

UNIVERSIDADE REGIONAL DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE
***Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**
EM CARVÃO ATIVADO E ALGINATO DE SÓDIO

CRISTIANE BRANCHER MUNARETTO

ERECHIM, RS - BRASIL

JANEIRO DE 2011

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

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE
***Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**
EM CARVÃO ATIVADO E ALGINATO DE SÓDIO

CRISTIANE BRANCHER MUNARETTO

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

JANEIRO DE 2011

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE
***Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**
EM CARVÃO ATIVADO E ALGINATO DE SÓDIO

CRISTIANE BRANCHER MUNARETTO

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:

Prof. Dra. Debóra de Oliveira
Orientadora

Prof^a. Dra. Helen Treichel
Orientadora

Prof^a. Dra. Gean Delise Leal Pasquali Vargas
UFFS

Prof^a. Dra. Clarissa Dalla Rosa
URI-Campus de Erechim

Erechim, 21 de Janeiro de 2011

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de tudo, querer”.

(Amyr Klink)

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Deus por se fazer presente em todos os momentos firmes ou incertos da minha vida, pois ao longo do caminho dessa jornada pude sentir a tua mão na minha, transmitindo-me segurança necessária para chegar até aqui. À Ti, sou eternamente grata pela sabedoria que me foi dada.

Aos meus familiares e ao meu marido Emanuel que tanto me ajudaram nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida, me dando conselhos e me motivando para continuar e jamais desistir.

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

Ao Professor Márcio, pelas sugestões, atenção e amizade.

Em especial, a minha amiga Aline que não mediu esforços para me ajudar para que este trabalho se concretizasse, estando sempre ao meu lado me incentivando e me auxiliando nas minhas maiores dificuldades.

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

À URI – Campus de Erechim e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

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

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

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE
***Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**
EM CARVÃO ATIVADO E ALGINATO DE SÓDIO

CRISTIANE BRNACHER MUNARETTO

Janeiro/2011

Orientadoras: Débora de Oliveira
 Helen Treichel

O interesse pela inulinase iniciou-se com a descoberta de sua habilidade de hidrolisar inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura. As inulinasas são geralmente termoestáveis e comercialmente viáveis para aplicações industriais. Entretanto, uma produção contínua de frutose requer a utilização de uma inulinase imobilizada. A produção da enzima inulinase pode ser obtida a partir de um grande número de micro-organismos. No entanto, as cepas de leveduras *Kluyveromyces* sp. têm obtido maior ênfase na produção desta enzima. A principal desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel como catalisador industrial é a sua baixa estabilidade. Para contornar este problema, a imobilização de enzimas, tem sido proposta. Com base nestes aspectos, o objetivo deste trabalho consistiu em investigar o processo de imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suportes. Foi realizado um planejamento experimental visando otimizar a imobilização da inulinase, onde foi avaliado o efeito da concentração de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado. O resultado obtido na condição experimental 2% (m/m) de alginato de sódio, 5% (v/v) de glutaraldeído e 3% (m/m) de carvão ativado conduziu a maior atividade específica, correspondendo a 2063,52U/mg proteína. A partir desta condição o estudo da caracterização parcial da inulinase imobilizada foi realizado avaliando-se o efeito do pH e temperatura na atividade enzimática e a estabilidade térmica em geladeira (5°C), à temperatura ambiente e 40°C. De forma geral, os resultados obtidos na caracterização permitem concluir que a inulinase imobilizada manteve sua atividade enzimática estável no período de tempo avaliado (1032h), nas três temperaturas estudadas.

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

**IMOBILIZATION OF INULINASE FROM
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571
IN ACTIVATED COAL AND SODIUM ALGINATE**

CRISTIANE BRANCHER MUNARETTO

January/2011

Advisors: Débora de Oliveira
 Helen Treichel

The great interest by inulinases is due to their ability of hydrolyze inulin, a vegetal polymer, in pure fructose. Inulinases are in general thermostable and commercially viable for industrial applications. However, a continuous production of fructose requires the use of an immobilized enzyme. The production of inulinase can be obtained from several microorganisms. In this sense, the strains of yeasts *Kluyveromyces* sp. have obtained high emphasis for inulinases production. The main disadvantage of using soluble enzymes as industrial catalyst is related to its low stability. To solve this problem, the immobilization of enzymes has gained much attention recently. The objective of this work was to investigate the immobilization of inulinases from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using activated coal and sodium alginate as support. The methodology of experimental design was used to optimize the immobilization process, evaluating the effect of the concentration of sodium alginate, glutaraldehyde and activated coal. The result obtained in the experimental condition of 2wt% of sodium alginate, 55 (v/v) of glutaraldehyde and 3wt% of activated coal led to the highest specific activity, of 2,063.52U/mg protein. From this condition the characterization of immobilized inulinase was carried out evaluating the effect of pH and temperature on enzyme activity and thermal stability (5, 25 and 40°C). In a general way, the results obtained in the characterization step permitted to conclude that the immobilized inulinase kept its activity in the period of time evaluated (1,032h) on the three studied temperatures.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Enzimas	5
3.2 Inulinases.....	8
3.2.1 Aplicações das inulinases.....	9
3.2.2 Substratos utilizados na produção de inulinases	11
3.2.3 Micro-organismos produtores de inulinases	12
3.2.4 Produção de inulinase por <i>Kluyveromyces marxianus</i>	12
3.3 Imobilização enzimática	13
3.3.1 Imobilização por envolvimento no interior de um suporte	18
3.3.2 Imobilização por ligação a um suporte via adsorção física	19
3.4 Suportes para a imobilização	20
3.5 Aplicações das enzimas imobilizadas	21
3.6 Imobilização de inulinases	23
3.7 Considerações Parciais	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Produção da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	26
4.1.1 Micro-organismo.....	26
4.1.2 Pré-inóculo e substratos	26
4.1.3 Produção de inulinase por fermentação batelada simples (FBS)	27
4.2 Imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	27
4.2.1 Suportes para imobilização	27
4.2.2 Equipamentos.....	28
4.2.3 Procedimento experimental para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	28
4.3 Determinação da atividade enzimática da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	29

<i>Substrato</i>	29
<i>Reagentes</i>	29
<i>Equipamentos</i>	29
4.3.1 <i>Determinação da atividade do extrato enzimático bruto</i>	29
4.3.2 <i>Determinação do teor de proteína do extrato enzimático bruto</i>	30
4.3.3 <i>Determinação da atividade da enzima inulinase imobilizada</i>	30
4.3.4 <i>Determinação do teor de proteína da enzima inulinase imobilizada</i>	31
4.3.5 <i>Determinação da atividade específica no extrato enzimático bruto e na enzima inulinase imobilizada</i>	31
4.4 <i>Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571</i>	31
4.5 <i>Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada</i>	32
4.6 <i>Otimização das condições de imobilização da inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571</i>	33
4.7 <i>Estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571</i>	33
4.8 <i>Caracterização parcial da enzima inulinase imobilizada</i>	34
4.8.1 <i>Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da inulinase imobilizada</i>	34
4.8.2 <i>Efeito da estabilidade da inulinase imobilizada</i>	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 <i>Testes preliminares para imobilização da inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571</i>	36
5.1.1 <i>Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase</i>	36
5.1.2 <i>Caracterização dos suportes utilizados na imobilização e da inulinase imobilizada em diferentes suportes de carvão ativado e alginato de sódio</i>	39
5.1.3 <i>Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada</i>	40
5.2 <i>Otimização das condições de imobilização da inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571</i>	40

5.3 Estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	45
5.4 Caracterização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 imobilizada	47
5.4.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	47
5.4.2 Estabilidade térmica da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 imobilizada	49
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	53
6.1 Conclusões.....	53
6.2 Sugestões para trabalhos futuros	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE I.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos métodos de imobilização enzimática (Zanin e Moraes, 2004).	17
Figura 2 - Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.	29
Figura 3 - Testes preliminares para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 utilizando Carvão Pelegrini 20x40 (a), Carvão Pelegrini 12x 40 (b) e Carvão Alpha LA 810 (c).	38
Figura 4 - Superfícies de respostas para a imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 em função da concentração de alginato de sódio e glutaraldeído (a), de alginato de sódio e carvão ativado (b) e glutaraldeído e carvão ativado (c).	43
Figura 5 - Cinética do processo de imobilização – atividade específica da enzima imobilizada e da solução de tratamento da enzima.	45
Figura 6 - Gráfico de Pareto do efeito da temperatura e pH na atividade da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do processo de imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	33
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para determinação da temperatura e pH ótimos da inulinase imobilizada.	34
Tabela 3 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 utilizando diferentes carvões ativados e vazões de bomba.	37
Tabela 4 - Caracterização dos suportes e inulinase imobilizada em diferentes suportes por análise de BET.	39
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade de inulinase, teor de proteína e atividade específica.	41
Tabela 6 - Coeficientes de regressão para a imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.	42
Tabela 7 - Análise de variância para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.	43
Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade enzimática, teor de proteína e atividade específica da inulinase imobilizada...	48
Tabela 9 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 5°C.	50
Tabela 10 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 25°C.	51
Tabela 11 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 40°C.	51

1. INTRODUÇÃO

As enzimas foram utilizadas por milhares de anos na forma de preparações brutas de origem vegetal, animal ou microbiana, sem que sua natureza essencial fosse conhecida. Somente em meados do século XX surgiu, de maneira criteriosa, o uso de enzimas em processos industriais (Said & Pietro, 2004).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de tecnologias de produção, extração e purificação tornaram crescente a utilização de enzimas microbianas, sendo as mesmas amplamente empregadas nas indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentícia.

As enzimas apresentavam pouca aplicação em síntese orgânica devido, principalmente, à ideia pré-concebida de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos até superior. Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem na sua forma original, e não se desdobram em meio não-aquoso. Esta característica deve-se, em parte, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e à baixa constante dielétrica da maioria deles e, também, ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação,

pois o mesmo poderia provocar a inativação ou redução da atividade enzimática, impossibilitando a catálise da reação.

As enzimas microbianas podem ser classificadas em três maiores campos de aplicação: aquelas utilizadas para sintetizar compostos; outras específicas para reações de bioconversão; e algumas capazes de hidrolisar polímeros em monômeros de interesse econômico. A inulinase pertence a esta última classe de enzimas, apresentando a capacidade de hidrolisar inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura (Vandamme & Derycke, 1983).

A frutose é considerada uma alternativa segura como adoçante em relação à sacarose, sendo largamente utilizada na indústria de alimentos. As inulinases são geralmente termoestáveis e comercialmente viáveis para aplicações industriais. Entretanto, uma produção contínua de frutose requer a utilização de uma inulinase imobilizada.

A inulinase tem sido muito estudada devido à sua reconhecida potencialidade na produção de xaropes com alto teor de frutose (Ettalibi & Baratti, 2001), e na síntese de oligossacarídeos (Kim *et al.*, 1979), compostos considerados prebióticos. Em função da facilidade de produção, muitas enzimas são obtidas por fermentação, suplantando a produção de origem animal e vegetal, apresentando tempos curtos de produção e podendo ser obtidas em qualquer época do ano utilizando substratos de baixo custo.

Hoje a obtenção desta enzima no mercado externo é realizada principalmente através da inulina como fonte de substrato, sendo esta de custo relativamente alto. No Brasil, a produção desta enzima a partir de resíduos de cana de açúcar e de milho (melaço e água de maceração de milho) poderá ter grande apelo econômico, devido à abundância e ao baixo custo destes subprodutos.

As inulinases de levedura mais estudadas são aquelas do gênero *Kluyveromyces* (*K. marxianus* var. *marxianus*, entre os quais são incluídos *K. marxianus* e *K. fragilis* se estendendo a *K. marxianus* var. *lactis* e *K. marxianus* var. *bulgaricus*). Essas leveduras são consideradas ideais na produção de inulinases, pois crescem rapidamente em altas concentrações celulares e produzem grandes quantidades desta enzima. As inulinases de *K. marxianus*

possuem capacidade de hidrolisar tanto inulina, como sacarose, rafinose e levanas (Snyder & Phaff, 1960), apresentando alta atividade para sacarose e rafinose e obtendo melhores resultados que as invertases (Verachtert & De Mot, 1990).

