

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA 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 SUPORTE INORGÂNICO

CHALINE CAREN COGHETTO

ERECHIM, RS - BRASIL

JUNHO 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 SUPORTE INORGÂNICO

CHALINE CAREN COGHETTO

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.

ERECIM, RS - BRASIL

JUNHO DE 2011

IMOBILIZAÇÃO DA INULINASE DE
***Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571**
EM SUPORTE INORGÂNICO

CHALINE CAREN COGHETTO

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^ª. Dra. Débora de Oliveira
Orientadora

Prof^ª. Dra. Helen Treichel
Orientadora

Prof^º. Dr. Rafael Costa Rodrigues
(ICTA-UFRGS)

Prof^º. Dr. Rogério Dallago
(URI-Campus de Erechim)

Erechim, 07 de Junho 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.

Aos meus pais Sonimar e Eliane por terem me apoiado incondicionalmente em todas as minhas decisões, sem hesitar. Por todo amor e carinho, sempre me auxiliando e aconselhando, por me oferecer a mais sincera amizade que já conheci. Com todo meu amor, carinho e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível. Agradeço-lhe todos os dias por existir e poder participar de valiosos momentos, assim como este, onde devo simplesmente agradecer.

À minha família, em especial aos meus pais Sonimar e Eliane pelo imenso apoio em todos os momentos.

Ao Rafael, pelo amor, carinho, respeito, amizade e, sobretudo pela compreensão da ausência neste período de tempo.

Às minhas orientadoras Débora de Oliveira e Helen Treichel por permitir que fizesse parte de seu grupo de pesquisa, pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência e compreensão.

Aos colegas: Fabiele, Juliana, Débora, Letícia, Rosicler, Guilherme, Helmut, Angelise, Douglas, Emanuel pela amizade e companheirismo mostrados em momentos bons e/ou nem tão bons assim.

À amiga Marceli, por tudo o que ela me ensinou, ajudou desde os primeiros dias no laboratório até os últimos, sempre incansável me atendia e respondia minhas incansáveis dúvidas, sempre, mas sempre disposta a ajudar. Agradeço, pelas risadas, pelas palavras de incentivo nos momentos complicados. Simplesmente muito obrigado por tudo!!!

Aos amigos dos laboratórios que de uma forma ou outra sempre me ajudaram: Simone, Silvana, Mara, Sheila, Graciele, Viviane, Sandy, Robinho, Jamile, Jonaina, Aline, Luciane, Patrícia, Diane, Vinicius.

A todos que de alguma forma 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 SUPORTE INORGÂNICO

CHALINE CAREN COGHETTO

Junho/2011

Orientadoras: Débora de Oliveira
 Helen Treichel

A utilização da enzima inulinase teve início com a descoberta de sua habilidade em hidrolisar a inulina, um polímero vegetal, em frutose praticamente pura. As inulinases são geralmente termoestáveis e comercialmente viáveis para aplicações industriais. No entanto, uma produção contínua de frutose requer a utilização de uma inulinase imobilizada. 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 argila montmorillonita Poço A como suporte inorgânico. Foram realizados testes preliminares para a verificação da melhor relação enzima:tampão no processo de imobilização e, após, utilizou-se a estratégia de planejamento de experimentos visando otimizar o processo, onde foram avaliados os efeitos do tempo (0 a 120 minutos) e a relação enzima:tampão. O resultado obtido na razão enzima:tampão de 3:10 e 10 minutos de reação conduziu à maior atividade específica, correspondendo a 233,17U/mg proteína. A partir desta condição o estudo da caracterização parcial da inulinase imobilizada foi realizado avaliando-se os efeitos do pH (3,5-5,5) e da temperatura (40 a 70°C) e a estabilidade ao armazenamento a baixas temperaturas (4, -10 e -80°C). De forma geral, os resultados obtidos na caracterização permitiram concluir que a inulinase imobilizada manteve sua atividade enzimática estável no período de tempo avaliado de 1968 horas para as baixas temperaturas e para as altas de 456 a 1826 horas. O pH de 3,5 conduziu à maior atividade específica da enzima imobilizada. As constantes cinéticas foram determinadas utilizando sacarose e inulina como substratos. Valores de K_m de 1,46 e 0,38 mM, e $v_{m\acute{a}x}$ de 0,2487 e 0,2396 mol/L.min, foram obtidos, respectivamente, para sacarose e inulina.

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 INORGANIC SUPPORT**

CHALINE CAREN COGHETTO

June/2011

Advisors: Débora de Oliveira
 Helen Treichel

The use of inulinases began with the discovery of their ability in hydrolyzing the substrate inulin, a plant polymer, in almost pure fructose. The inulinases are generally thermostable and commercially available for industrial applications. However, a continuous production of fructose requires the use of immobilized inulinases. The strains of *Kluyveromyces* sp. have achieved emphasis for the production of this enzyme. The main disadvantage of using soluble enzymes as industrial catalyst is their low stability. To overcome this problem, the enzymes immobilization has been purposed. Based on these aspects, the objective of this work was to investigate the process of immobilization of inulinases from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using natural montmorillonite as inorganic support. Preliminary tests were carried out to establish the best enzyme:buffer ratio for the immobilization process. Following, the strategy of experimental design was used to optimize the process, evaluating the effect of time of immobilization (0 to 120 minutes) and the enzyme:buffer ratio. The enzyme to buffer ratio of 3:10 and 10 minutes of immobilization led to the highest specific activity, 233,17U/mg protein. From this condition, the partial characterization of the immobilized catalyst was carried out, evaluating the effects of pH (3,5-5,5) and temperature (40 to 70°C), the stability of the enzyme to the storage at low temperatures (4, -10 and -80°C). In a general way, the results obtained in this step permitted to conclude that the immobilized inulinase kept its activity after 1968 hours under storage at low temperatures and after 456 to 1826 hours at high temperatures. The pH value of 3.5 led to the highest specific activity. The kinetic constants were determined using sucrose and inulin as substrates. K_m values of 1.46 and 0.38 mM, and $v_{m\acute{a}x}$ of 0.2487 and 0.2396mol/L.min, were obtained, respectively, for sucrose and inulin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Inulinases	4
3.1.1 Aplicações das inulinases	5
3.2 Imobilização enzimática	7
3.2.1 Imobilização por ligação a um suporte via adsorção física.....	11
3.3 Suportes para a imobilização	12
3.4 Aplicações das enzimas imobilizadas	14
3.5 Imobilização de inulinases.....	15
3.6 Considerações Finais.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Enzima	18
4.2 Suporte.....	18
4.3 Equipamentos	18
4.4 Imobilização de inulinase	19
4.5 Otimização do processo de imobilização	20
4.6 Métodos empregados durante o processo de imobilização.....	21
4.6.1 Determinação do teor de proteínas da enzima imobilizada.....	21
4.6.2 Determinação da atividade da enzima imobilizada.....	21
4.6.3 Determinação do rendimento de imobilização.....	22
4.6.4 Determinação do percentual de retenção.....	22
4.6.5 Determinação da atividade específica no extrato enzimático bruto e na enzima imobilizada.....	23
4.7 Caracterização parcial da inulinase imobilizada.....	23
4.7.1 Estabilidade térmica da enzima imobilizada.....	23
4.7.2 Estabilidade da enzima imobilizada em baixas temperaturas	23
4.7.3 Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada	24
4.8 Determinação de k_m e $v_{máx}$	24
4.9 Caracterização do suporte e enzima imobilizada	24

4.9.1 Difração de Raios-X	24
4.9.2 Análise Textural por Adsorção de N ₂	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Caracterização do suporte montmorillonita poço A.....	26
5.1.1 Difração de Raio X do suporte	26
5.1.2 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio do suporte	27
5.2 Testes preliminares para imobilização da inulinase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571.....	28
5.2.1 Seleção da relação enzima/tampão a ser utilizada na imobilização de inulinase	28
5.3 Otimização do processo de imobilização	30
5.4 Comportamento da inulinase em contato com o suporte montmorillonita poço A	33
5.4.1 Difração de Raio X	33
5.4.2 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio da enzima imobilizada.....	34
5.5 Estabilidade térmica da enzima imobilizada.....	34
5.6 Estabilidade da inulinase imobilizada em baixas temperaturas.....	37
5.7 Efeito do pH na estabilidade da inulinase imobilizada.....	39
5.8 Determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max}	40
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	45
6.1 Conclusões.....	45
6.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação dos métodos de imobilização enzimática.....	10
Figura 2 - Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.....	19
Figura 3 - Enzima imobilizada em argila poço A após 48 horas em dessecador.	20
Figura 4 - Difrátograma de Raio X da argila Poço A.	27
Figura 5 - Gráfico de Pareto do efeito da relação enzima/suporte e do tempo no processo de imobilização.	31
Figura 6 - Cinética de adsorção de inulinase em poço A na relação 3:10.....	31
Figura 7 - Difrátogramas de Raio X da inulinase livre, argila montmorillonita Poço A natural e inulinase imobilizada em argila montmorillonita natural Poço A.....	33
Figura 8 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 40°C.....	36
Figura 9 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 50°C.....	36
Figura 10 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 60°C.....	37
Figura 11 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 70°C.....	37
Figura 12 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 4°C.....	38
Figura 13 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a -10°C.....	39
Figura 14 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a -80°C.....	39
Figura 15 - Influência do pH na estabilidade da inulinase imobilizada.	40
Figura 16 - Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para sacarose.	43
Figura 17 - Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para inulina.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para determinação do tempo e relação enzima/tampão da inulinase imobilizada.	21
Tabela 2 - Área superficial específica (BET) do suporte.	27
Tabela 3 - Atividade enzimática específica da enzima livre e imobilizada.....	29
Tabela 4 - 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....	30
Tabela 5 - Área superficial específica (BET) do suporte e enzima imobilizada.	34
Tabela 6 - Atividade enzimática em função da concentração da sacarose [S].	41
Tabela 7 - Atividade enzimática em função da concentração da inulina [I].....	42
Tabela 8 - Valores de k_m e v_{max} obtidos para hidrólise de sacarose e inulina na enzima livre e imobilizada.	43

