bruto de inulinase obtido de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 por fermentação em batelada alimentada, são inferiores quando comparados com valores K_m reportados na literatura principalmente para a hidrólise de sacarose e quando comparado a trabalhos onde inulinasas são produzidas por *K. marxianus*. A Tabela IV.15 apresenta estudos para a

determinação de K_m e V_{max} para hidrólise de sacarose e inulina realizados a partir de diferentes micro-organismos.

Tabela IV.15: Valores de K_m e V_{max} obtidos para hidrólise de sacarose e inulina publicado em trabalhos nos últimos anos.

Micro-organismos	Sacarose		Inulina		Inulinase	Referência
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	11,9 mM	-	3,92 mM	-	Exo	PANDEY <i>et al.</i> (1999b)
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	-	-	86,9 mg.mL ⁻¹	-	Exo	KUSHI <i>et al.</i> (2000)
<i>Aspergillus ficuum</i>	0,060 M	192 U.g ⁻¹	-	-	Exo	ETTALIBI e BARATTI, (2001)
<i>Aspergillus niger</i> AF10	-	-	2,57 mM	-	Exo	ZHANG <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,33 mM	250 μ mol.min ⁻¹	1,25mM	526 μ mol.min ⁻¹	Exo	GILL, MANHAS e SINGH, (2006b)
<i>Streptomyces</i> sp.	66,66 mM	260 IU.mg ⁻¹	1,63 mM	450 IU.mg ⁻¹	Exo	SHARMA e GILL, (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	7,1 mM	17,79 M min ⁻¹	-	-	Exo	MAZUTTI <i>et al.</i> (2007)
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	61,83 mM	37,60 IU.mg ⁻¹	-	-	Exo	PAULA <i>et al.</i> (2008)
<i>Pichia guilliermondii</i>	-	-	21,1 mg.mL ⁻¹	0,1 mg.min ⁻¹	Exo	GONG <i>et al.</i> (2008)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	-	-	20,06 mg.mL ⁻¹	0,0085 mg.min ⁻¹	Exo	SHENG <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	-	-	43,1 mg.mL ⁻¹	-	Exo	CHEN <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	-	-	14,8 mg.mL ⁻¹	-	Endo	CHEN <i>et al.</i> (2009)
<i>Pichia pastoris</i> X-33	-	-	24 mg.mL ⁻¹	0,09 mg.min ⁻¹	Exo	ZHANG <i>et al.</i> (2009b)
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	13 mM	10,72 M min ⁻¹	-	-	Exo	TREICHEL <i>et al.</i> (2009b)

CONCLUSÕES

Neste trabalho propôs-se a produção de inulinase por fermentação estado sólido (FES) usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo. Assim, foram realizados estudos preliminares para a produção de inulinase por FBS e FBA em pequena escala e após definido a viabilidade da produção da enzima, então, foi realizado a produção de inulinase em biorreator de leito fixo. Por último foi realizado a caracterização parcial da enzima obtida. Neste contexto as conclusões obtidas foram:

Em ensaios preliminares para produção de inulinase por FES em béqueres usando estratégias de FBS e FBA, a melhor condição de fermentação encontrada foi a de estratégia de FBA (fração de 25%) resultando em uma produção máxima de $470,72 \text{ U.gds}^{-1}$, após 24 horas. Os resultados mostram a viabilidade de se produzir inulinase por FES pela estratégia de FBA.

A máxima produção de inulinase em biorreator de leito fixo foi obtida após 24 horas por FBA com entrada de ar úmido ($586 \pm 62,6 \text{ U.gds}^{-1}$), cuja atividade corresponde a uma produtividade obtida de $24,4 \text{ U.gds}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Assim, são apresentados novos dados experimentais para produção de inulinase por FES em batelada alimentada utilizando a configuração de bioreator de leito fixo, indicando a viabilidade técnica do processo. Além disso, os dados apresentados não estão disponíveis na literatura, mostrando uma perspectiva promissora para o aumento de escala no processo de produção da enzima.