2. OBJETIVOS

Levando em consideração o exposto anteriormente, o objetivo geral deste trabalho consiste em investigar a imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- ✓ Desenvolvimento de metodologia para imobilização da inulinase utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suportes;
- ✓ Caracterização morfológica dos carvões ativados e enzimas imobilizadas;
- ✓ Estudo do efeito das variáveis do processo empregando técnica de planejamento experimental, visando à otimização das condições de imobilização;
- ✓ Estudo da caracterização parcial da inulinase imobilizada na condição experimental selecionada no item anterior, em termos de temperatura e pH, ótimos e de estabilidade, e estabilidade ao armazenamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à imobilização de enzimas. Com base no exposto anteriormente, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada ao sistema de imobilização de inulinase microbiana de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

3.1 Enzimas

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

Com a exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, todas as enzimas são proteínas (Galvão, 2004). Pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (Erginer *et al.*, 2000; Gürsel *et al.*, 2003; Isik *et al.*, 2003).

O uso de enzimas se torna interessante quando permite que pequenas quantidades sejam suficientes para catalisar reações específicas devido a sua grande eficiência em condições amenas de temperatura e pH. Sua alta seletividade faz com que as enzimas sejam extremamente úteis em processos envolvendo oxidações, condensações ou hidrólise principalmente se o produto final for destinado a fins alimentícios.

Essencialmente, as enzimas apresentam três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade (Bailey e Ollis, 1986; Galvão, 2004).

Como estabilidade entende-se a capacidade de uma enzima depender de sua estrutura nativa, a qual é mantida por meio de forças de interação. Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionalidade biológica. Assim, a estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

A atividade enzimática diz respeito à propriedade que as enzimas possuem de atuar diminuindo a energia de ativação requerida para transformar um substrato em produto, aumentando a velocidade de reação. A capacidade catalítica da enzima reside no seu sítio ativo e este compreende um número pequeno de aminoácidos. O sítio ativo é uma estrutura complexa cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais da enzima efetuem sua transformação química.

A afinidade enzimática está relacionada à capacidade de uma enzima catalisar grupos específicos em um determinado substrato. Esta é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores. Duas características estruturais são determinantes na especificidade da enzima: o substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem à enzima, permitindo seu correto alinhamento no sítio ativo para que a reação possa ocorrer (Said & Pietro, 2004).

As enzimas são imprescindíveis nos processos bioquímicos, pois catalisam centenas de reações pelas quais moléculas de nutrientes são degradadas e transformadas nos sistemas biológicos. Além disso, as enzimas reguladoras atuam de maneira altamente organizada sobre as vias metabólicas, produzindo uma harmoniosa interação entre os diferentes processos necessários à manutenção da vida. Portanto, o estudo das enzimas apresenta grande importância prática, seja em algumas doenças provocadas por desordem genética, onde ocorre a ausência ou deficiência de uma ou mais enzimas, ou em outras enfermidades causadas pelo excesso de atividade destas. Vários medicamentos exercem seus efeitos biológicos através da interação com enzimas. Contudo, a importância das enzimas não se limita

apenas à medicina e indústria farmacêutica. A ação catalítica destas macromoléculas tornou-se um grande atrativo para a indústria química, de alimentos e agricultura (Nelson & Cox, 2000).

A aplicação das enzimas em produtos e processos industriais ganhou maior importância a partir do início do século XX, com os avanços tecnológicos e científicos em áreas como a bioquímica. Com isso, o mercado de enzimas tornou-se mais atrativo, sendo as mesmas comercializadas e empregadas em larga escala (Said & Pietro, 2004).

A substituição de catalisadores químicos em processos industriais por enzimas, deve-se principalmente às condições brandas de pH e temperatura que estas atuam. A utilização de enzimas pode reverter em benefícios econômicos do processo, como consequência da redução de tempo e de energia elétrica gastos, assim como na preservação de tanques reacionais, não mais submetidos a altas pressões, temperaturas e corrosões. Além disso, devido à sua biodegradabilidade, as enzimas passaram a reduzir a quantidade de rejeitos industriais, os quais comprometem o meio ambiente. Estas macromoléculas, por serem mais específicas em suas reações comparadas aos catalisadores sintéticos, proporcionam poucas reações secundárias e menor formação de resíduos no produto final, aumentando a qualidade de produção e reduzindo a poluição (Said & Pietro, 2004).

A maioria das enzimas aplicadas industrialmente, aproximadamente 75%, são hidrolases, utilizadas na despolimerização de substâncias naturais. Entre as enzimas classificadas como hidrolases, as proteases dominam o mercado enzimático, representando cerca de 40% de todas as enzimas comercializadas. As proteases são empregadas em vários setores como a indústria de alimentos, detergentes, couro e farmacêutica. O segundo grande grupo de hidrolases com aplicação industrial é composto pelas carboidrases, utilizadas em cervejarias, panificação, na indústria do amido, têxtil e de papel. Além destes setores, estas enzimas têm sido utilizadas na fabricação de ração animal, em biotransformação de produtos químicos, em análises diagnósticas e no tratamento de resíduos. Outras classes de enzimas encontram aplicação industrial pontual, como a glicose isomerase, as oxidases, glicose oxidase,

colesterol oxidase e algumas enzimas usadas em técnicas de biologia molecular (Said & Pietro, 2004).

Como pôde ser verificado, o mercado enzimático é bastante promissor e a utilização de enzimas no setor de alimentos domina o mercado destes insumos. Neste segmento industrial, liderando as aplicações, encontram-se os xaropes derivados de amido, bebidas alcoólicas, produtos de laticínios e alimentos para animais. Com menor aplicação, ainda se encontram produtos de padaria; processamento de frutas, vegetais e proteínas; e extração de óleos vegetais.

3.2 Inulinases

Dentre as enzimas utilizadas no setor de alimentos, as inulinases microbianas podem ser destacadas como uma importante classe de enzimas industriais, a qual vem recebendo especial atenção nos últimos anos (Contiero, 2004). As inulinases podem ser obtidas de leveduras, fungos, bactérias e de plantas (Manzoni e Cavazzoni, 1992). Uma das mais estudadas é a enzima produzida por *Kluyveromyces marxianus*, que possui boa atividade sobre os substratos sacarose e inulina (Kushi *et al.*, 1996).

Várias enzimas produzidas por micro-organismos e vegetais são capazes de degradar frutanas. 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. Além disso, essas enzimas podem ser distinguidas pela sua especificidade por ligações β -1,2 (encontradas em inulina e sacarose), β -2,6 (encontradas em levanas) ou para ambos os tipos de ligação (Verachtert e De Mot, 1990).

As inulinases são enzimas que degradam ligações β -2,1 de cadeias de β -frutanas através de um processo de endo ou exo-degradação. As endo-inulinases (β -D-frutano frutanohidrolase, EC 3.2.1.7) hidrolisam ligações internas da inulina para formar inulo-oligossacarídeos como produto principal da reação, enquanto as exo-inulinases (β -D-frutopiranosídeo frutohidrolase, EC

3.2.1.80) hidrolisam ligações frutofuranosídicas sequencialmente (Uhm *et al.*, 1999).

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-frutano-hidrolase; EC 3.2.1.7) agem de forma randômica sobre o acoplamento interno na molécula de inulina, liberando inulo-triose, inulo-tetraose e inulo-pentaose como produtos principais (Ettalibi e Baratti, 2001; Ohta *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2009).

3.2.1 Aplicações das inulinases

A maior aplicação de inulinases 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. Assim, a utilização das inulinases apresenta-se como uma alternativa para sua obtenção (Contiero, 2004).

Atualmente, as inulinases comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria-prima com um alto valor agregado. A inulina é o substrato mais utilizado como fonte de carbono para a produção de inulinase. Porém, uma grande variedade de insumos de cultivo é empregada para uma diversidade de micro-organismos, na obtenção desta enzima. Entre estes, pode-se destacar substâncias puras (monossacarídeo, dissacarídeo ou polissacarídeo), compostos ricos em inulina e substratos mistos. Em micro-organismos produtores de inulinase com atividade de invertase, pode ser utilizada inulina ou sacarose como fontes de carbono no meio de cultivo. Outros substratos também são utilizados, como derivados de inulina, amidalina, arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, melesitose, metanol, rafinose, salicina e amido (Contiero, 2004).

A dificuldade de se encontrar um adoçante sintético, sem restrições médicas, transformou a frutose, um monossacarídeo natural, em uma viável

alternativa, devido a um considerável número de vantagens em relação a outros adoçantes. A frutose possui um poder adoçante até 1,5 vezes maior, comparado à sacarose (Hanover & White, 1993). Ao apresentar maior poder adoçante, a frutose pode ser utilizada em menores quantidades, reduzindo o consumo de calorias, contribuindo para a diminuição da hiperglicemia, sendo assim, mais tolerada por diabéticos. Devido a seu elevado poder higroscópico, é atrativa na produção de confeitos, também sendo utilizada na indústria de sorvetes, para evitar a textura granular provocada pela cristalização da lactose (Vicente, 2000). Além disso, a frutose é adicionada em muitos adoçantes sintéticos, como a sacarina, com o objetivo de mascarar o sabor residual amargo provocado por esta substância (Vandamme & Derycke, 1983).

A frutose pode ser encontrada em muitos vegetais, associada com demais açúcares, como a glicose, em frutas, raízes como a beterraba e em caules como a cana-de-açúcar. Em sua forma polimérica, a inulina é encontrada em algumas raízes e tubérculos, como a alcachofra, chicória, dália e dente-de-leão. A frutose também ocorre naturalmente no mel (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 subsequente neutralização dos mesmos interferem nas etapas posteriores de purificação do produto final (Verachtert & De Mot, 1990). Contudo, a falta de produção em larga escala de inulina acaba por limitar a produção de xaropes com alto teor de frutose a partir deste polímero. A mais promissora fonte de inulina é a Alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) e, apesar das técnicas de plantio e colheita bem definidas, a escala de produção é muito

baixa em comparação a outras fontes de açúcar, como a cana-de-açúcar e o milho (Vicente, 2000).

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, as conversões biológicas a partir da ação enzimática resultam em produtos de maior qualidade (Vandamme & Derycke, 1983).

As inulinases também são aplicadas na produção de inulo-oligossacarídeos, bem como na produção de ácido glicônico, pululana e acetona-butanol. Porém, a produção de xaropes de frutose através destas enzimas continua a ser a alternativa mais promissora, principalmente quando comparada às outras formas de obtenção destes produtos (Contiero, 2004).

3.2.2 Substratos utilizados na produção de inulinases

A inulina é o substrato mais utilizado como fonte de carbono para a produção de inulinase. Porém, uma grande variedade de insumos de cultivo é empregada para uma diversidade de micro-organismos, na obtenção desta enzima. Entre estes, pode-se destacar substâncias puras (monossacarídeo, dissacarídeo ou polissacarídeo), compostos ricos em inulina e substratos mistos. Em micro-organismos produtores de inulinase com atividade de invertase, pode ser utilizado inulina ou sacarose como fontes de carbono no meio de cultivo. Outros substratos também são utilizados, como derivados de inulina, amidalina, arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, melesitose, metanol, rafinose, salicina e amido (Contiero, 2004).

Raízes e tubérculos de várias plantas da família *Compositae* e *Gramineae*, ou frutanas e inulina, isoladas destas, têm sido utilizados como fonte de carbono para a produção da enzima. Comercialmente, a inulina é obtida dos tubérculos de dália (*Dahlia pinnata*), os quais possuem elevadas

quantidades deste produto. Entretanto, esta planta é bastante sensível a condições climáticas, o que dificulta a sua colheita (Verachtert & De Mot, 1990). Dessa forma, ricos extratos de inulina podem ser preparados a partir de tubérculos de Alcachofra de Jerusalém (*Heliantus tuberosus*) e raízes de chicória (*Cichorium intybus*). O processo de extração pode ser efetuado através de pressionamento e filtração de raízes de chicória ou cubos de tubérculos de alcachofra (Fleming & Grootwassink, 1979).

3.2.3 Micro-organismos produtores de inulinases

A produção da enzima inulinase pode ser obtida a partir de um grande número de micro-organismos. No entanto, as cepas de leveduras *Kluyveromyces* sp. e do fungo filamentoso *Aspergillus* sp. têm obtido maior ênfase na produção desta enzima. Alguns micro-organismos isolados a partir da rizosfera de dália apresentam potencial para a produção de inulinase. Entre estes, pode-se destacar aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Cladosporium* e *Streptomyces* (Viswanathan & Kulkarni, 1995).