1. INTRODUÇÃO

As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em micro-organismos. Todas as enzimas são proteínas tendo como papel funcional catalisar reações em organismos vivos, ou seja, aumentar a velocidade de uma reação química em relação a uma reação não catalisada (Voet *et al.*, 2000).

Devido ao aprimoramento das técnicas de produção, extração e purificação, houve um aumento significativo da utilização de enzimas microbianas, sendo estas empregadas atualmente nas indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentícia.

As enzimas de origem microbiana têm a capacidade de sintetizar compostos, realizar bioconversão e hidrolisar polímeros de interesse econômico (Vandamme & Derycke, 1983).

A inulinase é uma enzima importante no processamento de alimentos, usada principalmente para sintetizar frutooligossacarídeos (FOS), que apresenta propriedades funcionais e pode ser produzida a partir da sacarose por transfrutossilação, catalisada pela enzima β -frutotransferase (Risso *et al.*, 2009; 2010). Esta enzima é termoestável e comercialmente viável para aplicações industriais. Entretanto, uma produção contínua de frutose requer a utilização de uma inulinase imobilizada.

A frutose obtida desta hidrólise representa uma opção segura como adoçante se comparada à sacarose, sendo largamente utilizada na indústria de alimentos. Devido à configuração espacial, os oligossacarídeos apresentam resistência à atividade hidrolítica das enzimas digestivas intestinais, sendo fermentados por bactérias (*Bifidobacterium*), produzindo ácidos graxos de cadeia curta e gases, além de aumentar a energia metabólica, crescimento e proliferação dessas bactérias (Roberfroid, 2002). Tendo em vista estas propriedades particulares, os oligossacarídeos são classificados como prebióticos.

As inulinases obtidas por leveduras mais investigadas são aquelas produzidas por *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*). Estas leveduras são consideradas ideais na produção de inulinases, pois crescem rapidamente em altas concentrações celulares e produzem grandes quantidades desta enzima.

A estabilização das enzimas representa uma característica importante do ponto de vista econômico. A utilização deste biocatalisador na forma solúvel pode conduzir à perda de capacidade catalítica em ensaios em batelada, tornando difícil seu reuso. Além disso, a presença de enzima residual no meio reacional pode se constituir em contaminação indesejável (Villeneuve *et al.*, 2000; Sebrão *et al.*, 2007; Dumitriu *et al.*, 2003).

A imobilização de enzimas em suportes inertes que não causem danos à atividade enzimática pode assegurar seu uso em diversas bateladas, resultando em economia para processos industriais (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). As principais vantagens das enzimas imobilizadas são relacionadas às suas maiores estabilidades e facilidade de separação do meio reacional (Bon *et al.*, 2008). A literatura é relativamente escassa em relação à imobilização de inulinases, sobretudo em suportes inorgânicos (neste caso, argilas). O desenvolvimento deste trabalho visa preencher uma importante lacuna encontrada na literatura, vislumbrando a aplicação industrial deste importante biocatalisador na área de alimentos.

2. OBJETIVOS

Com base nas colocações apresentadas anteriormente, este trabalho tem como objetivo geral a avaliação do processo de imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em suporte inorgânico.

Baseando-se no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Desenvolvimento de metodologia para imobilização da inulinase utilizando argila montmorillonita poço A como suporte;
- Caracterização morfológica do suporte utilizado e da enzima imobilizada;
- 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, estabilidade ao armazenamento e determinação das constantes cinéticas (K_m e $v_{m\acute{a}x}$) sobre os substratos sacarose e inulina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre a 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. Uma visão geral da literatura específica de inulinases e caracterização parcial de enzimas também será apresentada.

3.1 Inulinases

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

As inulinases foram descobertas por Lindner, em 1900, que observou a capacidade de utilização de inulina por cepas de leveduras *Kluyveromyces marxianus*. Desde então o seu estudo prende a atenção de cientistas, focando objetivos relacionados à indução, síntese, isolamento, mecanismos de reação e propriedades de inulinases produzidas, tanto por vegetais como por micro-organismos (Vandamme e Derycke, 1983).

As inulinases são obtidas a partir de leveduras, fungos, bactérias e de plantas (Manzoni e Cavazzoni, 1992). A enzima sintetizada a partir de *Kluyveromyces marxianus* está entre as mais estudadas devido ao fato de possuir boa atividade sobre os substratos sacarose e inulina (Kushi *et al.*, 1996).

As inulinases microbianas são classificadas de acordo com seu modo de ação. As exo-inulinases (2,1 β -D-frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.80) são específicas para a hidrólise de inulina e quebram as ligações entre as unidades de frutose que estão localizadas longe das extremidades da rede de polímero, para a produção de oligossacarídeos. As endo-inulinases (β -D-frutano-frutanohidrolase; EC 3.2.1.7) agem de forma randômica sobre o acoplamento

interno na molécula de inulina, liberando 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).

FOS são classificados como prebióticos e são usados como alimentos funcionais, devido aos seus efeitos benéficos na proliferação de bifidobactérias no cólon humano. São produzidos industrialmente por dois caminhos diferentes, levando a diferentes produtos. O primeiro processo produtivo baseia-se na degradação de inulina, quando os produtos apresentam cadeias mais longas fructooligomeros. O segundo processo utiliza a transformação de sacarose pela enzimas frutossiltransferases ou inulinase de leveduras, bactérias e fontes fúngicas (Risso *et al.*, 2009; 2010).

3.1.1 Aplicações das inulinases

As inulinases apresentam algumas características que determinam as suas aplicações, como a especificidade, atividade, estabilidade ao armazenamento e uso, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é determinada pela sua concentração e a do seu substrato, concentração de co-fatores, efeitos alostéricos, presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação. Atualmente, a maior aplicação de inulinase está focada na 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). As inulinases comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria-prima com um alto valor agregado. A inulina é largamente utilizada como fonte de carbono para a produção de inulinase, juntamente com outros substratos, dentre eles, derivados de inulina, amidalina, arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, melesitose, metanol, rafinose, salicina e amido (Contiero, 2004).

Tendo em vista as várias restrições médicas que apresentam os adoçantes dietéticos, a frutose transformou-se em uma alternativa viável por

ser um monossacarídeo natural com inúmeras vantagens em relação a outros adoçantes. A frutose possui um poder adoçante até 1,5 vezes maior, comparado à sacarose (Hanover e White, 1993), utilizada em menores quantidades, reduzindo o consumo de calorias, contribuindo para a diminuição da hiperglicemia, sendo assim, mais tolerada por diabéticos. Este açúcar também vem sendo utilizado na produção de confeitos, devido ao seu elevado poder higroscópico; na indústria de sorvetes, para evitar a textura granular provocada pela cristalização da lactose (Vicente, 2000) e quando adicionada em muitos adoçantes sintéticos, como a sacarina, mascara o sabor residual amargo provocado por esta substância (Vandamme e Derycke, 1983).

Como fontes naturais de frutose pode-se citar o mel, as frutas, raízes (como a beterraba) e 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 (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 interfere nas etapas posteriores de purificação do produto final (Verachtert e De Mot, 1990). 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).

Conforme Sangeethaa *et al.*, (2005), as inulinases também são aplicadas na produção de FOS, pois apresentam cerca de um terço do poder adoçante

da sacarose e não são calóricos, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos.

Os autores acima complementam ainda que, a inulina e a oligofructose apresentam importantes benefícios nutricionais, aumentam a vida útil e perfil de sabor de vários produtos alimentares, como barras de cereais, sorvetes, geléias *light*, balas e chocolates. Também substituem carboidratos e geram produtos de teor reduzido de açúcar e de baixo valor energético (Sangeethaa *et al.*, 2005).