A inulinase produzida por FBA foi parcialmente caracterizada, apresentando temperatura ótima de 55°C e um pH ótimo de 4,5. O extrato bruto de inulinase apresentou alta estabilidade à temperatura de 40°C , com um valor de E_d de $222,9 \text{ KJ.mol}^{-1}$. A enzima apresentou estabilidade na faixa de pH 4,0 - 5,0.

Em relação ao estudo de estabilidade a baixas temperaturas conclui-se que o extrato enzimático pode ser armazenado em temperatura de congelamento e resfriamento (-80 ; -10 e 4°C) e que este aumenta gradativamente sua atividade enzimática, chegando ao dobro da atividade inicial após 225 dias de armazenamento.

Quanto aos parâmetros cinéticos calculados, os valores de K_m para sacarose e inulina foram 2,94 mM e 8,71 mM, respectivamente e os valores de V_{\max} foram de $0,0527 \text{ mol.L.min}^{-1}$ e $0,0175 \text{ mol.L.min}^{-1}$ para sacarose e inulina, respectivamente.

CAPÍTULO VI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos para a inulinase obtida por fermentação batelada alimentada em biorreator de leito fixo sugere-se que para trabalhos futuros seja realizado:

- Caracterização parcial (temperatura e pH ótimos e de estabilidade e estabilidade a baixas temperaturas) da enzima imobilizada;
- Realização de estudos de concentração, purificação e imobilização (testando diferentes suportes);
- Avaliação da atividade enzimática (extratos brutos, liofilizados, concentrados, purificados e imobilizados) submetida a altas pressões;
- Aplicação do extrato enzimático livre e imobilizado na produção de fruto-oligossacarídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLAWAT, S.; DHIMAN, S. S.; BINDU BATTAN, B.; MANDHAN, R. P.; SHARMA, J., **Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric.** Process Biochemistry, v. 44. p. 521-526, 2009.

ALLEN, B. R.; LULI, G. W., **A gradiente-feed process for *Escherichia coli* fermentations.** Biopharm. v.1, p. 38-41, 1988.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S., **Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation.** Letters in Applied Microbiology, 2007.ISSN 0266-8254. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02222.x

BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J., **Applied Biocatalysis.** Harwood Academic Publishers. Chur, Switzerland, 1994.

CABRAL, F. A., **Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio.** Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP, 1989.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M., G. **A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content.** Bioresource Technol, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M., **Alimentos para Fins Especiais: Dietéticos.** 423 p., São Paulo, Livraria Varela,1996.

CARPITA, N. C.; KAMABUS, J.; HOUSLEY, T. L., **Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum astivum* and *Fistuca arundinaceae* leaves.** Journal Plant. Physiol, v.134, p.162-168, 1989.

CARVALHO, J. C. M. C.; SATO, S., **Fermentação Descontínua Alimentada.** In: Schmidell, Willibaldo et. al. (Coordenadores). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo:Edgard Blücher, v.2, Cap. 10, p. 205-218, 2001.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT`ANNA, G. L.; FREIRE, D. M. G., **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.** Journal of Food Engineering, v. 4, p. 239-247, 2000.

CAZETTA, M. L.; MARTINS, P. M. M.; MONTI, R.; CONTIERO J., **Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.** Journal of Food Engineering, v. 66, p.301-305, 2005.

CHEN, H. Q.; CHEN, X. M.; LI, Y.; WANG, J.; JIN, Z. Y.; XU, X. M.; ZHAO, J. W.; CHEN, T. X.; XIE, Z. J., **Purification and characterization of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06**. Food Chemistry, v. 115, p. 1206-1212, 2009.

CHEN, H. Z. **Advances in solid-state fermentation**. Research and Application of Microbiology, v. 3, p. 7-10, 1992.