A produção de inulinase por bactérias não é comparável à imensidade de leveduras e fungos produtores desta enzima (Gill, 2006). Porém, vários autores verificaram a produção de inulinase envolvendo gêneros de bactéria, como *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Streptococcus* sp. (Contiero, 2004).

3.2.4 Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*

As leveduras produtoras de inulinase possuem a capacidade de crescer em diversas fontes de carbono. No entanto, maiores produções da enzima são verificadas em cultivos com inulina. Porém, devido ao custo deste polímero, a utilização de meios de cultivo com inulina pura não é economicamente viável em escala industrial. Dessa forma, extratos de algumas plantas ricas em inulina, como a Alcachofra de Jerusalém e o Agave, têm sido utilizados na produção da enzima. Contudo, a excreção enzimática é limitada nestes meios de cultivo, os quais interferem em posteriores etapas de purificação do produto (Byum & Nahm, 1978). Em fermentações contínuas, outros substratos, além da

inulina, podem ser utilizados com boas taxas de produção de inulinase. Porém, estes processos de produção da enzima são influenciados por vários problemas, relacionados à repressão catabólica enzimática (Grootwassink & Hewitt, 1983).

A composição do meio de cultivo afeta sensivelmente a excreção enzimática realizada por estes micro-organismos. Meios de fermentação contendo compostos nitrogenados, como extrato de levedura, aminoácidos e uréia, aumentam as taxas de produção da enzima.

As inulinasas 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).

A levedura *Kluyveromyces marxianus*, também conhecida como *K. fragilis* e *Saccharomyces fragilis* (Cruz-Guerrero *et al.*, 1999; Cortez *et al.*, 2005), possui uma habilidade natural de excretar inulinase, uma propriedade desejável para baixar custos com técnicas de extração enzimática (Rouwenhorst *et al.*, 1990). Embora esta levedura apresente maior produção da enzima quando se utiliza a inulina como fonte de carbono (Snyder & Phaff, 1960), outros substratos vêm sendo empregados com sucesso na produção de inulinase por *K. marxianus*.

A inulinase obtida no cultivo da levedura *K. marxianus* possui atividade sobre a inulina, sacarose, rafinose e levanas. A biossíntese e excreção da inulinase de *K. marxianus* possuem várias características em comum com a invertase de *S. cerevisiae*. A maior parte desta enzima está associada à parede celular (Kirby & Davies, 1970), cuja arquitetura é mantida por ligações dissulfeto (Workman & Day, 1984). A atividade enzimática pode ser detectada, tanto em meio de cultura, como na preparação de células, pois possui atividade intra e extracelular.

3.3 Imobilização de enzimas

Inúmeras enzimas imobilizadas em suportes sólidos por diferentes protocolos têm sido amplamente empregadas na produção de alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos biologicamente importantes.

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.*, 2000).

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio da reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio (Girelli & Mattei, 2005; Paiva *et al.*, 2000). As pesquisas sobre esse assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, quer por meios físicos ou químicos (Vitolo, 2001).

A principal desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel como catalisador industrial é a sua baixa estabilidade. Para resolver este problema, várias abordagens têm sido propostas: a imobilização de enzimas, o uso de glicóis e outros aditivos estabilizantes, reticulação com agentes bifuncionais, seleção de enzimas de organismos termófilos ou ainda modificações química na enzima (Ladero *et al.*, 2002; Giacomini *et al.*, 2001).

Enzimas imobilizadas são enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que podem ser usadas repetida e continuamente.

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

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia, e maior atividade catalítica, sua utilização em processos industriais têm sido limitada. Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos. Com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, têm-se estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio de reação, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (Zanin e Moraes, 2004; Ladero *et al.*, 2002).

A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971: “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (Wingard, 1972). A enzima pode estar ligada a um suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz. Assim, obtêm-se um sistema catalítico facilmente separável do meio reacional, podendo ser utilizado em reatores contínuos ou em repetidas bateladas, enquanto este sistema enzimático estiver ativo (Zanin & Moraes, 2004).

Na literatura encontram-se diversas classificações para enzimas imobilizadas, todas em concordância com a definição apresentada. A Figura 1 apresenta esquema geral da classificação dos métodos de imobilização proposta por Kenedy & Roig, que procura integrar a natureza da interação

responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado. O diagrama apresenta a subdivisão entre enzimas modificadas pela técnica de imobilização, tornando-se insolúveis através de ligações a suportes ou reticulação (“crosslinking”); e enzimas que permaneceram solúveis após o processo de imobilização. Entre estas, incluem as enzimas solúveis imobilizadas sem derivatização, utilizadas em reatores com membranas semipermeáveis de ultrafiltração e fibras ocas, as quais retêm a enzima em seu interior; e enzimas solúveis imobilizadas com derivatização, através da ligação da enzima com outra macromolécula, apresentando mobilidade restrita, apesar de permanecer solúvel no meio de reação (Zanin & Moraes, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A aplicação dos métodos de imobilização das enzimas depende de fatores essenciais do processo, como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. O principal fator é selecionar um suporte adequado, o que é definido como uma parte não-catalítica da imobilização de enzimas, na qual a parte catalítica é construída. Assim, o método escolhido deve atender às duas necessidades: a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade; não-catalítica, relativa a processos de controle e separação (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Cao, 2005).

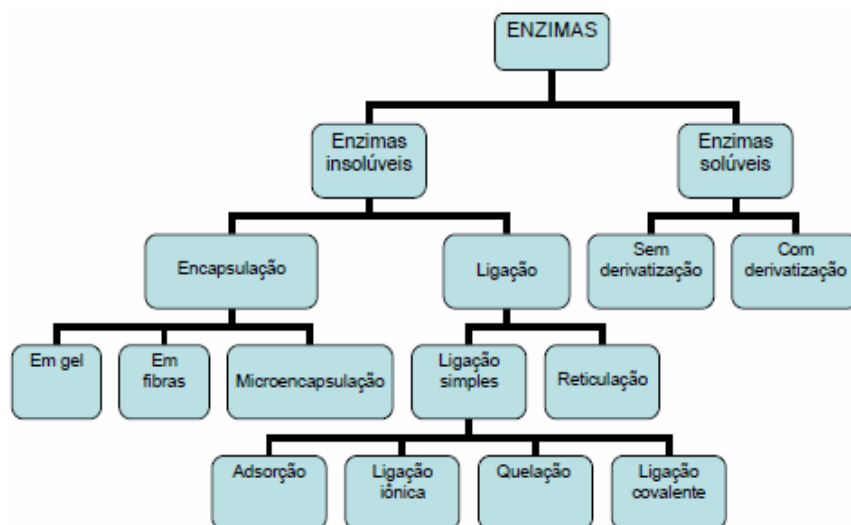


Figura 1 – Classificação dos métodos de imobilização enzimática (Zanin & Moraes, 2004).

A imobilização pode afetar a estabilidade, o pH e a temperatura ótima, as constantes cinéticas e a máxima velocidade de reação da enzima (Danisman *et al.*, 2004; Erginer *et al.*, 2000). A imobilização pode oferecer uma estabilidade adicional para uma variedade de enzimas sendo que esta estabilidade é influenciada pelo número de laços formados entre a enzima e o suporte, a natureza dos laços (covalentes, não-covalentes), o grau de aprisionamento das moléculas de enzima na matriz e as condições de imobilização (Danisman *et al.*, 2004; Cao, 2005).

As enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores de purificação. A imobilização enzimática permite a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade ao pH e à temperatura (Assis, 2004).

Como as enzimas não são consumidas na reação, sua ação catalítica é semelhante aos catalisadores inorgânicos. Porém, é diferente dos catalisadores sintéticos comuns pela forma amena que realiza a catálise, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambiente e, principalmente, com elevado grau de especificidade em relação ao substrato. O processo de imobilização tem sido bastante estudado para viabilizar o uso de enzimas industrialmente, permitindo a recuperação e o reaproveitamento da mesma, pois o uso da enzima livre é, em várias situações, inviável economicamente (Segel, 1979; Ribeiro, 1989; Coutinho Filho, 1996; Vicente, 2000).

Inúmeros métodos têm sido descritos na literatura para contornar os possíveis problemas de instabilidade da enzima livre, e otimizar as várias aplicações. As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos. A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Haider & Husain, 2009; Girelli & Mattei, 2005; Dalla-Vechia *et al.*, 2004; Vitolo, 2001).

3.3.1 Imobilização por envolvimento no interior de um suporte

Este método consiste na formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambos os casos, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Conseqüentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada. Este método inclui a encapsulação em gel e em fibras e a microencapsulação (Rosevear *et al.*, 1987).

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão,

embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem (Dalla- Vechia *et al.*, 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador. Há uma grande vantagem na utilização desta técnica; a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, como citado anteriormente, a desnaturação. Contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (Dalla-Vechia *et al.*, 2004, Mariotti, 2000).

3.3.2 Imobilização por ligação a um suporte via adsorção física

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros. O uso de suportes

porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A combinação de métodos de imobilização de enzimas é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade (Mateo *et al.*, 2006).

3.4 Suportes para a imobilização

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as alternativas à possibilidade de regeneração do material.

O processo de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, algumas vezes, requerem o uso de operações como filtração, centrifugação e agitação e, portanto, o suporte deve ter boa resistência mecânica. Outra característica importante é a estabilidade térmica do suporte, pois dependendo do seu coeficiente de expansão, podem sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração, quando submetido a variações de temperatura (Kennedy, 1987).

O suporte deve ser quimicamente resistente nas condições de ativação, durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação, deve possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la.

A natureza hidrofílica do suporte também deve ser levada em conta, pois são mais desejáveis suportes com características hidrofílicas de modo a se obter uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Os suportes de natureza hidrofóbica costumam diminuir a estabilidade e a atividade da enzima imobilizada por um mecanismo semelhante à desnaturação das enzimas em solventes orgânicos (Kennedy, 1987).

A morfologia do suporte é muito importante, pois o mesmo deve ter alta porosidade, o que permite ter uma grande área superficial interna para a

imobilização da enzima, e poros com diâmetro suficiente para permitir o fácil acesso da enzima e do substrato.

A resistência ao ataque microbiológico é mais um dos critérios na seleção do suporte, pois o mesmo deve resistir à degradação por micro-organismos, evitando a liberação da enzima para a solução.

A insolubilidade é uma característica essencial, não somente para prevenir a liberação da enzima do suporte, mas principalmente para evitar a contaminação do produto pelo suporte dissolvido e pela enzima.

A possibilidade de regeneração, bem como a reutilização da matriz, deve ser considerada na avaliação econômica do sistema com a enzima imobilizada. Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados).

Os suportes inorgânicos são os mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque por micro-organismos. Eles são de fácil regeneração por pirólise e apresentam boa rigidez da matriz, sendo estáveis em uma ampla faixa de pressões, temperaturas e pH. Entretanto, a maioria das enzimas imobilizadas comercializadas é obtida com matrizes orgânicas devido, provavelmente, à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos nesses suportes (Rodrigues *et al.*, 2008).

Os suportes mais estudados e utilizados são os derivados de polissacarídeos, especialmente os extraídos de algas, como agarose, alginato e K-carragenina. Também merecem destaque suportes orgânicos como celulose, quitina e quitosana (Krajewska, 2004).

3.5 Aplicações das enzimas imobilizadas

As enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens em relação às enzimas solúveis. Entre elas, pode-se citar a capacidade de reutilização da enzima, maior facilidade de separação do produto final, diminuindo as etapas posteriores de purificação do mesmo. A imobilização enzimática permite a operação contínua, facilita o controle da reação, reduz o volume desta e possibilita uma alta concentração catalítica no reator. A reação pode ser

interrompida no momento desejado pela simples remoção da enzima, em processos de batelada, ou pelo ajuste do tempo de residência, em reatores contínuos. O processo de imobilização ainda permite a modificação favorável das propriedades catalíticas de algumas enzimas, as quais passam a apresentar maior estabilidade ao pH e a temperatura (Assis, 2004).