3.2 Imobilização enzimática

Enzimas imobilizadas são conceituadas como “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida de espaço, com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. O termo enzima imobilizada foi utilizado pela primeira vez na Conferência de Engenharia Enzimática, em Hennicker, New Hampshire, Estados Unidos, em 1971 (Goulart, 2007).

O processo de imobilização enzimática teve início em 1916, quando Nelson e 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 e 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 implantado 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 e Moraes, 2004).

A imobilização de biocatalisadores representa uma alternativa altamente viável devido à possibilidade de utilização prática em bioprocessos, tornando estes biocatalisadores estáveis, de fácil manuseio quando comparados a suas formas livres e podendo ser usados repetidamente em processos em batelada ou em fluxo contínuo.

Vários métodos de imobilização de biocatalisadores têm sido desenvolvidos e atualmente são utilizados extensivamente. Entretanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática. O método a ser aplicado precisará estar de acordo com a finalidade do produto e com as características próprias da enzima a ser utilizada (Goulart, 2007).

A inativação enzimática pode ocorrer por fatores químicos, físicos ou biológicos, quando as enzimas estiverem estocadas ou durante o uso. Para que não haja inativação a enzima precisa ser protegida da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, assim 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).

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

Ao imobilizar uma enzima, o principal interesse é fazer com que o biocatalisador não perca sua atividade e estabilidade durante o processo, em comparação à sua forma livre, devendo exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. 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

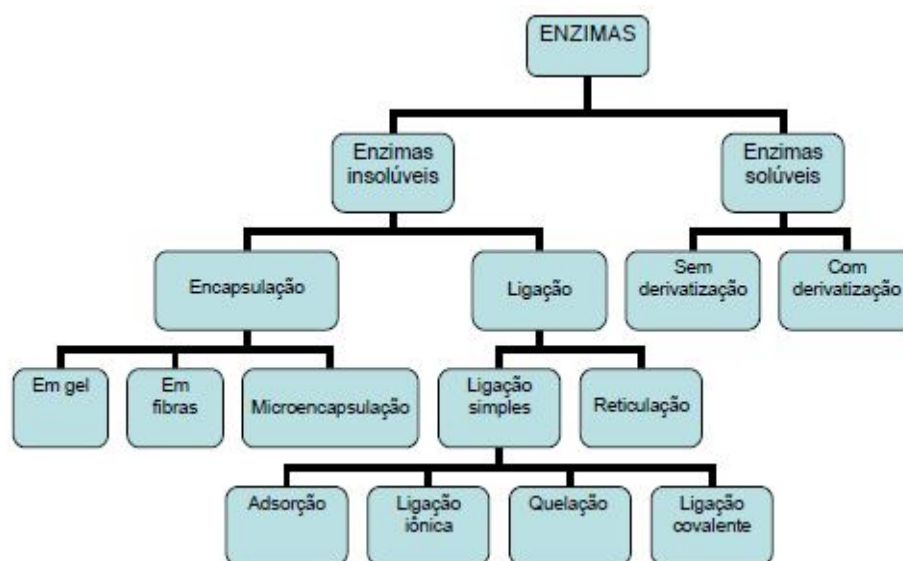
moléculas de enzima na matriz e as condições de imobilização (Danisman *et al.*, 2004; Cao, 2005).

As enzimas possuem várias vantagens se comparadas a catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia e maior atividade catalítica; porém, sua utilização em processos industriais, tem sido limitada devido à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos. Para superar essas deficiências em processos industriais está em estudo a utilização de enzimas insolúveis no meio de reação, resultando em técnicas de imobilização enzimática (Zanin e Moraes, 2004; Ladero *et al.*, 2002).

O processo de imobilização pode ocorrer com a enzima ligada a um suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz, formando assim um sistema catalítico facilmente separável do meio reacional, utilizado em reatores contínuos ou em bateladas repetidas (Zanin e Moraes, 2004).

Os métodos utilizados para a imobilização enzimática são classificados em métodos químicos (adsorção, ligação covalente, “crosslinking”) e métodos físicos (deposição física para uso em meios orgânicos, aprisionamento em géis ou microcápsulas, membranas ou sistemas de fases orgânico/aquoso ou aquoso/aquoso) (Adlercreutz, 1993). A utilização destes métodos depende de fatores essenciais do processo, como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, necessitando um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Selecionar um suporte adequado é o principal fator, sendo definido como a parte não-catalítica da imobilização, na qual a parte catalítica é construída. Desta forma, o método escolhido deve atender às duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a processos de controle e separação (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Cao, 2005).

A Figura 1 apresenta um esquema geral da classificação dos métodos de imobilização proposta por Kennedy e Roig (1995), que procura integrar a natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado.



Fonte: Kennedy e Roig, 1995.

Figura 1- Classificação dos métodos de imobilização enzimática.

A imobilização influencia a estabilidade, o pH e a temperatura ótimos, as constantes cinéticas e a máxima velocidade de reação da enzima (Danisman *et al.*, 2004; Erginer *et al.*, 2000).

A ação catalítica das enzimas é semelhante aos catalisadores inorgânicos, onde elas não são consumidas ao final da reação. Porém, as enzimas possibilitam uma catálise mais amena, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambientes e, principalmente, com elevado grau de especificidade em relação ao substrato. O processo de imobilização está sendo largamente investigado para aprimorar 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 (Nguyen, 2011; Rodrigues *et al.*, 2009a; 2009b; 2009c).

Os fatores que contribuem para a queda de potencial catalítico durante os consecutivos ciclos são: desprendimento da enzima do suporte, inativação da enzima pelo substrato; obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; perda do suporte por atrito ou dissolução; obstrução do leito fixo causando canais preferenciais e crescimento de micro-organismo (Brígida, 2006).

3.2.1 Imobilização por ligação a um suporte via adsorção física

A metodologia de adsorção de enzimas é um processo simples e de fácil execução, onde a fixação da proteína é puramente física, ou seja, a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e força de Van der Waals (Kemeny e Challacombe, 1988). 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 da enzima e custo (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

Esta metodologia também é bem aceita em processos contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (D'Souza, 2006 *apud* Brígida, 2006). Frente ao aumento da estabilidade promovido à enzima pela imobilização, outra aplicação que tem sido amplamente estudada é seu uso em reações promovidas em meios não convencionais, como solventes orgânicos, sistemas bifásicos, fluidos supercríticos e meios sólidos (Vermuë e Tramper, 1995).

A quantidade de enzimas adsorvidas e a forma em que estas são imobilizadas afetam sua atividade e estabilidade (Nakanishi *et al.*, 2002). Deste modo, deve-se avaliar a quantidade adsorvida, determinar os valores de atividade recuperada (atividade retida no suporte frente à diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização) e rendimento (diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização frente à atividade oferecida para a imobilização) obtidos para um dado processo de imobilização (Gitlesen *et al.*, 1997).

Vários parâmetros são responsáveis pela eficiente adsorção da enzima na superfície do suporte, dentre eles a concentração da enzima, o tamanho da proteína a ser adsorvida, a área superficial do adsorvente e, principalmente, a porosidade e tamanho dos poros. Como as enzimas são adsorvidas no interior dos poros é viável o uso de suportes porosos. 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).

3.3 Suportes para a imobilização

O suporte deve ser quimicamente resistente às condições de ativação, durante o processo de imobilização e às condições em que se processa a reação; deve possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la. Além disso, devem ser avaliadas as propriedades químicas, físicas, e a possibilidade de regeneração do material. Deve apresentar boa resistência mecânica devido ao uso repetido e contínuo do derivado, exposição a operações como filtração, centrifugação e agitação. Outra particularidade 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).

São desejáveis suportes com características hidrofílicas, pois estes suportes mantêm uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Entretanto, 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).

Um critério importante na seleção do suporte é a sua resistência ao ataque microbiológico, devendo 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.

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 pressão, temperatura e pH. No entanto, a maioria das enzimas comerciais imobilizadas é obtida a partir da utilização de

matrizes orgânicas como suportes devido, provavelmente, à variedade de grupos funcionais reativos que podem ser introduzidos nesses suportes (Rodrigues *et al.*, 2008).

Entre os suportes mais estudados e utilizados pode-se citar: polissacarídeos (agarose, celulose, amido, dextrana, quitosana), proteínas (colágeno, gelatina, albumina), polímeros sintéticos (poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas, vinil e polímeros aliis), minerais (bentonite, sílica) e materiais fabricados (vidro não-poroso, vidro de poro controlado), entre outros (Cabral e Kennedy, 1991). Cápsulas de gel de alginato de cálcio (Tanriseven e Dogan, 2001), microcápsulas de quitosana (Siso *et al.*, 1997), micro-esferas magnéticas de polivinilálcool (Akgöl *et al.*, 2001), montmorillonita (Sanjay e Sugunan, 2005) e fenil-sefarose (Basha e Palanivelu, 2000) também têm sido citados na literatura como potenciais suportes para diversas classes de enzimas.