CHI, Z. M.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G. L.; YUE, L., **Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 82, p. 211-220, 2009.

CONTIERO, J. **Inulinases**. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 381-398, 2004.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A., **Application of solid-state fermentation to food industry - A review**. Journal of Food Engineering, v. 76, p. 291-302, 2006.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LING, L., **Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, p. 244-250, 2006.

DURAND, A., **Biorreactor designs for solid state fermentation**. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 113-125, 2003.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C., **Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum***. Applied Microbiology Biotechnology, v. 26, p. 13-20, 1987.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C., **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum***. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 596-601, 2001.

FRANCIS, F.; SABER, A. NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSCH, A.; SZAKACS, G., **Use of response surface of methodology of optimizing process parameters for de production of alfa-amilase by *Aspergillus oryzae***. Biochemical Engineering Journal, p. 107-105, 2003.

GILL, P. K.; MANHAS, R. K.; SINGH, P., **Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus***. Journal of Food Engineering, v. 76, p. 369-375, 2006a.

GILL, P. K.; MANHAS, R. K.; SINGH, P., **Purification and properties of a heat-stable xoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus***. Bioresource Technology, v. 97, p. 894-902, 2006b.

GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P. **Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain.** Bioresource Technology, v. 87, p. 359-362, 2003.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G., **Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate.** Process Biochem, v. 35, p. 85-90, 1999.

GONG, F.; CHI, Z. M.; SHENG, J.; LI, J.; WANG, X. H., **Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase.** Biotechnol Bioprocess Eng., v. 13, p. 533 - 549, 2008.

GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z.; LI, J., **Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase.** Journal Ind Microbiol Biotechnology, v. 34, p. 179-185, 2007.

GUO, N.; GONG, F.; CHI, Z.; SHENG, J.; LI, J., **Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis.** Journal Ind Microbiol Biotechnology, v. 36, p. 499-507, 2009.

HENSING, M. C.M.; VROUWENVELDER, J. S.; HELLINGA, C.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T., **Use of Chemostat Data for Modelling Extracellular-Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* in a High-Cell-Density Fed-Batch Process.** Journal of Fermentation and Bioengineering. v. 79, p. 54-58. 1995.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, R.; BAARTMANS, R.; van DIJKEN, H., **Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*.** Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 42, p. 516-521, 1994.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J., **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 64, p. 175-186, 2004.

JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A., **Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*.** Process Biochemistry, v. 39, p. 5-11, 2003.

JUNG, G.; DENEFLÉ, P.; BECQUART, J; MAYAUX, J. F., **High-cell-density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1B.** Annals Institute Pasteur Microbiology, v.139, p.129-146, 1988.

KANGO, N. **Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*.** Journal of Food Engineering, v. 85, p. 473-478, 2008.

KARAKUZU, C.; MUSTAFA, T.; SITKI, O., **Modelling, on-line state estimation and fuzzy control of production scale fed-batch baker's yeast fermentation.** Control Engineering Practice, v. 14, p. 959-974, 2006.

KUSHI, R. T.; MONTI, R.; CONTIERO, J., **Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.** J Ind Microbiol Biotechnol, v. 25, p. 63 - 69, 2000.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. ***Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow.** Fungal Biology Reviews. 2010.doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001

LARROCHE, C.; BESSON, I.; GROS, J. B., **High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soy-beans.** Process Biochemistry, v. 34, p. 67-74, 1999.

LIU, X-Y.; CHI, Z.; LIU, G-L.; WANG, F.; MADZAK, C.; CHI, Z-M., **Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase.** Metabolic Engineering doi:10.1016/j.ymben.2010.04.004, 2010.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, J. M. K.; GOKHALE, D. V., **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation.** Process Biochem. v. 38, p. 715-721, 2002.

MAUGERI, F. **Apostila de Engenharia Bioquímica.** FEA – UNICAMP, 2002.