O processo de imobilização enzimática teve início em 1916, quando Nelson & Griffin realizaram a adsorção da enzima invertase em carvão ativado, com retenção de sua atividade catalítica. Apesar desta descoberta, a primeira tentativa de imobilizar uma enzima, com a finalidade de melhorar suas propriedades, foi efetuada em 1953 por Grubhofer & Schleith, quando carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease foram imobilizadas em uma resina de poliaminopoliestireno diazotizada (Vicente, 2000).

A partir de 1960, foi observado um aumento progressivo nas publicações de trabalhos científicos com enzimas imobilizadas, refletindo o interesse mundial despertado por esta tecnologia. Entretanto, o primeiro processo industrial de imobilização enzimática foi implantando no Japão em 1969, para a produção de L-aminoácidos; seguido da aplicação de glicose-isomerase imobilizada, implantada nos Estados Unidos em 1972, para a isomerização de glicose em frutose. Desde então, novos processos de imobilização e novas aplicações industriais têm sido relatados na literatura (Zanin & Moraes, 2004).

Dentre as aplicações das enzimas imobilizadas em larga escala, pode-se citar a produção de xaropes de glicose e frutose a partir do amido de milho; a produção do ácido 6-amino penicilínico e penicilina semi-sintética, com a enzima penicilina-G ou L-acilase; produção de acrilamida empregando células imobilizadas; produção de aspartame com termolisina imobilizada; e a hidrólise de lactose presente no soro de leite (Zanin & Moraes, 2004).

Apesar do grande número de trabalhos publicados no campo da imobilização enzimática, poucos processos são aplicados em escala industrial. Tal fato deve-se ao elevado custo dos suportes e reagentes utilizados no processo de imobilização, baixa eficiência de retenção catalítica da maioria dos processos, baixa estabilidade operacional de muitas enzimas imobilizadas e equipamentos de operação contínua pouco versáteis. Além disso, a pequena

demanda do produto, normalmente, não incentiva a produção em larga escala (Zanin & Moraes, 2004).

3.6 Imobilização de inulinases

Como exposto anteriormente, com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional, e a imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente.

Ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens são eliminadas e as enzimas podem ser utilizadas nos processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos (Zanin e Moraes, 2004).

A literatura apresenta alguns estudos a respeito da imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes. Entre eles, podem ser citados os trabalhos de Paula (2008), o qual imobilizando a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando gelatina como suporte obteve uma alta taxa de imobilização, de 82,60%. A inulinase parcialmente purificada de *Kluyveromyces* sp. Y-85 foi imobilizada covalentemente em microesferas de polistireno (Wenling *et al.*, 1999) com retenção de 75% de sua atividade.

Risso (2004) utilizou as enzimas imobilizadas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571 visando à síntese dos frutooligossacarídeos. Bajpai & Margaritis (1987) realizaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* por ligação metálica, com 72% de retenção da atividade enzimática original. Com a finalidade de promover a bioconversão da inulina de *Helianthus tuberosus*, Gaspari *et al.* (1999) estudaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes, como quitina, alginato de sódio, pectina, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada (SPC). Os autores obtiveram a maior taxa de imobilização de 73U/g utilizando quitina com glutaraldeído. Um sistema de imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como

suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído foi avaliado por Barranco-Florido *et al.* (2001).

Outros trabalhos com estudos sistemas de imobilização de inulinase são reportados na literatura. Yun *et al.* (2000) avaliaram vários suportes na imobilização da inulinase de *Pseudomonas* sp. e encontraram os melhores resultados de eficiência e estabilidade operacional utilizando como suporte poliestireno. Após a imobilização da inulinase de *A. ficcum* em vidro poroso, por ligação covalente, utilizando reagentes de silanização e reticulação, Ettalibi & Baratti (2001) obtiveram alta estabilidade térmica e valores de 29% a 71% de proteínas aderidas ao suporte, conservando até 77,20% da atividade imobilizada. Kochhar *et al.* (1998), ao imobilizar a inulinase de *A. versicolor*, obtiveram 56% de retenção da atividade enzimática em quitina e 10% em caseína. Catana *et al.* (2005) avaliaram a influência da concentração do suporte alginato de sódio sobre o rendimento de imobilização de uma preparação de inulinase comercial de *A. niger* (Fructozyme L.) visando à hidrólise da sacarose e uma alta atividade foi encontrada na faixa de 50-60°C. A estabilidade da enzima comercial Fructozyme L. imobilizada em resina Amberlite IRC 50 foi estudada por Catana *et al.* (2007). Gill *et al.* (2006) imobilizaram a inulinase de *A. fumigatus* em resinas Dowex e Amberlite e obtiveram 63% e 39% de retenção da atividade enzimática, respectivamente. Em seus experimentos, ainda obtiveram total retenção enzimática ao imobilizar a inulinase em quitina e em matrizes de afinidade QAE-Sephadex e DEAE-Sephacel e Concanavalina A ligada a esferas de sílica amino-ativadas. Diferentes mecanismos de imobilização de proteínas utilizando como suportes de ativação glutaraldeído foram estudados por Betancor *et al.* (2006).

Uma completa inspeção da literatura permitiu observar que nenhum estudo é apresentado sobre a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Risso (2004) utilizou a enzima imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 visando somente à síntese dos frutooligossacarídeos, por isso nenhum enfoque foi dado em relação à imobilização da enzima.

3.7 Considerações Finais

Conforme apresentado no decorrer deste capítulo, alguns poucos relatos são encontrados na literatura a respeito da imobilização da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus*.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo abordar, de forma ampla, a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, onde os efeitos de parâmetros relevantes ao processo de imobilização, utilizando alginato de sódio e carvão ativado como suportes, serão investigados. A caracterização parcial dos extratos enzimáticos imobilizados também foi realizada visando à proposição de aplicabilidade industrial desta importante enzima para a área de alimentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental, relacionados à produção e otimização do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando alginato de sódio e carvão ativado como suportes. A metodologia empregada para a caracterização parcial do extrato enzimático imobilizado também será apresentada.

4.1. Produção da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

4.1.1 Micro-organismo

Na realização deste trabalho foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, fornecida pelo Departamento de Engenharia de Bioprocessos da UNICAMP. 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.

4.1.2 Pré-inóculo e substratos

O meio para o pré-inóculo era constituído de 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 melaço 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 Ltda (Erechim, RS), foi seco sob temperatura ambiente e triturado mecanicamente, de maneira a uniformizar o tamanho de partículas. A AMM foi adquirida da Corn Products Internacional – Mogi Guaçu (SP); o melaço de cana foi adquirido na Refinaria Éster – Campinas (SP) e 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 melaço 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.

4.1.3 Produção de inulinase por fermentação batelada simples (FBS)

A produção de inulinase foi realizada por FES usando estratégia de fermentação batelada simples (FBS). A fermentação foi realizada em biorreator de leito fixo com capacidade útil de 3 kg de bagaço de cana, o mesmo foi conectado a um umidificador de ar o qual fornece ar com umidade relativa de 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 nas condições do processo. 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 20 min. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo correspondente a 14 g de massa inicial de células (Mazutti *et al.*, 2010). O experimento foi conduzido por 24 h e após 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 e proteína foram determinadas do extrato enzimático, após a filtração dos sólidos. O extrato enzimático bruto, foi utilizado em todos os experimentos de imobilização enzimática.

4.2 Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

4.2.1 Suportes para imobilização

Como suportes e coadjuvantes para imobilização da inulinase foram utilizados:

- Carvão ativado Alpha LA 810, umidade máxima 8%, granulometria 325 mesh, cinzas típicas 5%, pH alcalino (Alphacarbo);
- Carvão ativado Pelegrini Carbon, umidade inferior a 5%, granulometria 12x40 mesh, cinzas típicas máximo 5%, pH 7 a 10 (Pelegrini Carbon);
- Carvão ativado Pelegrini Carbon, umidade inferior a 5%, granulometria 20x40 mesh, cinzas típicas máximo 5%, pH 7 a 10 (Pelegrini Carbon);
- Alginato de Sódio (Vetec, Cinética);
- Glutaraldeído 25% em água (Nuclear, Vetec);
- Sacarose (Fmaia, Vetec).

4.2.2 Equipamentos

Para a imobilização da inulinase foi utilizada uma bomba peristáltica modelo 7518-10, marca Masterflex L/S.

4.2.3 Procedimento experimental para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Para o processo de imobilização, inicialmente foi preparada uma solução de gel, contendo água destilada e alginato de sódio, os quais foram aquecidos em microondas, até total dissolução. Em seguida, foi adicionada a sacarose. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados o extrato enzimático com atividade pré-estabelecida, o glutaraldeído e o carvão ativado (Risso, 2004). Com uma bomba peristáltica (Figura 2), o gel foi bombeado em uma solução contendo tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,2 M com 3,5% de glutaraldeído, em banho de gelo, sob agitação. Após a imobilização, as enzimas permaneceram nesta mesma solução em tratamento na geladeira por 24 h. Após cessado o tempo de tratamento, as enzimas foram lavadas com água destilada e tampão acetato pH 4,8 0,1 M. Em seguida, foram imersas em uma solução de tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,05 M para manter sua estrutura original.



Figura 2 - Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.

4.3 Determinação da atividade enzimática da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Substrato

- Tampão acetato pH 4,8 com 2% de sacarose.

Reagentes

- DNS (ácido 3, 5 dinitrosalicílico);
- Tartarato de Sódio e Potássio (15,1 g/L).

Equipamentos

- Espectrofotômetro marca Agilent 8453.

4.3.1 Determinação da atividade do extrato enzimático bruto

A atividade enzimática do extrato enzimático bruto foi determinada adicionando-se 0,5 mL da solução de extração adequadamente diluída em 4,5 mL de uma solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 com 2% (p/v) de sacarose. Após diluída, a solução foi mantida a 50 °C, por 10 min (Mazutti *et al.*, 2006). A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), onde 0,5 mL da amostra anterior

foram diluídos em 0,5 mL de DNS e mantidos por 5 min em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados na amostra 8 mL de tartarato de sódio e potássio em banho de gelo. Para cada amostra foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por mL de extrato enzimático bruto (U/mL). Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima liberar 1 $\mu\text{mol/mL}$ de frutose por minuto. Os resultados foram expressos em unidade de atividade (U) da inulinase, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

4.3.2 Determinação do teor de proteína do extrato enzimático bruto

A proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, após 2 min da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford. A concentração de proteína foi expressa em mg/mL.

4.3.3 Determinação da atividade da enzima inulinase imobilizada

A atividade enzimática da enzima inulinase imobilizada foi determinada adicionando-se 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) em uma proveta de 25 mL, completando-se a mesma com uma solução de tampão acetato 0,1 M, pH 4,8 com 2% (p/v) de sacarose. Após diluição a solução foi mantida a 50°C, por 10 min. A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), onde 0,5 mL da amostra anterior foram diluídos em 0,5 mL de DNS e mantidos por 5 min em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio em banho de gelo. Para cada amostra foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em

unidade de atividade (U) da inulinase, definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

4.3.4 Determinação do teor de proteína da enzima inulinase imobilizada

A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. As enzimas imobilizadas (esferas) foram esmagadas para liberação da proteína. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, após 2 min da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford. A concentração de proteína foi expressa em mg/mL.

4.3.5 Determinação da atividade específica no extrato enzimático bruto e na enzima inulinase imobilizada

A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade do extrato enzimático bruto pela proteína determinada. Para a enzima imobilizada, o mesmo procedimento foi utilizado. A atividade específica (AE) foi expressa em unidade de atividade (U) por miligrama (mg) de proteína.

4.4 Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Para a imobilização do extrato enzimático bruto de inulinase foi utilizada a metodologia de Risso (2004), onde diferentes suportes de carvão ativado foram avaliados, em diferentes vazões. A quantidade de água destilada utilizada foi de 16,5 mL, concentração de alginato de sódio 0,75 g, sacarose 12,5 g, 5 mL de solução enzimática, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado para cada experimento.

Os seguintes carvões ativados e vazões da bomba foram utilizados:

- Carvão ativado Alpha LA 810, Pelegriini 12x40 e Pelegriini 20x40.
- Vazões: 2, 51 e 100 mL/min.

4.5 Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada

Os tempos reacionais para determinação da atividade DNS da enzima imobilizada foram testados utilizando o extrato enzimático bruto imobilizado conforme metodologia de Risso (2004) no suporte de carvão ativado Alpha LA 810.