O uso de argilas como suportes para imobilização consiste na presença de grupos silanol que, após ativação por diferentes grupos funcionais, atuam como sítios de ligação para espécies bioativas. Além disso, as argilas possuem a possibilidade de serem sintetizadas, podendo, dessa forma, fornecer uma série reprodutível de materiais inorgânicos sólidos cujas propriedades físicas e/ou químicas podem ser alteradas de forma sistemática para identificar o suporte inorgânico mais adequado para uma determinada aplicação como suporte biocatalítico (Yesiloglu, 2005).

Por essa razão, a síntese de algumas argilas como bentonitas e esmectitas torna-se um assunto de relevância científica, devido à produção de argilas com alta pureza química e a capacidade de ajustar a sua composição e estrutura para as mais diversas aplicações tais como: clarificação de tintas e óleos minerais, fabricação de cosméticos e produtos farmacêuticos e, no caso particular deste estudo, para a imobilização de enzimas. Segundo Yesiloglu (2005), a bentonita é uma matriz barata para a imobilização de enzimas e tem sido freqüentemente utilizada para esse fim. Além do seu baixo custo, a bentonita possui várias vantagens para utilização como suporte, incluindo a sua

baixa toxicidade e reatividade química, permitindo, facilmente, desta forma, a fixação e permanência das enzimas sob sua estrutura.

A bentonita é uma partícula de argila mineral composta de 2 folhas tetraédricas de silício (Si) e uma central octaédrica de alumínio (Al), unidas entre si por átomos de oxigênio comuns às folhas. Apresenta uma granulometria muito fina (inferior a 0,03% do grão médio da caulinita) que geralmente aumenta de volume de modo substancial em meio aquosos. Consiste principalmente de montmorillonita (de 60 a 80%), podendo conter outras argilas em menor proporção (normalmente, illita e caulinita), além de quartzo, feldspato, pirita ou calcita (Rossetto *et al.*, 2009).

3.4 Aplicações das enzimas imobilizadas

A primeira tentativa de imobilizar uma enzima, com a finalidade de melhorar suas propriedades foi realizada em 1953 por Grubhofer e Schleith, fazendo uso de carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease imobilizadas em uma resina de poliaminopoliestireno diazotizada (Vicente, 2000).

Um aumento progressivo nas publicações de trabalhos científicos sobre imobilização enzimática foi verificado a partir de 1960, refletindo o interesse mundial despertado por esta tecnologia. Todavia, o primeiro processo industrial de imobilização enzimática foi implantando no Japão em 1969, para a produção de L-aminoácidos. Em 1972, nos Estados Unidos, glicose-isomerase foi imobilizada para a isomerização de glicose em frutose.

As enzimas imobilizadas vêm sendo aplicadas em larga escala na produção de xaropes de glicose e frutose a partir do amido de milho; na 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 e 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 e Moraes, 2004).

3.5 Imobilização de inulinases

Por meio das afirmações acima, vem se estudando formas de tornar as enzimas insolúveis ao meio reacional aproveitando seu potencial catalítico e as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, fazendo com que a imobilização represente uma alternativa atraente.

As enzimas podem ser utilizadas nos processos industriais de forma semelhante aos catalisadores químicos, a partir do momento que estiverem imobilizadas, ativas e estáveis, e com boa especificidade ao substrato. Deste modo, a maioria das desvantagens é eliminada, facilitando a imobilização (Zanin e Moraes, 2004).

Por meio de uma análise detalhada da literatura, verificou-se alguns estudos sobre a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* fazendo uso de diferentes suportes. Entre eles, podem ser citados os trabalhos de Munaretto (2011), a qual imobilizou inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em alginato de sódio e carvão ativado obtendo uma atividade específica de 2063,52 U/mg de proteína e a enzima imobilizada manteve sua atividade enzimática estável no período de 1032 horas. Paula (2008), 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.

Bajpai e Margaritis (1987) realizaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* por ligação metálica, com 72% de retenção da atividade enzimática original. Risso *et al.*, (2009; 2010) utilizou as enzimas imobilizadas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571

visando à síntese de frutooligossacarídeos. 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).

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 poliestireno como suporte. Após a imobilização da inulinase de *A. ficcum* em vidro poroso, por ligação covalente, utilizando reagentes de silanização e reticulação, Ettalibi e 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) e 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).

Após uma criteriosa avaliação da literatura verificou-se a ausência de estudos sobre a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, com enfoque na otimização do processo de imobilização e estudo da estabilidade do complexo imobilizado.

3.6 Considerações Finais

A tecnologia de imobilização trouxe novas perspectivas para a aplicação de enzimas e células em processos industriais. Juntamente com as novas invenções técnicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas, esta tecnologia pode ser utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos e, conseqüentemente, reduzir custos de produção. Atualmente, técnicas modernas já permitem a fácil separação dos biocatalisadores a partir de uma suspensão (células) ou de uma solução (enzimas) através do uso de membranas de microfiltração ou ultrafiltração, respectivamente (Kragl e Dwars, 2001).

Por meio das informações apresentadas no decorrer deste capítulo, alguns poucos relatos são encontrados na literatura a respeito da imobilização da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus*, principalmente através da utilização de suportes inorgânicos.

Levando em consideração estes aspectos, o presente trabalho tem por objetivo abordar, de forma ampla, a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, avaliando os efeitos de parâmetros relevantes ao processo de imobilização, utilizando argila montmorillonita poço A como suporte.

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 otimização do processo de imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 utilizando argila montmorillonita poço A como suporte.

4.1 Enzima

Na realização deste trabalho foi utilizada a enzima inulinase produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase por FES e é pertencente ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAZUTTI *et al.*, 2007), no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI – Campus de Erechim.

4.2 Suporte

Como suporte para imobilização da inulinase foi utilizado Montmorillonita natural poço A fornecido por Colorminas Colorifício e Mineração S/A. Esta argila apresenta elevada razão de aspecto, boa capacidade de delaminação, partículas resistentes a solventes, é amplamente utilizada como adsorvente de compostos orgânicos, aplicações ambientais no tratamento de água para remoção de poluentes orgânicos.

4.3 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador Orbital (Nova Ética RDB-430);
- Agitador Magnético (Fisatom);
- Bomba a Vácuo (Marconi);
- Balança Analítica (Bel Engineering);

- Dessecador;
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- Difratorômetro de Raios-X (Diffraktometer Desktop X-ray (Miniflex II Rigaku));
- Analisador Textural por Adsorção de N₂ (Autosorb-1 Quantachrome (Nova-2200e);
- Fluorímetro (Invitrogen).

4.4 Imobilização de inulinase

Em 2g do suporte, previamente pesado, adicionou-se 60mL de uma solução enzimática contendo extrato enzimático e tampão acetato pH 4,8 na diluição 3:10 (30 mL de extrato enzimático em 100 mL de tampão acetato pH 4,8, desta solução retirou-se 60 mL para o processo de imobilização) conforme pode-se verificar na Figura 2. Esta solução foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 4°C (banho de gelo) por 10 minutos (Menoncin *et al.*, 2008).

Após o término do processo de adsorção, as amostras foram filtradas a vácuo e permaneceram por 48 horas em dessecador (Figura 3). Em seguida com o pó dessecado e foi realizada a medida da atividade e enzimática e do teor de proteína, seguindo metodologia descrita a seguir.



Figura 2 - Aparato experimental utilizado no processo de imobilização.



Figura 3 - Enzima imobilizada em argila poço A após 48 horas em dessecador.

4.5 Otimização do processo de imobilização

Nos testes preliminares foram realizados experimentos relacionados à definição da relação enzima/tampão (1:10; 2:10; 3:10; 4:10; 5:10) a ser aplicada para a obtenção de dados visando à maximização do processo de imobilização.

Para esta etapa de otimização foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2^2 para avaliar se o tempo influenciava no processo de imobilização (tabela 1), os tempos avaliados foram 0, 10, 30, 50, 60, 90 e 120 minutos, mantendo 2g de suporte para cada tempo e a relação enzima:tampão também foi avaliada.

Durante o processo de imobilização foram retiradas alíquotas de 1mL nos tempos citados acima, bem como entrada e saída de cada procedimento de adsorção para posteriores medidas do teor de proteína e atividade enzimática.

Os cálculos para determinação do rendimento de imobilização, do teor de proteína e da atividade enzimática, foram realizados seguindo metodologia descrita a seguir.

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2² para determinação do tempo e relação enzima/tampão da inulinase imobilizada.

Variáveis/Níveis	Tempo (min)	Relação enzima/tampão (mL)
-1	10	1:10
0	50	2:10
1	90	3:10

4.6 Métodos empregados durante o processo de imobilização

4.6.1 Determinação do teor de proteínas da enzima imobilizada

Para a determinação do teor de proteína foi utilizado o aparelho Qubit Fluorimeter (Kit Quant-iT Protein Assay), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante, onde inicialmente preparou-se a solução tampão adicionando 4.975 µL do tampão de proteína (componente B) e 25µL do componente A, após foi realizado os três padrões (0, 200, 400 mg/µL, representando componente C) utilizando para cada, 190µL da solução tampão, mais 10µL de cada padrão que acompanham o equipamento. Em seguida com os três padrões realizou-se a calibração do equipamento. Para quantificar a proteína das amostras utilizou-se 190µL da solução tampão e 10µL de amostra e deixou-se 15 minutos reagindo antes de fazer a leitura.