MAZUTTI, M. A.; SKOVRONSKI, A.; BONI, G.; ZABOT, G.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H. **Partial characterization of inulinases obtained by Submerged and solid-state Fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 2009. DOI 10.1007/s12010-009-8687-8

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F., **Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor.** J Chem Technol Biotechnol, v.85, p. 109-114, 2010a.

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F., **Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed Bioreactor.** Food Chemistry, v. 120, p. 163-173, 2010b.

MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., **Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugar cane bagasse**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 1, p. 56-59, 2006.

MAZUTTI, M.; CENI G.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., **Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations**. *Bioprocess Biosyst Engeneering*, v. 30, p. 297-304, 2007.

MEDEIROS, A.; PANDEY, A.; CHRISTEN, P.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S.; SOCCOL, C. R., **Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on packed bed column bioreactor**. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.17, p. 767- 771, 2001.

MENDES, G. L., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas - SP, 2006.

MENDES, G. L.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em meios industriais no processo batelada alimentada e batelada simples**. 6º SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, realizado em Campinas/SP. 2005.

MILLER, G. L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426 - 428, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N., **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, p.13 - 32, Heidelberg, 2006a.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. BEROVIC, M., **Solid-state fermentation bioreactors**. Springer-Verlag, Berlin, 2006b.

MU, W.; LIU, F.; JIA, J.; CHEN, C.; ZHANG, T.; JIANG, B., **3-Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus sp. SK007***. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 5226-5229, 2009.

NAIDOO, K.; AYYACHAMY, M.; PERMAUL, K.; SINGH, S., **Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* KM 24 mutant**. *Bioprocess Biosyst Eng* v. 32, p. 689 - 695, 2009.

NAVEENA, B. J.; ALTAF, M. D.; BHADRAYYA, K.; MADHAVENDRA, S. S.; REDDY, G., **Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus***

amylophilus GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 681-690, 2005.

OHTA, K.; NORIO, N.; NAKAMURA, T., **Purification and properties of an extracellular inulinases from *Rhizopus* sp. Strain TN-96.** *Journal Biosci Bioengineering*, v. 94, p. 78-80, 2002.

PANDEY, A., **Solid-state fermentation.** *Journal Engineering Biochemical*, n.13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P., **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, N.; JOSE, D., **Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications.** *Appl Biochem Biotechnol.* v. 81, p. 35 - 52, 1999b.

PAULA, F. C.; CAZETTA, M. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J., **Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.** *Food Chemistry*, v. 111, p. 691 - 695, 2008.

PAREKH, S.; MARGARITIS, A., **Inulinase (u-fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 446-448, 1985.

PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; LISBOA, C.; PACA, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R., **Relation between citric acid production and respiration rate of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation.** *Engineering in Life Sciences*, v. 4, p. 179-186, 2004.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH N.G., **Some engineering aspects of solid-state fermentation.** *Journal Biochemical Engineering*, v.13, p. 127-135, 2003.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A., **Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives.** *Biotechnol. Adv.* 2005.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G., **Coconut oil cake - a potential raw material for the production of alfa-amilase.** *Bioresource Technology.* v. 93, p. 169-174, 2004.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H., **Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements.** Food Science and Technology, v. 43, p. 1132-1137, 2010.

ROBERFROID, M. B., **Functional food concept and its application to prebiotics.** Digest Liver, v. 34, p. 105-10, 2002.

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J.; GIBSON, G. R., **The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products.** Journal of Nutrition, n.128, p.11-19, 1998.

ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P., **Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis.** Food Chemistry, v. 95, p. 77-82, 2006.

RUY, J. S.; PAULO, I. E. A., **Design of a fuzzy system for the control of a biochemical reactor in fed-batch culture.** Process Biochemistry. v. 37, p. 461- 469. 2001.

SANGHEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G., **Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides.** Trends Food Science & Technology, v. 16, p. 442-457, 2005.