Diferentes diluições de enzima imobilizada:substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% (p/v) sacarose (medidas em proveta) foram testadas a fim de se obter uma diluição adequada para medida da atividade em espectrofotômetro.

As seguintes diluições de enzima imobilizada:substrato foram avaliadas:

- 4 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 4 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% de sacarose até completar 16 mL.
- 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% de sacarose até completar 18 mL.
- 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% de sacarose até completar 25 mL.
- 1 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% de sacarose até completar 50 mL.
- 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% de sacarose até completar 50 mL.

Amostras foram retiradas nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e foi medida a atividade conforme método citado anteriormente para determinação da atividade da enzima imobilizada.

4.6 Otimização das condições de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Na determinação das condições para otimização da imobilização do extrato enzimático de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central, e mais uma triplicata do ponto central sem a adição de sacarose, totalizando 14 experimentos. Nesta etapa, a quantidade de água foi fixada em 10 mL para 3 mL de solução enzimática e sacarose a 50% em relação ao total de água e solução enzimática, para todos os experimentos. As faixas de concentração dos suportes alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado estudadas são apresentadas na Tabela 1.

Os experimentos foram realizados conforme procedimento experimental descrito anteriormente, onde os suportes foram adicionados no processo de imobilização nas quantidades estabelecidas no planejamento de experimentos. Após o processo de imobilização foram medidas a atividade enzimática e o teor de proteína, conforme procedimento descrito anteriormente.

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Variáveis/Níveis	Alginato de Sódio (% m/v)	Glutaraldeído (% v/v)	Carvão Ativado (%m/v)
-1	2	5	3
0	5	10	5
1	8	15	7

4.7 Estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Após a otimização das condições de imobilização da enzima inulinase, um estudo cinético foi realizado a fim de avaliar a eficiência do processo de imobilização no tempo de 24 h de tratamento da enzima em geladeira. A condição experimental utilizada foi a otimizada no primeiro planejamento

experimental. Foram medidas a atividade enzimática e o teor de proteína da solução onde a enzima imobilizada permaneceu em tratamento e da enzima imobilizada nos tempos de 0, 30 min, 4, 8, 12 e 24 horas.

4.8 Caracterização parcial da enzima inulinase imobilizada

O estudo de caracterização parcial da enzima inulinase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizado em termos de temperatura, pH e estabilidade térmica da enzima imobilizada.

4.8.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da inulinase imobilizada

Para o estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática realizou-se um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 10 min e as faixas de pH (com adição de 2% de sacarose) e temperatura estudadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para determinação da temperatura e pH ótimos da inulinase imobilizada.

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

4.8.2 Efeito da estabilidade da inulinase imobilizada

A estabilidade da enzima inulinase imobilizada foi avaliada mantendo-se a enzima imobilizada em uma solução de tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,02 M em temperatura ambiente (25°C) e em geladeira (4°C). A estabilidade térmica da inulinase imobilizada foi testada incubando a enzima na solução de tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 e cloreto de cálcio 0,02 M nas

temperaturas 40; 50; 60 e 70 °C. As amostras de enzimas imobilizadas foram retiradas em determinados intervalos de tempo, e foram medidas a atividade enzimática e teor de proteína.

Os dados obtidos em todas as etapas do estudo de otimização e caracterização foram calculados em termos de atividade específica. Os dados obtidos nos planejamentos de experimentos foram tratados estatisticamente com auxílio do Software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando carvão ativado e alginato de sódio como suportes, conforme já descrito no capítulo anterior, bem como resultados da caracterização da enzima imobilizada.

5.1 Testes preliminares para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Nesta etapa foram realizados experimentos preliminares relacionados à seleção do carvão ativado e vazão da bomba, caracterização dos suportes e da inulinase imobilizada, determinação do tempo reacional e diluição adequada da enzima imobilizada a serem aplicados para a obtenção de dados visando à otimização do processo de imobilização empregando a técnica do planejamento de experimentos.

Em todas as amostras foram medidas a atividade enzimática pelo método DNS e teor de proteínas pelo método de Bradford. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados em termos de atividade específica.

As medidas de atividade e proteína de cada lote do extrato bruto da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foram realizadas anteriormente a cada processo de imobilização.

5.1.1 Seleção do suporte de carvão ativado e vazão da bomba a serem utilizados na imobilização da inulinase

Realizou-se, primeiramente, um teste a fim de avaliar a eficiência de diferentes carvões ativados na imobilização da inulinase e a eficiência da vazão da bomba no processo de imobilização.

Os resultados obtidos seguindo metodologia descrita anteriormente para imobilização de inulinase, com os respectivos tipos de carvões ativados e vazões da bomba utilizadas são apresentados na Tabela 3.

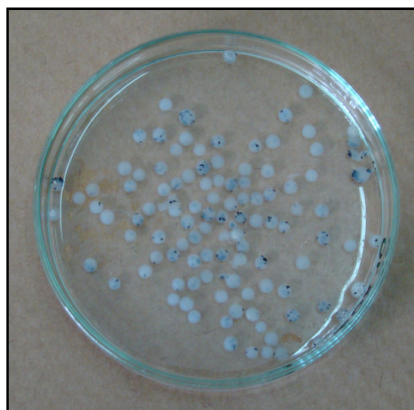
Tabela 3 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando diferentes carvões ativados e vazões de bomba.

Carvão ativado	Vazão da bomba (mL/min)	Atividade enzimática (U/mL)	Teor de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
Alpha LA 810	2	101,70	0,0672	1512,77
	51	123,16	0,0565	2179,98
	100	112,03	0,0601	1865,025
Pelegriini 12x40	2	5,58	0,0068	819,34
	51	44,59	0,0137	3266,59
	100	25,72	0,0145	1771,05
Pelegriini 20x40	2	32,48	0,0067	4856,22
	51	13,82	0,0128	1078,35
	100	49,03	0,0057	8659,28
Extrato Bruto	-	70,01	0,4185	167,31

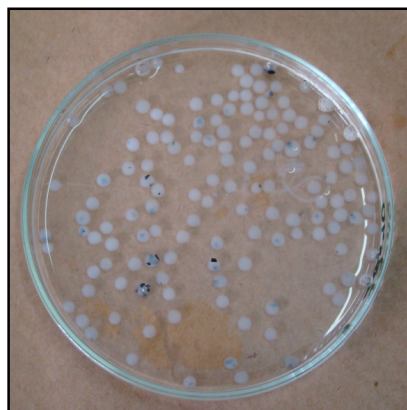
A condição experimental utilizada neste teste preliminar de imobilização foi a mesma condição otimizada por Risso (2004), a qual imobilizou a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, utilizando 16,5 mL de água destilada, 0,75 g de alginato de sódio, 12,5 g de sacarose, 5 mL de solução enzimática, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado.

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que o extrato bruto imobilizado utilizando o suporte carvão ativado Pelegriini (20x40) (Figura 3a), nas vazões de 2 e 100 mL/min apresentou as maiores atividades específicas (4856,22 e 8569,29 U/mg de proteína, respectivamente). Uma alta atividade específica também foi observada com carvão ativado Pelegriini (12x40) (Figura 3b) na vazão de 51 mL/min (3266,59 U/mg proteína). Apesar dos carvões ativados Pelegriini apresentarem maiores atividades específicas para o extrato bruto imobilizado, sua granulometria original não permitia a boa consecução do processo, principalmente em termos do entupimento causado na bomba, além do mesmo não ficar uniformemente distribuído em todas as esferas

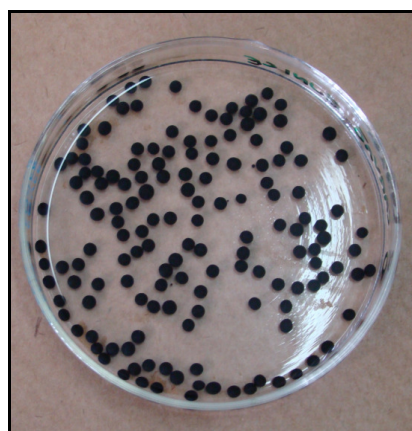
imobilizadas. O carvão ativado Alpha LA 810, em forma de pó (Figura 3c), apesar de na vazão de 2 mL/min apresentar menor atividade específica (1512,77 U/mg proteína) foi o que promoveu melhor gotejamento da solução de imobilização, resultando em esferas uniformes e facilitando a consecução dos experimentos, tendo sido, portanto, escolhido para ser utilizado em todos os demais experimentos de imobilização enzimática.



(a)



(b)



(c)

Figura 3 – Testes preliminares para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando Carvão Pelegrini 20x40 (a), Carvão Pelegrini 12x 40 (b) e Carvão Alpha LA 810 (c).

5.1.2 Caracterização dos suportes utilizados na imobilização e da inulinase imobilizada em diferentes suportes de carvão ativado e alginato de sódio

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio foram determinadas as seguintes propriedades dos suportes carvão ativado utilizados na imobilização, bem como da inulinase imobilizada nos diferentes suportes: diâmetro médio do poro (determinado pelo modelo BJH); V_{BJH} (volume dos poros, determinado pelo modelo BJH) e A_{BET} (área superficial determinada pela isoterma BET). O resultado da caracterização é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização dos suportes e inulinase imobilizada em diferentes suportes por análise de BET.

Suporte/enzima imobilizada	Diâmetro de poro (nm)	Volume de poro (ml/g)	Área superficial BET (m^2/g)
Carvão ativado Alpha LA 810	274	$4,50 \times 10^{-1}$	656
Carvão ativado Pelegrini 12x40	214	$2,48 \times 10^{-1}$	464
Carvão ativado Pelegrini 20x40	216	$2,50 \times 10^{-1}$	463
Inulinase imobilizada Alginato + Alpha LA 810	366	$4,49 \times 10^{-2}$	48,88
Inulinase imobilizada em alginato + Pelegrini 12x40	501,2	$9,26 \times 10^{-2}$	73,89
Inulinase imobilizada em alginato + Pelegrini 20x40	472	$7,98 \times 10^{-2}$	67,47
Novozyme 435	15	5×10^{-1}	130

Através da Tabela 4 pode ser observado que a inulinase imobilizada nos carvões ativados Alpha LA 810, Pelegrini 12X40 e Pelegrini 20X40, juntamente com o suporte alginato de sódio apresenta diâmetro de poro maior se comparado com o diâmetro de poro da lipase comercial Novozym 435 (15,0 nm) dados do fabricante. Este fator pode ter determinado as altas atividades da inulinase imobilizada em comparação com a enzima livre, obtidos neste trabalho. Elevadas áreas superficiais dos suportes, sendo a maior encontrada no carvão Alpha LA 810 ($656 \text{ m}^2/\text{g}$), o qual também justifica a seleção deste carvão para todos os experimentos de imobilização. Os altos valores de área superficial, comparando com vários suportes testados e apresentados na

literatura (Scherer, 2010) podem ter influenciado positivamente na eficiência do processo de imobilização.

5.1.3 Determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada

Para determinação do tempo reacional ideal para medida da atividade da enzima imobilizada, amostras da inulinase imobilizada no carvão Alpha LA 810, o qual foi selecionado nos testes preliminares, foram retiradas nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e foi medida a atividade, conforme método para determinação da atividade da enzima imobilizada (DNS), descrito anteriormente.

No teste utilizando as diferentes diluições enzima imobilizada:substrato tampão acetato, a condição avaliada utilizando 2 mL de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 mL de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% de sacarose até completar 25 mL (em proveta), apresentou melhores resultados, com valores dentro dos limites da faixa da curva de calibração. Através das medidas de absorbância em espectrofotômetro verificou-se que o tempo de 10 min foi o ideal para a medida da atividade da enzima imobilizada, pois apresentou maior atividade na faixa de tempo estudada. Os resultados das atividades (U/mL) obtidos em relação ao tempo, juntamente com as diferentes diluições testadas, são apresentados no Apêndice I.