4.6.2 Determinação da atividade da enzima imobilizada

A atividade enzimática foi determinada adicionando-se 0,5g de enzima imobilizada dessecada em um tubo de ensaio, completando-se a mesma com uma solução de 4,5mL de tampão acetato 0,1M, pH 4,8 com 2% (p/v) de sacarose. Após, a solução foi mantida a 50°C, por 10 minutos. A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-

dinitrosalicílico) (Miller, 1959), onde 0,5mL da amostra foi diluído em 0,5mL de DNS e mantido por 5 minutos em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados 8mL 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 540nm. 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.

4.6.3 Determinação do rendimento de imobilização

Durante o processo de imobilização nos tempos de 0, 10, 30, 50, 60, 90 e 120 minutos das soluções de entrada e saída foram retiradas alíquotas de 1mL para posterior medida da atividade, do teor de proteína e cálculo do rendimento da imobilização, de acordo com a Equação 1.

$$\eta(\%) = \frac{Ps}{Po} \times 100 \quad (1)$$

onde:

η = Rendimento (%);

Ps= Quantidade de proteína absorvida (diferença entre a inicial e a estável);

Po= Quantidade de proteína utilizada na imobilização (solução de entrada).

4.6.4 Determinação do percentual de retenção

O percentual de retenção foi calculado pela Equação 2.

$$Ra(\%) = \frac{AR \times 100}{Ar} \quad (2)$$

onde:

AR= Atividade Real (atividade da enzima imobilizada) (U);

Ar= Atividade Teórica (U).

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

A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade do extrato enzimático bruto pelo teor de proteína. Para a enzima imobilizada, o mesmo procedimento foi utilizado, substituindo a atividade do extrato bruto pela da enzima imobilizada. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade (U) por mL de proteína para o extrato bruto e em unidade de atividade (u) por mg de proteína para a enzima imobilizada.

4.7 Caracterização parcial da inulinase imobilizada

O estudo de caracterização parcial da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada foi realizado em termos de temperatura e pH ótimos e estabilidade térmica da enzima imobilizada. Os parâmetros cinéticos k_m e $v_{m\acute{a}x}$ da enzima imobilizada também foram determinados sobre dois substratos, inulina e sacarose.

4.7.1 Estabilidade térmica da enzima imobilizada

A estabilidade térmica da inulinase imobilizada foi testada nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C utilizando-se 20g de amostra para cada temperatura. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo, para as medidas de atividade e teor de proteína.

4.7.2 Estabilidade da enzima imobilizada em baixas temperaturas

As amostras foram armazenadas (amostras de 20g) nas temperaturas de 4, -10 e -80°C e em determinados intervalos de tempo realizou-se as medidas de atividade e teor de proteína afim de acompanhar a estabilidade da enzima ao armazenamento.

4.7.3 Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada

A estabilidade da inulinase frente a diferentes valores de pH foi testada incubando a enzima em tampão acetato de sódio 0,1M nas faixas de pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 a uma temperatura de 50°C. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo medindo-se a atividade enzimática pelo método DNS.

4.8 Determinação de k_m e $v_{m\acute{a}x}$

Ensaio enzimáticos com 0,5g de enzima imobilizada foram executados em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 a 50°C em diferentes concentrações de sacarose e inulina: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 35g/L, sendo que o tempo de reação foi de 10 e 30 minutos para sacarose e inulina, respectivamente. Os parâmetros cinéticos k_m e $v_{m\acute{a}x}$ foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk.

4.9 Caracterização do suporte e enzima imobilizada

O suporte estudado foi avaliado quanto à área superficial, tamanho de poro e composição estrutural. As técnicas utilizadas para a caracterização do suporte e da enzima imobilizada foram: Difração de Raios-X e Análise Textural por Adsorção de N₂, conforme metodologias descritas a seguir.

4.9.1 Difração de Raios-X

As análises de difração de Raios X foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios-X da URI-Campus de Erechim, em um Diffraktometer Desktop X-Ray Miniflex II Rigaku utilizando filtro de Ni e radiação Cu- α ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$), 0,05 de passo, 5°/min de varredura, 30kV e 15mA.

4.9.2 Análise Textural por Adsorção de N₂

A caracterização textural dos suportes foi realizada utilizando um Autosorb-1 da Quantachrome (Nova-2200e). Antes da análise, cerca de 100mg das amostras (suportes) foram tratadas a vácuo, a uma temperatura de 300°C por 3 horas. Para as amostras imobilizadas e a inulinase livre empregou-se tratamento a vácuo à temperatura de 33°C por 3 horas. As medidas foram realizadas na temperatura do N₂ líquido.

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 argila montmorillonita poço A como suporte, conforme já descrito no capítulo anterior.

5.1 Caracterização do suporte montmorillonita poço A

Anteriormente ao processo de imobilização foi realizada a caracterização do suporte utilizado. Alguns autores (Dumitriu *et al.*, 2003; Macario *et al.*, 2002 e 2008; Li *et al.*, 2009; Fuentes *et al.*, 2001; Gopinath e Sugunan, 2007 e Meunier *et al.*, 2010) reportam em seus trabalhos várias técnicas para caracterização de suportes sólidos tais como: Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ressonância Magnética Nuclear de Massa (RMN-MAS), Espectroscopia de Infravermelho (IV-FT) e isotermas de Adsorção de Nitrogênio (BET).

Estas análises de caracterização dos suportes têm como finalidade principal estimar a cristalinidade, tipo de estrutura, morfologia, tamanhos dos cristais, diâmetro de poro e área superficial específica de cada material a ser empregado como suporte na imobilização de enzimas (Macario *et al.*, 2005). Levando em consideração estas citações, as análises empregadas para caracterização do suporte utilizado foram Difração de Raios X e Análise Textural por Adsorção de N₂.

5.1.1 Difração de Raio X do suporte

A Figura 4 apresenta o difratograma de Raio X da argila montmorillonita Poço A. Pela análise do difratograma de Raio X observa-se que a argila possui quartzo como impureza ($2\theta = 27^\circ$) e um pico em $2\theta = 20^\circ$, característico de argilas motmorillonitas. Efetivamente, a argila poço A possui um espaçamento

basal (calculado pela lei de Bragg) de $9,7\text{\AA}$ quando calcinada e de $15,12\text{\AA}$ na forma hidratada.

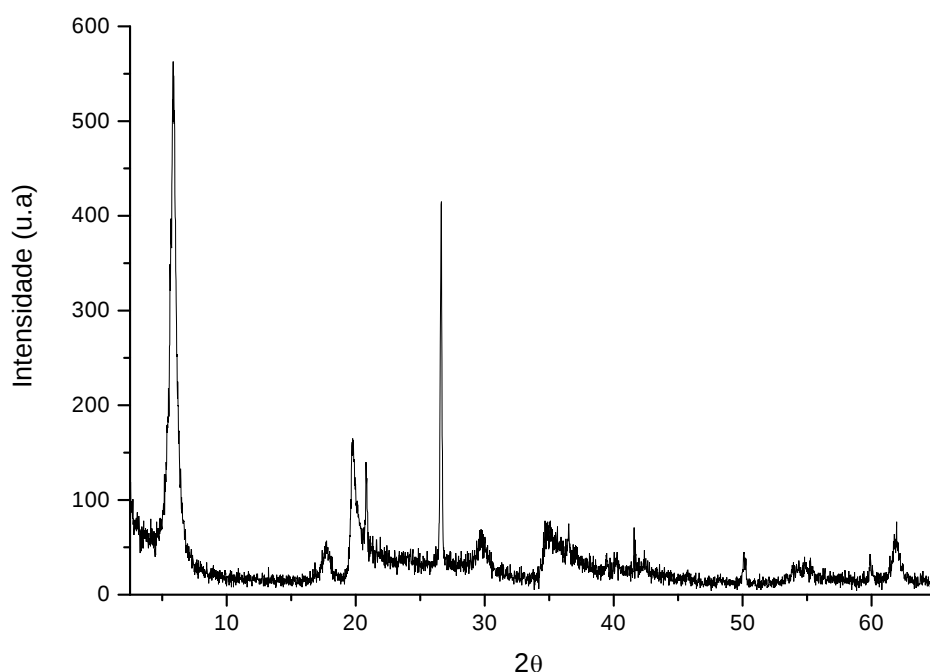


Figura 4 - Difratoograma de Raio X da argila Poço A.