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

SANTOS, M. M.; ROSA, A. S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N., **Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes.** Bioresour. Technol. v. 93, p. 261 - 268, 2004.

SCHMIDT, F. R., **Optimization and scale up of industrial fermentation processes.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 68, p. 425-35, 2005.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A., **Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*.** Process Biochemistry, v. 34, p. 851-858. 1999.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K., **Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp.** Journal of Food Engineering, v. 79, p.1172 - 1178, 2007.

SHARMA, A. D.; KAINTH, S.; GILL, P. K., **Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp.** Journal of Food Engineering, v. 77, p. 486-491, 2006

SHENG, J.; CHI, Z.; LI J.; GAO, L.; GONG, F., **Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase.** Process Biochemistry, v. 42, p. 805-811, 2007.

SHENG, J.; CHI, Z. M.; GONG, F.; LI, J., **Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase.** Appl Biochem Biotechnol, v. 21, p. 111-144, 2008.

SHENG, J.; CHI, Z.; YAN, K.; WANG, X.; GONG, F.; LI, J., **Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin.** Bioprocess Biosyst Engineering, v. 32, p. 333-339, 2009.

SHIMIZU, H.; MIURA, K.; SHIOYA, S.; SUGA, K., **An overview on the control system design of bioreactors.** Adv Biochemistry Engineering Biotechnology, v. 50, p. 65-84, 1993.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI, F., **Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*.** Enzyme Microbial Technology, v. 36, p. 717-724, 2005.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A., **Recent advances in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGH, R. S.; SOOCH, B. S.; PURI, M., **Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1.** Bioresource Technology, v. 98, p. 2518-2525, 2007.

STREDANSKY, M.; CONTI, E., **Xanthan production by solid state fermentation.** Process Biochemistry, v. 34, p. 581-587, 1999.

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J. M.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS M., **Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process.** Fuel, v. 88, p. 2142-2147, 2009.

TREICHEL, H., **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas - SP, 2004.

TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., **Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor.** J Ind Microbiol Biotechnol, v. 36, p. 895-900, 2009a.

TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., **Technical viability of the integrated production of inulinase using pré-treated agroindustrial residues**. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2009b. DOI: 10.1007/s00449-008-0262-0.

UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M. I. **Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation**. Process Biochem. v. 37, p. 637-641, 2002.

VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G., **Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications**. Advances in Applied Microbiology, v. 29, p. 139-176, 1983.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Yeast: biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Decker, Inc, p. 257-296. 1990.

VICENTE, A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; ROMERO-GÓMEZ, J. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C., **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems**. Journal Engineering Biochemical, v.13, p. 157-167, 2003.

XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L., **Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces S120* using response surface methodology**. Journal Engineering Biochemical, v. 34, p. 179-184, 2007.

YU, X.; GUO, N.; CHI, Z.; GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z., **Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis**. Biochemical Engineering Journal, v. 43, p. 266-271, 2009.

ZHANG, L.; ZHAO, C.; ZHU, D.; OHTA, Y.; WANG, Y., **Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris***. Protein Expression and Purification. v. 35, p. 272-275, 2004.

ZHANG, T.; GONG, F.; CHI, Z.; LIU, G. L.; CHI, Z. M.; SHENG, J.; LI J.; WANG, X., **Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris***. Antonie van Leeuwenhoek, v.95, p. 13-22, 2009a.

ZHANG, T.; GONG, F.; PENG, Y.; CHI, Z. **Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and**

characterization of the recombinant inulinase. Process Biochemistry, v. 44, p.1335-1339, 2009b.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S., **Fed-batch techniques in microbial processes.** Adv Biochemistry Engineering Biotechnology, v. 30, p. 147-94, 1984.

YEE, L.; BLANCH, H.W., **Recombinant protein expression in high cell density fedbatch cultures of *Escherichia coli*.** Biotechnology, v.10, p.1550-1556,1992.