Com base nos resultados obtidos, o tempo de 10 min e a diluição enzima imobilizada:substrato (2 mL enzima completando-se em proveta até 25 mL com substrato tampão acetato pH 4,8 0,1 M 2% sacarose) foram fixados para todos os experimentos de medida da atividade da inulinase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

5.2 Otimização das condições de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

Nesta etapa avaliou-se o efeito da concentração de alginato de sódio (AS), glutaraldeído (G) e carvão ativado (CA) na imobilização da inulinase de

Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571. Nesta etapa, a quantidade de água adicionada foi fixada em 10 mL, a quantidade de enzima livre em 3 mL e da sacarose em 50% em relação ao total de água e solução enzimática para todos os experimentos. A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento, com triplicata do ponto central (ensaio 9, 10 e 11) e mais triplicata do ponto central sem a adição de sacarose (ensaio 12, 13 e 14) com os valores codificados e reais, e as respostas para atividade de inulinase, teor de proteína e atividade específica. A partir desta tabela pode-se observar que foram obtidas diferentes atividades específicas em função dos níveis estudados neste planejamento experimental para cada variável independente avaliada.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade de inulinase, teor de proteína e atividade específica.

Ensaio	Alginato de sódio (%m/v)	Glutaraldeído (%v/v)	Carvão ativado (%m/v)	Atividade de inulinase (U/mL)	Teor de proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
1	-1 (2)	-1 (5)	-1 (3)	145,61	0,0706	2063,52
2	+1 (8)	-1 (5)	-1 (3)	36,64	0,0657	557,96
3	-1 (2)	+1 (15)	-1 (3)	150,99	0,0825	1829,61
4	+1 (8)	+1 (15)	-1 (3)	49,33	0,0620	796,08
5	-1 (2)	-1 (5)	+1 (7)	123,36	0,0872	1414,44
6	+1 (8)	-1 (5)	+1 (7)	65,30	0,0870	750,85
7	-1 (2)	+1 (15)	+1 (7)	142,12	0,0866	1640,54
8	+1 (8)	+1 (15)	+1 (7)	66,76	0,0827	807,43
9	0 (5)	0 (10)	0 (5)	109,09	0,0760	1436,02
10	0 (5)	0 (10)	0 (5)	101,05	0,0813	1242,26
11	0 (5)	0 (10)	0 (5)	131,31	0,0791	1660,93
12	0 (5)	0 (10)	0 (5)	28,93	0,0835	346,57
13	0 (5)	0 (10)	0 (5)	24,86	0,0884	281,36
14	0 (5)	0 (10)	0 (5)	27,10	0,0881	307,48
Extrato bruto				34,50	0,4361	79,10

Verifica-se que o maior valor de atividade específica da inulinase imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi obtida nos menores níveis de concentração de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado, correspondente ao ensaio 1 do planejamento de experimentos, conduzindo a valores de atividade específica de 2063,52 U/mg proteína. Pode-se verificar também que menores atividades específicas foram observadas nos ensaios 12, 13 e 14, os quais foram realizados sem a adição de sacarose, assim como nos ensaios 2, 4, 6 e 8, onde foram utilizadas maiores concentrações do suporte alginato de sódio.

Os resultados obtidos nos ensaios 1 a 11 do planejamento experimental foram estatisticamente analisados, e foram estimados os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de t e p, apresentados na Tabela 6. Os resultados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em função da concentração de alginato de sódio, o qual está apresentado na Equação 1. Para validação do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 7. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,94) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validou estatisticamente o modelo ($p < 0,05$), e permitiu a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão para a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(4)	P
Média	1290,879	73,705	17,51	0,000062
(1) Alginato sódio	-504,473	86,427	-5,84	0,004294
(2) Glutaraldeído	35,861	86,427	0,41	0,699487
(3) Carvão ativado	-79,238	86,427	-0,92	0,411112
Interação 1 x 2	37,815	86,427	0,44	0,684313
Interação 1 x 3	130,298	86,427	1,51	0,206140
Interação 2 x 3	34,808	86,427	0,40	0,707730

* efeitos significativos a $p < 0,05$.

$$\text{Atividade específica da inulinase imobilizada (U / mg proteína)} = 1290,879 - 504,474.AS + 35,861.G - 79,238.CA + 37,815.AS.G + 130,298.AS.CA + 34,808.G.CA \quad (1)$$

Tabela 7 - Análise de variância para imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	2253414	6	375569	6,28
Residual	239030	4	59757,5	
Total	2492444	10		

R = 0,94; $F_{0,05, 6,4} = 6,16$.

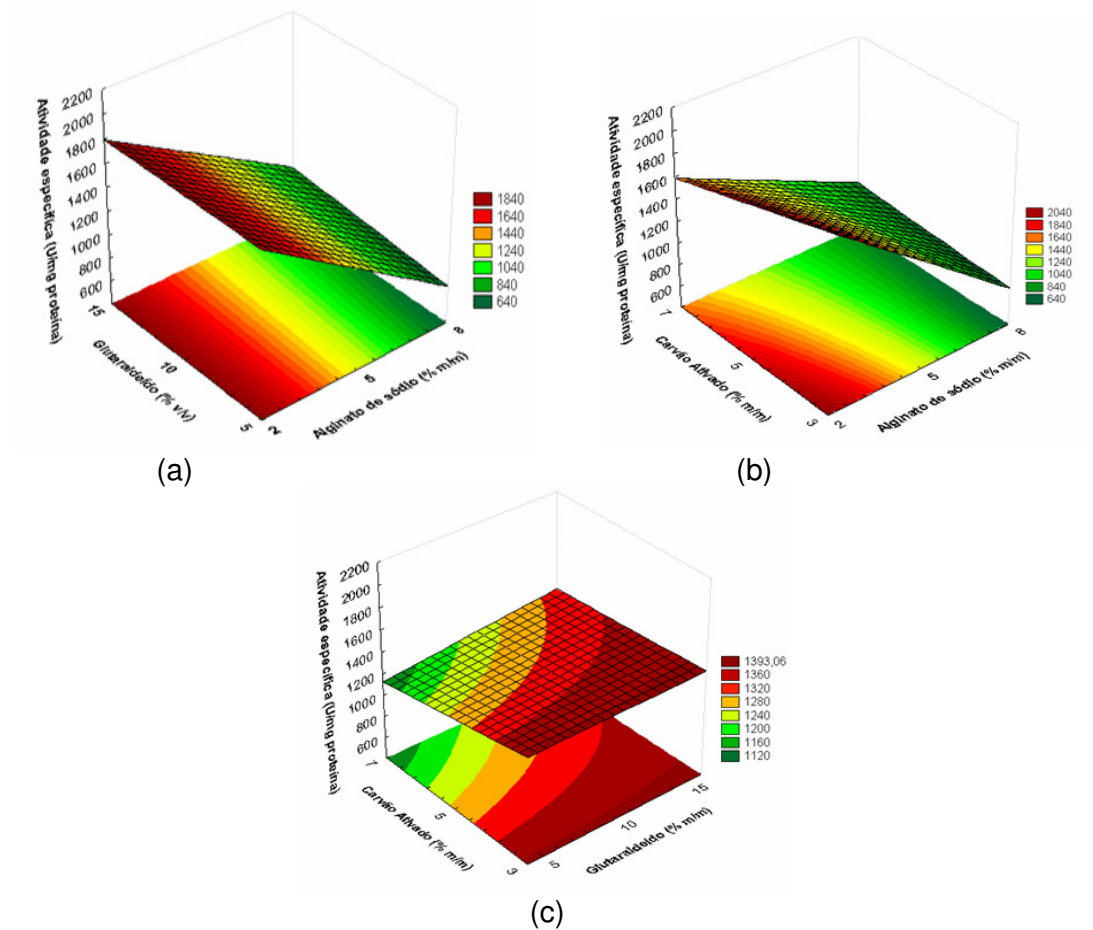


Figura 4 - Superfícies de respostas para a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em função da concentração de alginato de sódio e glutaraldeído (a), de alginato de sódio e carvão ativado (b) e glutaraldeído e carvão ativado (c).

O efeito da concentração do suporte alginato de sódio na imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 pode ser visualizado na Figura 4 (a) e (b), onde nas menores concentrações de alginato de sódio maiores atividades específicas foram obtidas.

Através da Figura 4 (a) nota-se que na mais baixa concentração de alginato de sódio estudada, a concentração de glutaraldeído não influenciou no processo de imobilização, porém concentrações mais altas de alginato de sódio na faixa de concentração de glutaraldeído estudada conduziram a menores atividades específicas. O mesmo resultado pode ser visualizado na Figura 4 (c), onde a concentração de glutaraldeído não influenciou no processo de imobilização, porém concentrações mais altas de carvão ativado na faixa de concentração de glutaraldeído estudada conduziram a menores atividades específicas.

Paula (2007), imobilizando a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em carvão ativado, obteve atividade específica de 0,34 UA/mg de proteína. Gaspari *et al.* (1999) estudaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. em diferentes suportes, onde o substrato foi convertido no gel com eficiência de 26% utilizando como suportes alginato de sódio com glutaraldeído. Barranco-Florido *et al.* (2001) avaliaram um sistema de imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído e obtiveram até 85% de atividade residual após cinco ciclos de utilização das células para a reação de hidrólise de inulina.

Outros sistemas enzimáticos foram também imobilizados utilizando alginato de sódio como suporte. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Silva *et al.* (2008), os quais imobilizaram enzimas amilase de malte de milho por oclusão em alginato de sódio utilizando metodologia de planejamento de experimentos para otimização do processo. Melhores resultados foram obtidos quando as soluções de malte de milho foram imobilizadas utilizando duas faixas de concentração, uma entre 3,75-5 g/L e outra entre 15-16,25 g/L, com pH do meio entre 4,83 e 6,6, utilizando 4% (m/v) de alginato de sódio. Day *et al.* (2003) atingiram um rendimento de cerca de 75% na imobilização de α -

amilase de uma linhagem de *Bacillus circulans* GRS313 utilizando alginato de sódio como suporte.

5.3 Estudo cinético da eficiência do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571

A avaliação cinética do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizada a partir dos resultados obtidos na condução do planejamento de experimentos. O estudo cinético foi realizado no tempo de 24 horas de tratamento da enzima imobilizada em geladeira. A condição experimental utilizada foi a otimizada no primeiro planejamento, o ensaio 1, o qual apresentou a maior atividade específica (2063,52 U/mg de proteína). Foram medidas as atividades enzimática e específica da enzima imobilizada ao longo do período de armazenamento (24 horas) em geladeira. A enzima foi mantida, durante este período em solução tampão acetato pH 4,8 0,1 M e cloreto de cálcio 0,02 M. Aliquotas foram retiradas nos tempos de 0, 30 min, 4, 8, 12 e 24 horas. A Figura 5 apresenta o comportamento da atividade específica ao longo das 24 horas, medida na enzima imobilizada e na solução que a continha.

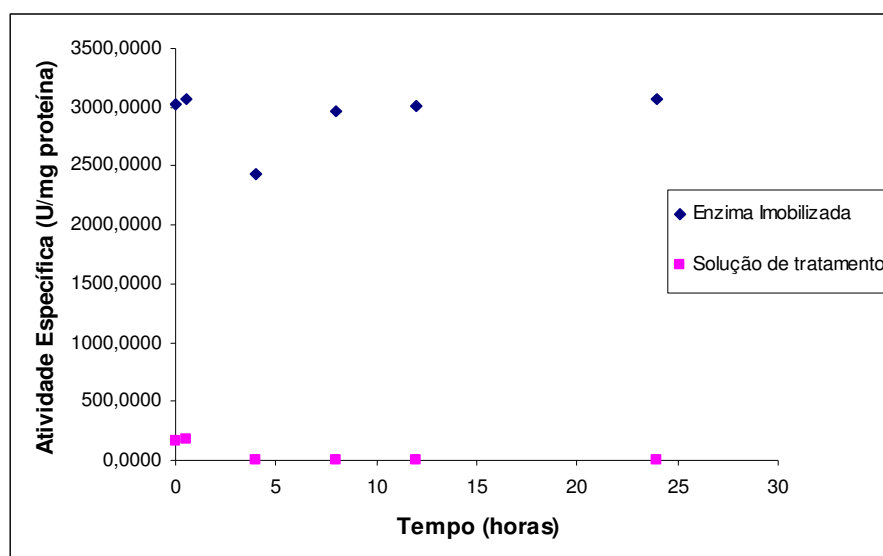


Figura 5 – Cinética do processo de imobilização – atividade específica da enzima imobilizada e da solução de tratamento da enzima.