5.1.2 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio do suporte

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio foram determinadas as seguintes propriedades do suporte montmorillonita poço A: diâmetro médio do poro (determinado pelo modelo BJH) e A_{BET} (área superficial determinada pela isoterma BET). O resultado da caracterização é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Área superficial específica (BET) do suporte.

Suporte	Diâmetro de poro ($\text{\AA}$)	Área superficial BET (m^2/g)
Montmorillonita poço A	38,60	62,70

Por meio das análises realizadas de caracterização do suporte, pode verificar que a argila poço demonstrou-se promissora para a utilização na imobilização enzimática.

Munaretto (2010), avaliou o diâmetro de poro e a área superficial da dos suportes utilizados para imobilização alginato + alpha LA810, alginato + Pelegrini 12x40 e alginato + Pelegrini 20x40 obtendo-se diâmetro de poro de 274, 214, 216nm, e para área superficial 656, 464, 463m²/g, respectivamente.

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

Nesta etapa foram realizados experimentos preliminares relacionados à definição da relação enzima/tampão (1:10; 2:10; 3:10; 4:10; 5:10) a ser aplicada para a obtenção de dados visando à maximização do processo de imobilização.

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

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

5.2.1 Seleção da relação enzima/tampão a ser utilizada na imobilização de inulinase

Por meio dos resultados obtidos nas análises de avaliação da relação enzima/tampão, foi verificado que a utilização da relação 1:10 conduziu à perda da atividade enzimática, sendo desprezada essa relação. Dentre as demais relações testadas, a de 2:10 e a de 3:10 apresentaram as melhores atividades específicas, como pode-se verificar na Tabela 3.

Estes resultados foram interessantes porque mostraram que não só o tempo de imobilização é uma variável importante no processo, mas também a concentração da solução de enzima. No entanto, há que se considerar que o suporte apresenta uma capacidade de carga que deve ser respeitada, de forma a não utilizar um excesso de enzima que possa causar problemas estéricos ou mesmo impedir a estabilização da enzima (Goulart, 2007).

Tabela 3 - Atividade enzimática específica da enzima livre e imobilizada.

Enzima livre		Enzima imobilizada	
Relação	Atividade Específica	Relação	Atividade Específica
Enzima/tampão	(U/mg)	Enzima/tampão	(U/mg)
2:10	325,24	2:10	643,78
3:10	307,52	3:10	975,07
4:10	201,16	4:10	350,92
5:10	211,36	5:10	491,85

Munaretto (2011), imobilizando inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-7571 em alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado, obteve uma atividade específica de 2063,52U/mg de proteína. Paula (2007), por meio do micro-organismo var. *bulgaricus*, imobilizou inulinase em carvão ativado, atingindo atividade específica de 0,34UA/mg de proteína.

Serralha et al. (2004) utilizaram a resina polimérica Accurel PA6 e zeólita Y para imobilização de cutinase, obtendo as melhores atividades específicas de 15,2U/mg para a resina e 25,1U/mg para a zeólita.

Com base nos resultados encontrados até este momento, pode-se verificar que a enzima em estudo demonstrou grande afinidade com o suporte estudado, sendo um resultado promissor tendo em vista que a enzima foi obtida de resíduos agroindustriais.

5.3 Otimização do processo de imobilização

Para avaliação do tempo de imobilização e relação enzima/tampão, foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2^2 , conforme apresentado na Tabela 4. O tratamento dos dados resultou em um Gráfico de Pareto, o qual demonstrou que o tempo não influenciava significativamente no processo de imobilização (Figura 5), sendo que 10 minutos foi suficiente para a adsorção da enzima no suporte. Também pode-se verificar na Figura 6 que após 10 minutos de imobilização o teor de proteína praticamente apresentou os mesmos valores, demonstrando um comportamento linear.

Tabela 4 - 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.

Ensaio	Tempo (min)	Relação Enzima/tampão (mL)	Atividade de inulinase (U/mL)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg proteína)
1	10 (-1)	1:10 (-1)	0	0	0
2	90 (1)	1:10 (-1)	0	0	0
3	10 (-1)	3:10 (+1)	19,28	0,1045	184,43
4	90 (1)	3:10 (+1)	20,22	0,0867	233,17
5	50 (0)	2:10 (0)	18,17	0,0854	222,87
6	50 (0)	2:10 (0)	21,51	0,0901	232,72
7	50 (0)	2:10 (0)	17,58	0,0928	210,48

No estudo de Scherer (2010), utilizando diferentes suportes inorgânicos para imobilização de lipase de pâncreas de porco, foi observado que o processo de imobilização demonstrou-se mais eficiente para as argilas KSF, Poço A e K-10, com rendimentos de imobilização superiores e próximos a 50% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo. Segundo o autor, isto provavelmente se deve à maior afinidade da enzima por estes suportes.

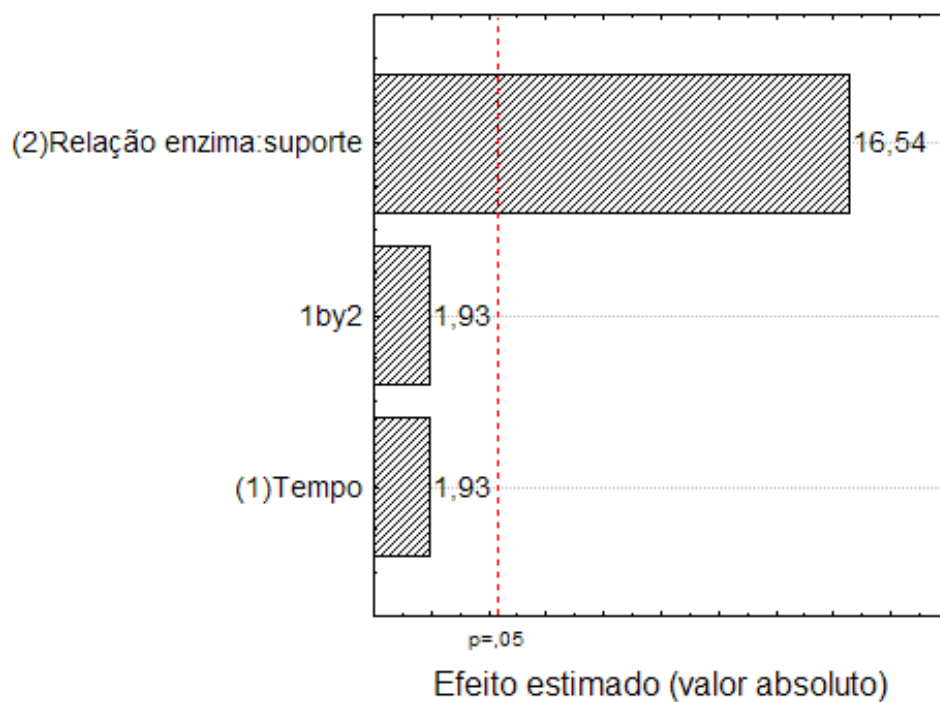


Figura 5 - Gráfico de Pareto do efeito da relação enzima/suporte e do tempo no processo de imobilização.

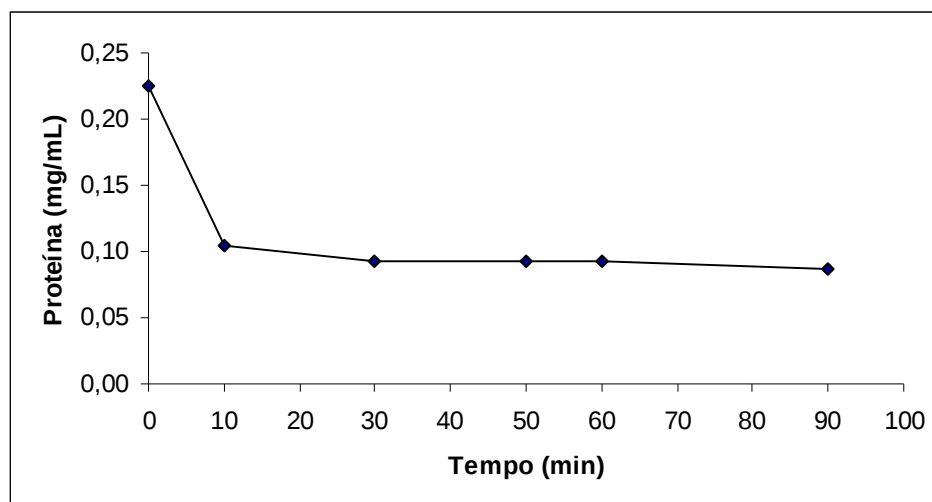


Figura 6 - Cinética de adsorção de inulinase em poço A na relação 3:10.

Após a fixação dos parâmetros de diluição e tempo de imobilização foi calculado o rendimento, a retenção e a atividade teórica, obtendo-se os seguintes valores 63,67%; 42,08% e 56,84U/g, respectivamente.

Segundo Li *et al.* (2009), os grupos hidroxilas livres presentes na superfície destes suportes podem formar ligações do tipo ponte de hidrogênio com os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, promovendo maior eficiência no processo de imobilização. Além destas forças, uma fraca interação do tipo forças de Van der Waals também pode auxiliar na adsorção da enzima na superfície do suporte.

Paula (2007) estudou a imobilização da inulinase de *K. marxianus* var. *bulgaricus* em diferentes suportes e obteve eficiência de imobilização de 2,25% utilizando carvão ativado como suporte, 3,04% utilizando 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 como suporte.

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 0,5M de KOH a 50°C e ativado com glutaraldeído 0,8% (v/v), com atividade recuperada e rendimento de imobilização de 100%.

Kochhar *et al.* (1998), ao imobilizar a inulinase de *A. versicolor*, obtiveram 56% de retenção da atividade enzimática em quitina e 10% em caseína. Yesiloglu (2005) utilizou argila bentonita para imobilização de lipase de *Candida rugosa* por processo de adsorção, apresentando atividade enzimática de 30% em relação à da enzima livre, após o processo de imobilização. Spagna *et al.* (1995) imobilizaram uma pectiniliase comercial em bentonita obtendo um rendimento de imobilização de 16% e atividade enzimática de 67U/g.

Através dos experimentos realizados obteve-se uma condição de imobilização com uma relação enzima:tampão de 3:10, um tempo de imobilização de 10 minutos e uma atividade específica de 233,17 U/mg. Astolfi

(2010), analisando a enzima livre produzida por fermentação em batelada alimentada obteve uma atividade enzimática de 484U/mL.

5.4 Comportamento da inulinase em contato com o suporte montmorillonita poço A

Nesta etapa serão demonstrados os resultados da avaliação do comportamento da enzima inulinase em contato com o suporte.

5.4.1 Difração de Raio X

Observa-se, através da Figura 7, que a estrutura da inulinase livre apresentou um comportamento amorfo. Com o processo de imobilização da enzima na argila natural percebe-se que não houve alteração na estrutura, podendo-se concluir que a enzima encontra-se na região interlamelar, uma vez que não se observam picos referentes à enzima livre.

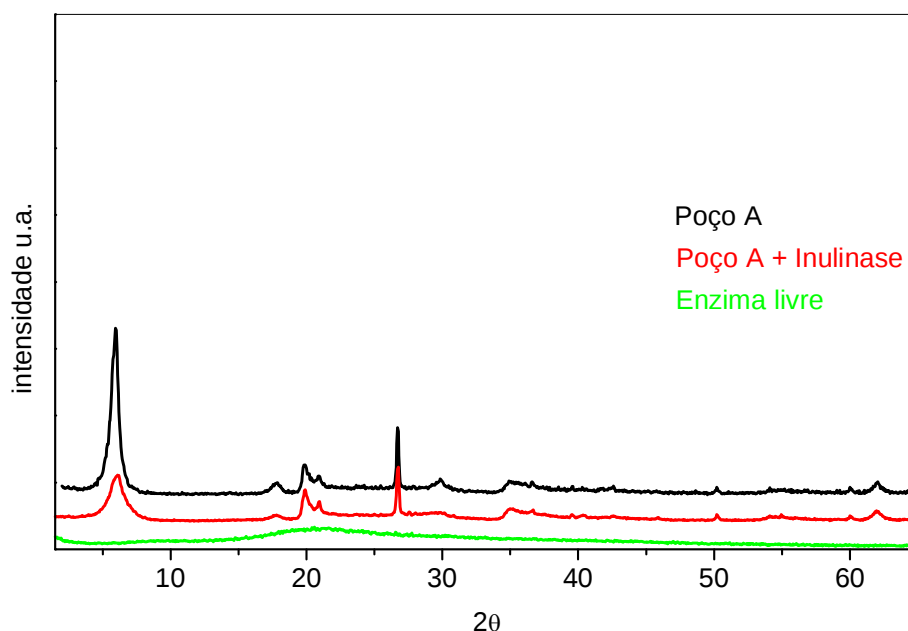


Figura 7 - Difratogramas de Raio X da inulinase livre, argila montmorillonita Poço A natural e inulinase imobilizada em argila montmorillonita natural Poço A.

5.4.2 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio da enzima imobilizada

Ao comparar as áreas superficiais do suporte antes e após processo de imobilização da inulinase (Tabela 5), percebe-se uma diminuição significativa da área no suporte contendo a enzima imobilizada, indicando assim a aderência da enzima nas cavidades do suporte e o sucesso do processo de imobilização. Percebe-se também que ocorreu um aumento no diâmetro de poro após o processo de imobilização, fato provavelmente causado pela entrada da enzima na estrutura da argila.

Tabela 5 - Área superficial específica (BET) do suporte e enzima imobilizada.

Amostra	Diâmetro de poro ($\text{\AA}$)	Área superficial BET (m^2/g)
Montmorillonita Poço A	38,60	62,70
Enzima imobilizada	55,51	4,66

Munaretto (2010) avaliou o diâmetro de poro e a área superficial da inulinase imobilizada em alginato + alpha LA810, alginato + Pelegrini 12x40 e alginato + Pelegrini 20x40 obtendo-se diâmetro de poro de 366; 501,2; 472 nm, e para área superficial 48,88; 73,89; 67,47 m^2/g , respectivamente.

O diâmetro de poro e a área superficial de lipases de *P. simplicissimum* (imobilizada em Accurel), *A. parasiticus* (Accurel) e *P. brevicompactum* (imobilizada em alginato de sódio e carvão ativo) apresentaram valores de diâmetro de poro de 13; 13; 4,24nm e de área superficial de 42,6; 46,3; e 89,3 m^2/g , respectivamente (Silva, 2010).

5.5 Estabilidade térmica da enzima 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). Os resultados obtidos do decaimento da atividade enzimática da inulinase imobilizada em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas, no intervalo de 40 a 70°C, estão apresentados nas Figuras 8 a 11. Através dos dados encontrados para a temperatura de estabilidade para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada, observou-se que, dentro da faixa de temperatura avaliada, a enzima imobilizada não demonstrou significativa perda de atividade, onde para 40°C a perda foi de 9% em 1826 horas, para 50°C foi de 19% no período de 1792 horas, 60°C perda de 37% em 678 horas e 70°C perda de 30% em 456 horas de estabilidade.

Astolfi (2010) estudou a faixa de temperatura (40-70°C) para inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e observou-se que dentro da faixa estudada a temperatura de maior estabilidade é a de 40°C. Santos (2002) apresentou a temperatura de 50°C como a de maior estabilidade para a enzima livre de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. Cazettta *et al.* (2005) e Mazutti *et al.* (2007) também obtiveram alta estabilidade de inulinase a temperatura de 50°C a partir de *K. marxianus*. Mazutti *et al.* (2009) estudaram a estabilidade para inulinases obtidas por FS e FES e observaram que ambas as enzimas apresentaram alta estabilidade a temperatura de 50°C. 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. Paula *et al.* (2008) avaliaram o efeito da temperatura na atividade da inulinase imobilizada e obtiveram maior atividade a 60°C.

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) estudaram 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 e 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 a enzima imobilizada manteve 95% de sua atividade original a 50°C.

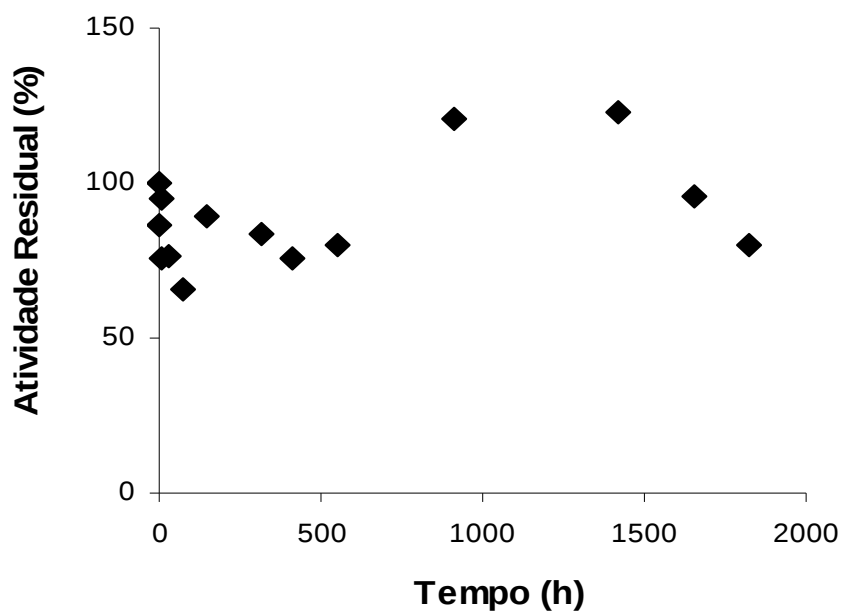


Figura 8 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 40°C.