A partir da Figura 5 pode-se observar para a enzima imobilizada uma atividade específica inicial de 3020,96 U/mg de proteína, com uma diminuição no tempo de 4 horas de imobilização, aumentando no tempo de 6 horas e permanecendo constante até 24 horas, apresentando atividade específica final de 3067,92 U/mg de proteína. Para a solução de tratamento da enzima, pode-se verificar valores insignificantes de atividade específica nos tempos de 0 e 30 minutos, zerando a partir de 4 horas em tratamento na geladeira. A observação da figura permite verificar que toda a enzima livre foi imobilizada no suporte proposto após um tempo de 24 horas de tratamento em geladeira, confirmando que a metodologia empregada foi eficiente no processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, conduzindo a rendimentos de imobilização da ordem de 100%. Scherer (2010) estudou a imobilização de lipase de pâncreas de porco utilizando diferentes suportes inorgânicos e obteve maior rendimento de imobilização (38,23%) utilizando argila Poço A pilarizada como suporte. Paula (2007) estudou a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em diferentes suportes e obteve eficiência de imobilização de 2,25% utilizando carvão ativado como suporte, 3,04% carvão ativado tratado com etanol, 16,98% com o suporte de sílica de porosidade controlada e o caldo de imobilização parcialmente purificado, e 82,60% de eficiência de imobilização utilizando gelatina. Utilizando diferentes estratégias de imobilização em suportes orgânicos quitosana e agarose, com diferentes protocolos de ativação. Vieira (2009) estudou a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* e obteve rendimento de imobilização de 100% por adsorção iônica da enzima em MANAE-Agarose, com drástica redução da atividade hidrolítica do derivado após o entrecruzamento com polialdeído dextrana e glutaraldeído. O mesmo autor estudou a imobilização da β -galactosidase por ligação covalente em quitosana coagulada e obteve maior atividade catalítica em solução 0,5 M de KOH a 50°C e ativado com glutaraldeído 0,8% (v/v), com atividade recuperada e rendimento de imobilização de 100%.

5.4 Caracterização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada

Conforme mencionado no capítulo referente à Revisão Bibliográfica, existem dois grandes problemas associados à aplicação industrial de inulinasas 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 inulinasas 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 inulinasas termoestáveis (Gill *et al.*, 2006).

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 algum substratos, e podem também reduzir a formação de cor em alguns xaropes (Vandamme & Derycke, 1983).

5.4.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática realizou-se um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), com 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 10 minutos e as faixas de pH (com adição de 2% de sacarose) e temperatura estudadas são apresentadas na Tabela 8.

Neste estudo, a condição utilizada na imobilização do extrato bruto foi a condição otimizada no primeiro planejamento, o ensaio 1, o qual apresentou maior atividade específica.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8, o qual mostra que a maior atividade específica ocorreu ensaio 5, com pH 4,5 e temperatura de

55°C (1531,71 U/mg de proteína), seguida pelos ensaios 8 e 3, respectivamente, com pH 5,0 e 4,6 e temperatura de 70 e 65,6°C.

Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², (valores codificados e reais) com as respostas em termos de atividade enzimática, teor de proteína e atividade específica da inulinase imobilizada.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de inulinase (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
1	4,6 (-1)	44,4 (-1)	44,22	0,0664	666,01
2	5,4 (1)	44,4 (-1)	55,98	0,0664	843,09
3	4,6 (-1)	65,6 (+1)	78,50	0,0664	1182,26
4	5,4 (1)	65,6 (+1)	69,62	0,0664	1048,65
5	4,5 (-1,41)	55,0 (0)	101,70	0,0664	1531,71
6	5,5 (+1,41)	55,0 (0)	51,49	0,0664	775,55
7	5,0 (0)	40 (-1,41)	53,72	0,0664	809,02
8	5,0 (0)	70 (+1,41)	99,45	0,0664	1497,94
9	5,0 (0)	55,0 (0)	52,76	0,0664	794,64
10	5,0 (0)	55,0 (0)	46,21	0,0664	695,97
11	5,0 (0)	55,0 (0)	51,76	0,0664	779,66
Extrato bruto	4,8	50	17,00	0,4299	39,55
Inulinase imobilizada	4,8	50	67,83	0,0664	1021,63

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram estatisticamente analisados e o gráfico de Pareto (Figura 6) apresenta o efeito das variáveis pH e temperatura na atividade enzimática nas faixas estudadas.

Através da Figura 6 verifica-se que a temperatura apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$), mostrando que uma maior temperatura poderia resultar em uma maior atividade específica para a enzima inulinase imobilizada.

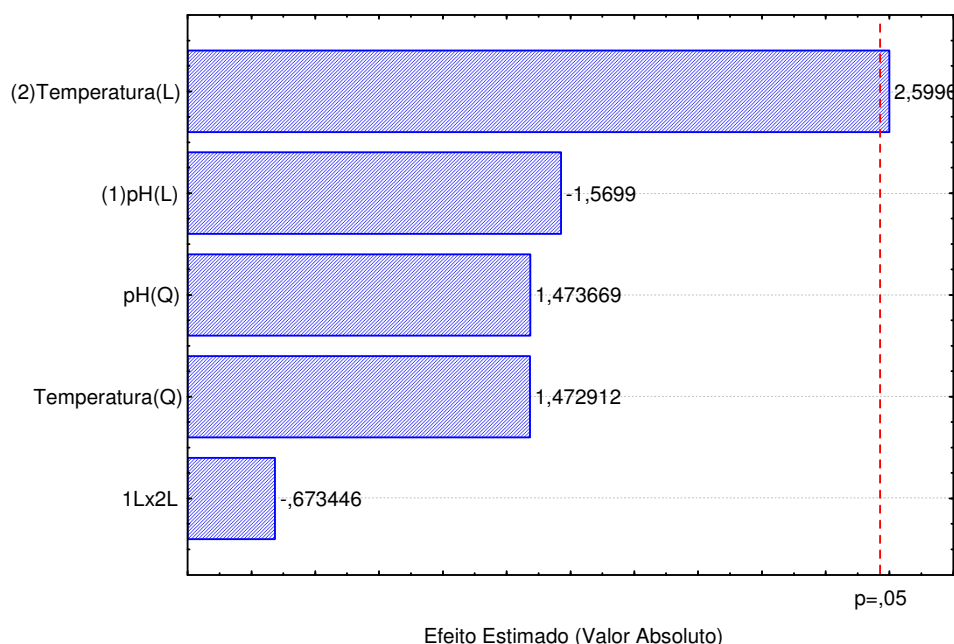


Figura 6 – Gráfico de Pareto do efeito da temperatura e pH na atividade da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

O efeito do pH sobre a atividade da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em gelatina foi avaliado por Paula *et al.* (2008), na faixa de 2,5-8,0, onde um ótimo de atividade enzimática foi encontrado a pH 3,5. Os mesmos autores avaliaram o efeito da temperatura na atividade da inulinase imobilizada e obtiveram maior atividade a 60°C. Ettalibi & Baratti (2001) obtiveram valor de pH ótimo de 5,0 para a atividade da inulinase imobilizada de *A. ficuum* em vidro poroso. Weling *et al.* (1999) encontraram um pH ótimo de 5,0, na temperatura de 50°C, na atividade da enzima imobilizada de *Kluyveromyces* sp. Y-85. Catana *et al.* (2005) obtiveram temperatura ótima de 60°C para a inulinase comercial Fructozyme L imobilizada em alginato de cálcio. Rocha *et al.* (2006) encontraram atividade máxima da inulinase imobilizada de *A. niger* a uma temperatura de 50°C.

5.4.2 Estabilidade térmica da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada

A viabilidade dos processos de biotransformação é largamente dependente da manutenção da atividade do biocatalisador em função do

tempo. A desativação térmica do biocatalisador é uma das principais causas do decaimento da atividade, deste modo, a avaliação da estabilidade térmica do biocatalisador é uma questão fundamental para a efetiva caracterização de um sistema de bioconversão (Catana *et al.*, 2007).

A seguir são apresentados os comportamentos de estabilidade da inulinase imobilizada em temperatura de geladeira (5°C), a temperatura ambiente (25°C), e a estabilidade térmica na temperatura de 40°C. As estabilidades foram testadas com as enzimas mantidas na solução de tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 e cloreto de cálcio 0,02 M. Amostras de enzimas imobilizadas foram retiradas em determinados intervalos de tempo para determinação da atividade enzimática e do teor de proteína. Os resultados possibilitaram o cálculo da atividade específica.

Nas Tabelas 9, 10 e 11 são apresentados os valores de atividade específica da enzima imobilizada em função do tempo nas temperaturas de geladeira (5°C), temperatura ambiente (25°C) e estabilidade térmica a 40°C, respectivamente.

Tabela 9 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 5°C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	165,12	0,1861	887,19
2	128,86	0,1860	692,83
4	109,01	0,1666	654,17
6	110,65	0,1634	677,20
12	111,95	0,1486	753,47
24	125,60	0,1912	656,97
36	193,24	0,2034	950,07
48	190,96	0,2011	949,77
72	187,49	0,2000	937,36
96	162,72	0,1968	826,98
144	135,41	0,1756	771,13
192	161,87	0,1981	817,23
360	173,06	0,2154	803,39
528	148,57	0,2475	600,38
696	134,32	0,1630	823,80
1032	162,68	0,1865	872,22
Extrato Bruto	34,94	0,4413	79,16

Tabela 10 – Estabilidade da inulinase imobilizada a 25 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	139,56	0,0859	1625,63
2	136,17	0,0984	1383,14
4	163,99	0,1059	1549,25
6	168,77	0,1086	1554,32
12	157,87	0,1057	1493,24
24	136,68	0,1078	1267,86
36	146,38	0,1016	1441,28
48	131,25	0,0953	1376,82
72	158,65	0,1155	1374,02
96	160,17	0,1177	1361,16
144	150,97	0,1146	1317,87
192	151,14	0,0871	1734,87
360	145,90	0,1194	1222,43
528	132,48	0,1073	1234,21
696	167,13	0,1355	1233,34
1032	154,85	0,1258	1231,29
Extrato Bruto	30,01	0,3264	91,94

Tabela 11 – Estabilidade térmica da inulinase imobilizada a 40 °C.

Tempo (h)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (U/mg proteína)
0	125,66	0,1565	802,91
2	168,08	0,1726	973,78
4	147,16	0,1585	928,76
6	142,58	0,1446	986,35
12	150,50	0,1617	930,78
24	152,66	0,1546	987,73
36	158,16	0,1707	926,44
48	155,18	0,1779	872,52
72	160,56	0,2079	772,24
96	156,01	0,2053	759,96
144	153,36	0,2229	688,04
192	151,98	0,1942	782,63
360	152,95	0,2058	743,09
528	175,63	0,2764	635,34
696	184,85	0,2395	771,78
1032	190,68	0,2290	832,53
Extrato Bruto	24,64	0,3296	74,76

Através do estudo de estabilidade térmica pode ser observado que nas temperaturas de 5°C e 40°C (Tabelas 9 e 11), até o tempo avaliado de 1032 horas, a inulinase imobilizada manteve-se estável, sem perda de atividade específica. Na temperatura de 25°C (Tabela 10) nota-se que no tempo de 1032 horas ocorreu uma leve perda na atividade específica.

A estabilidade térmica da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em gelatina foi avaliada por Paula *et al.* (2008), nas temperaturas de 45, 50 e 55°C, as quais apresentaram, após 24 horas de reação, atividades residuais de 78,02%, 79,14% e 60,45%, respectivamente. Barranco-Florido (2001) estudou um sistema imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído, onde a enzima imobilizada foi termoestável em temperaturas entre 45° e 65°C. Bajpai & Margaritis (1987) relataram estabilidade da atividade enzimática de células imobilizadas de *K. marxianus* nas temperaturas de 50 a 60°C. O efeito da estabilidade térmica da inulinase imobilizada de *Kluyveromyces* sp. Y-85, em diferentes temperaturas por 24 horas foi relatada por Wenling *et al.* (1999), onde enzima imobilizada manteve 95% de sua atividade original a 50°C.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

Neste trabalho foi estudada a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y - 7571 bem como a influência das variáveis no processo de imobilização e posterior caracterização.

O presente trabalho permitiu avaliar a influência da concentração do alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado no processo de imobilização.

- A condição otimizada para imobilização da inulinase com atividade específica de 2063,52 U/mg proteína foi obtida no ensaio 1 do planejamento 1 na concentração de alginato de sódio de 2% (m/m), 5% (v/v) de glutaraldeído e 3% (m/m) de carvão ativado.

- Na avaliação da eficiência do processo de imobilização realizado no tempo de 24 horas de tratamento da enzima imobilizada em geladeira, verificou-se rendimento de imobilização de 100%, avaliados através das medidas da atividade específica na solução de tratamento e na enzima imobilizada.

- Na avaliação do efeito do pH e temperatura observou-se que o pH, na faixa estudada (4,5 – 5,5), não apresentou efeito significativo ($p < 0,05$). Por outro lado, a temperatura, apresentou efeito positivo significativo ($p < 0,05$), na faixa estudada, demonstrando característica de termoestabilidade para a inulinase imobilizada.

- Na avaliação da estabilidade térmica em geladeira (5°C), a temperatura ambiente e 40°C, pôde-se notar que a inulinase imobilizada manteve sua atividade enzimática estável no período de tempo avaliado (1032 h), nas três temperaturas estudadas.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- ✓ Estudo da solubilidade do suporte da inulinase imobilizada na condição experimental selecionada em função do processo utilizado.
- ✓ Utilização de outros suportes e/ou metodologias de imobilização para fins de comparação com os dados obtidos neste trabalho.
- ✓ Aplicação das enzimas imobilizadas na catálise de reações de interesse na indústria de alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, S.A.; FERNANDES, P.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Screening of supports for the immobilization of pectinmethylesterase from acerola (*Malpighia glabra* L.). Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Oxford, v.79, p. 277-280, 2004.

BAILEY, J.F.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, 2^a edição. Mc Graw-Hill Inc. N. York, 1986.

BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. Characterization of molecular-sieve bound inulinase. Journal of Fermentation Technology, Osaka, v. 65, p. 239-242, 1987.

BARRANCO-FLORIDO, E.; GARCÍA-GARIBAY, M.; GÓMES-RUIZ, L.; AZAOLA, A. Immobilization system of *Kluyeromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. Process Biochemistry, p. 513-519, 2001.

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

BETANCOR L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; M.; DELLAMORA-ORTIZ CEZAR MATEO, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p. 877-882, 2006.

BRADFORD, M. Analytical Biochemistry. v.72, p. 248-254, 1976.

BYUM, S.M.; NAHM, B.H. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, Chigaco, v. 43, p. 1871-1873, 1978.

CAO, L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, 2005.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.

CATANA, R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Immobilization of inulinase for sucrose hidrolisis. *Food Chemistry*, v. 91, p. 517-520, 2005.

CATANA, R.; ELOY, M.; ROCHA, J.R.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M.S.; FERNANDES, P. Stability evaluation of na immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, v.101, p.260-266, 2007.

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.

CORTEZ, G.; TRUJILLO-ROLDAN, M.A.; RAMIREZ, O.T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Process Biochemistry*, London, v. 40, p. 773-778, 2005.

COUTINHO FILHO, U. Contribuição ao Estudo de Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 1996.

CRUZ-GUERRERO, A.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, London, v. 34, p. 621-624, 1999.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

DANISMAN, T.; TAN, S.; KACAR, Y.; ERGENE, A. Analytical, Nutritional and Clinical Methods: Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membrane. *Food Chemistry*, v. 27, 2004.

DAY, G.; SINGH, B.; BANERJEE, R. Immobilization of α -Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n. 2, p. 167-177, 2003.

ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. *Reactive & Functional Polymers*, v. 45, p. 227-233, 2000.

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

FLEMING, S.E.; GROOTWASSINK, J.W.D. Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v. 11, p. 1-28, 1979.

GALVÃO, C.M.A. Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Lático usando Tripsina e Quimiotripsina Imobilizadas em diferentes suportes. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCAR), 2004.

GASPARI, J. W.; GOMES, L.H.; TAVARES, F. C.A.; Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. Scientia Agrícola, v.56, n.4, p. 1135-1140, 1999.

GIACOMMINI C., IRAZOQUI G., BATISA – VIEIRA F., BRENA B. M. influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. Journal Molecular Catalysis. B: Enzymatic, v. 11, p. 597-606, 2001.

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, 2006.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. Journal of Chromatography B, p. 3-16, 2005.

GROOTWASSINK, J.W.D.; HEWITT, G.M. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulinase) in batch and continuous culture of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. Journal of General Microbiology, Edinburgh, v. 129, p. 31-41, 1983

GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAGGCL, Y. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. Reactive & Functional Polymers, v. 57, p. 57-65, 2003.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 172-177, 2009.

HANOVER, L.; WHITE, J. Manufacturing, composition and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 5, p. 724-732, 1993.

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.

ISIK, S.; ALKAN, S. TOPPARE, L. CIANGA, I.; YAGGCL, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2—(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. *European Polymer Journal*, v. 39, p. 2375-2381, 2003.

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.

KENNEDY J. F. & CABRAL J. M. S. Enzyme Immobilization - in *Biothecnology*, v. 7a, p. 347 – 404, 1987.

KIM, W.Y.; BYUN, S.M.; NAHM, B.H. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *Korean Journal of Food Science Technology*, Seoul, v. 11, p. 238-290, 1979.

KIM, W.Y.; BYUN, S.M.; UHM, T.B. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on amino ethyl cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v 4, p. 239-244, 1982.

KIM, D.H.; RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 11, p. 201-206, 1989.

KIRBY, D.K.; DAVIES, R. Thiol induced release of invertase from cell walls of *Saccharomyces fragilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Baltimore, v. 201, p. 261-266, 1970.

KOCHHAR, A.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. Inulinase from *Aspergillus versicolor*. A potent enzyme for producing fructose from inulin. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 56, p. 721-726, 1998.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126-139, 2004.

KUSHI, R.T.; HOJO, O.; TREVISAN, H.C.; MONTI, R.; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, São Carlos. *Anais XI SINAFERM*, p. 309, 1996.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, L.J.; CARRASCOSA, V.A. PESSELA, C.C.B.; GARCIA-OCHOA. Studies on the activity and the stability of β -Galactosidases from *Thermus* sp. Strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 392-405, 2002.

MANZONI, M.; CAVAZZONI, V. Hidrolysis of *Topinambur* (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.54, p. 311-315, 1992.

MARIOTTI, P. M. Hidrólise de lactose de soro de leite por meio de β -galactosidase imobilizada. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

MATEO, C.; PESSELA, C.C.B.; FUENTES, M.; TORRES, R.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, M.J. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Second edition, p. 129-136, 2006.

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. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.85, p. 109-114, 2010.

MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugarcane 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 and Biosystems Engineering*, v. 30, p. 297-304, 2007.

MEDEIROS, J.; KALIL, S.J.; COSTA, F.; NAKASHIMA, E.B.; CABRAL, A.S.; ZAVICKIS, F.P.; SILVA, J.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Estudo da Influência da Concentração de Substrato, pH e Temperatura na Determinação da Atividade Enzimática da Inulinase, Florianópolis. *Anais ENPROMER*, p.350-351, 1999.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-429, 1959.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York: W. Publishers, 2000. p. 243-288, 2000.

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

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology, V. 27, n. 3-5, p. 187-204, 2000.

PANDEY, A. Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13:81-4, 2003.

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

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fruttooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. Ciência Rural, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PAULA, A. V.; BARBOSA, C. S.; CASTRO. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. Química Nova, v. 28, p. 792-796, 2005.

PAULA, F. C. Imobilização da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e Produção de Açúcar Invertido em Biorreator. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2007.

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.

REGULY, C.J. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas-RS: Editora Universitária - UFPel, S.A., 222p, 2000.

RIBEIRO, E. J. Estudo Cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Univerdade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.

RISSO, F. V. A. Síntese de oligossacarídeos em meio orgânico e aquoso utilizando-se inulinase livre e imobilizada produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 E NRRL Y-7571. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

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.

RODRIGUES, S. D.; MENDES, A. A.; ADRIANO, S. W.; GONÇALVES, B. R. L.; GIORDANO, C. R. L. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 51, p. 100-109, 2008.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. Immobilized enzymes and cells. Bristol, Adam Hilger, 1987.

ROUWENHORST, R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.A.; DJKEN, J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 11, p. 3337-3345, 1990.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 1-9, 2004.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purifications strategies for microbial lipases. Journal Microbiology Methodology, v.52, p.1-18, 2003.

SCHERER, R.P. Estudo da imobilização de lípase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Ciências Agrárias, 2010.

SEGEL, I. H. Bioquímica, Teoria e Problemas. Traduzido Grassiano D. M. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora, 1979.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. Biotechnology Advances, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, R. L.F.O.B.; SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.C.; TAMBOURGI, E.B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, p. 642-648, 2008.

SNYDER, H.E.; PHAFF, J.H. Studies on a β -fructosidase produced by *Saccharomyces fragilis*. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 26, p. 433-452, 1960.

SNYDER, H.E.; PHAFF, J.H. The pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 237, p. 2438-2441, 1962.

UHM, T.B.; CHUNG, M.S.; LEE, S.H.; GOURRONC, F.; HOUSEN, I.; KIM, J.H.; VAN BEEUMEN, J.; HAYE, B.; VANDENHAUTE, J. Purification and Characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. In: Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Tokyo, v. 63, p. 146-151, 1999.

VANDAME, E.; DERYCKE, D. Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications. Advances in Applied Microbiology, San Diego, 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.

VIEIRA, D.C. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, 2009.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.9, p. 113-148, 2000.

VISWANATHAN, P.; KULKARNI, P.R. *Saussurea lappa* (kuth) as a new source of inulin for fermentative production of inulinase in a laboratory stirred fermenter. *Bioresource Technology*, Essex, v. 52, n. 2, p. 181-184, 1995.

VITOLO, M.; Imobilização de Enzimas. IN: Lima, U.A.;Aquarone, E.;Borzani, W.;Schmidell, W.; *Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, v.3, p. 391-403, 2001.

WENLING, W.; HUIYING, W.W.L.; SHIYUAN, W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 643-646, 1999.

WINGARD JR., L.B. Enzyme engineering: a new area of specialization. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, n. 3, p. 3-13, 1972.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. The cell wall associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 50, p. 353-394, 1984.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. *Enzymes and Microbial Technology*, v.19, p.107-117, 1996.

YUN, J.W.; PARK, J.P.; SONG, J.P.; LEE, C.Y.; KIM, J.H.; SONG, S.K. Continuous production of inulo-oligosaccharides from chicory juice by immobilized endoinulinase. *Bioprocess Engineering*, New York, v. 22, p. 189-194, 2000.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; Enzimas imobilizadas in: *Enzimas como agentes biotecnológicos*, Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa. 2004.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 35-86

APÊNDICE I

Nas Tabelas 1 a 5 são apresentados os resultados experimentais obtidos na determinação do tempo reacional e diluição adequada para medida da atividade da enzima imobilizada com o carvão Alpha LA 810.

Tabela 1 – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 4 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 4 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1M 2% de sacarose até completar 16 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	1,1396	71,101
20	1,2221	38,124
30	1,2505	26,006
40	1,2577	19,617
50	1,2556	15,667
60	1,2581	13,082

Tabela 2 – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 2 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1M 2% de sacarose até completar 18 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,2567	35,035
20	0,4623	32,448
30	0,7388	34,568
40	1,0178	35,719
50	1,1841	33,244
60	1,2036	28,160

Tabela 3 – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 2 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1M 2% de sacarose até completar 25 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,2910	56,737
20	0,4879	47,563
30	0,7555	49,102
40	0,9490	46,244
50	1,0416	40,619
60	1,1022	35,818

Tabela 4 – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 1 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1M 2% de sacarose até completar 50 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,1310	102,165
20	0,3039	118,503
30	0,3269	84,981
40	0,5865	114,350
50	0,7603	118,589
60	0,7716	100,293

Tabela 5 – Atividade em função do tempo, na diluição utilizando 2 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 2 ml de água) adicionando-se o substrato tampão acetato pH 4,8 0,1M 2% de sacarose até completar 50 ml, na imobilização com o carvão ativado Alpha LA 810.

Tempo (min)	Abs (nm)	Atividade (U/mL)
10	0,1416	55,228
20	0,3325	64,834
30	0,5035	65,454
40	0,6479	63,323
50	0,7682	59,911
60	0,8811	35,601