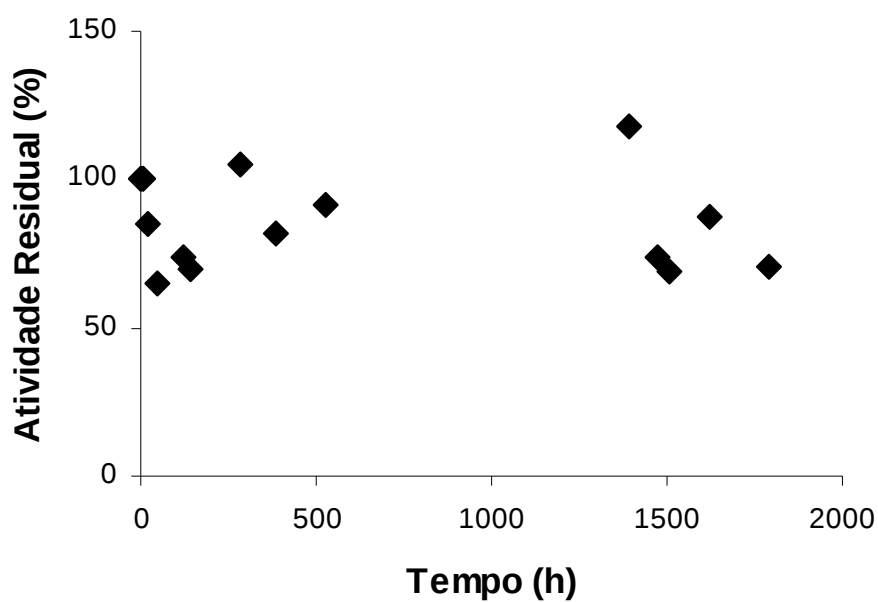


Figura 9 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 50°C.

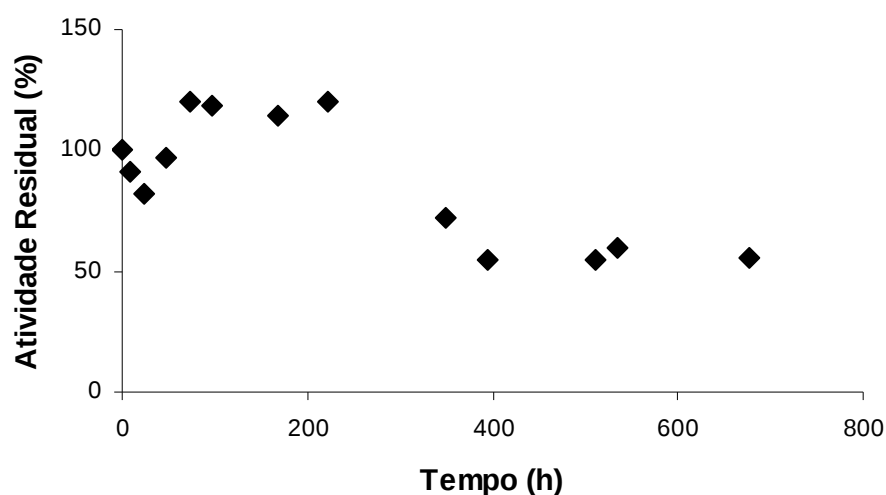


Figura 10 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 60°C.

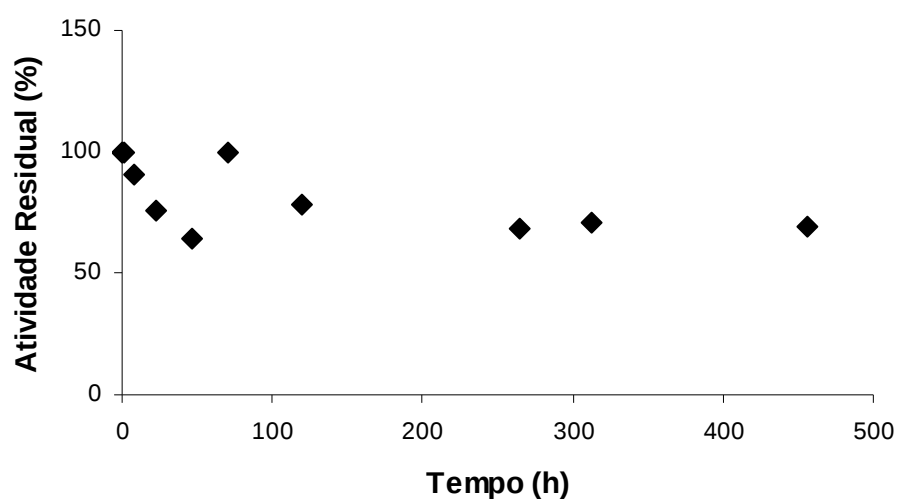


Figura 11 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 70°C.

5.6 Estabilidade da inulinase imobilizada em baixas temperaturas

Uma característica muito importante e que deve ser avaliada é a estabilidade da enzima a baixas temperaturas, pois esta influenciará no tempo em que a enzima poderá ser armazenada, mantendo suas características iniciais em termos de atividade enzimática. A estabilidade da inulinase imobilizada em baixas temperaturas foi avaliada submetendo-se amostras da

inulinase imobilizada em temperaturas de 4, -10 e -80°C. A atividade enzimática foi monitorada por um período total de 82 dias.

Os resultados obtidos para a atividade enzimática nas diferentes temperaturas de armazenamento demonstraram um comportamento variável em relação à manutenção de sua atividade em função do tempo. Porém, observou-se que não houve comportamento distinto entre as diferentes temperaturas de armazenamento (Figuras 12; 13 e 14). As três formas de armazenamento apresentaram, em alguns momentos, diminuição da atividade e, em outros, aumento. No entanto, este aumento foi mantido durante os demais dias de estocagem. O estudo da estabilidade da inulinase imobilizada mostra que a enzima imobilizada no suporte inorgânico pode ser armazenada em temperatura de congelamento e resfriamento (-80; -10 e 4°C), mantendo sua atividade original após 82 dias de armazenamento.

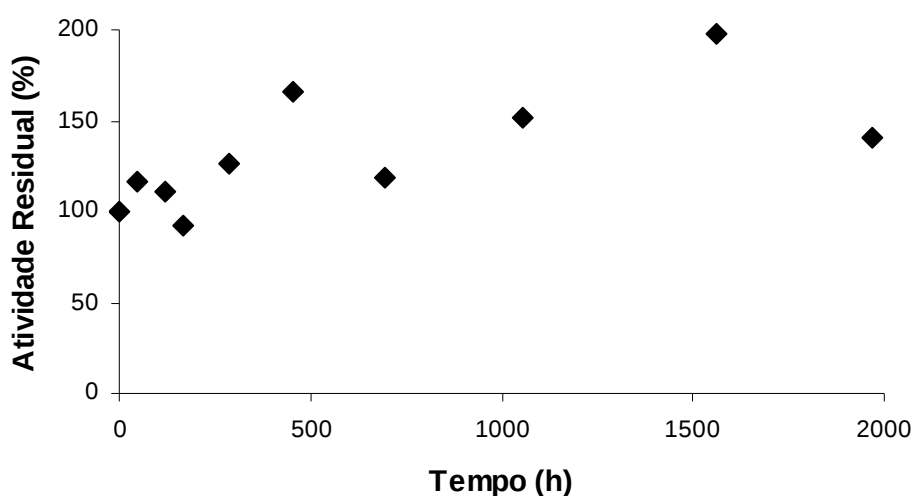


Figura 12 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a 4°C.

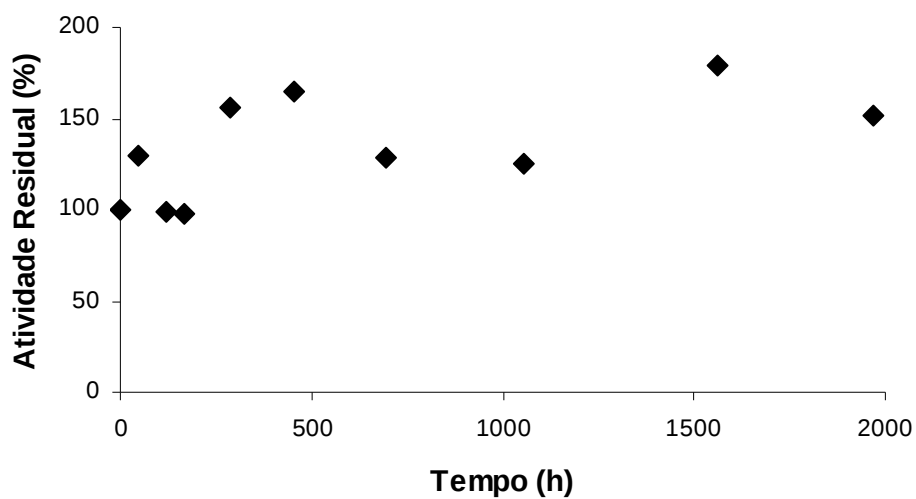


Figura 13 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a -10°C.

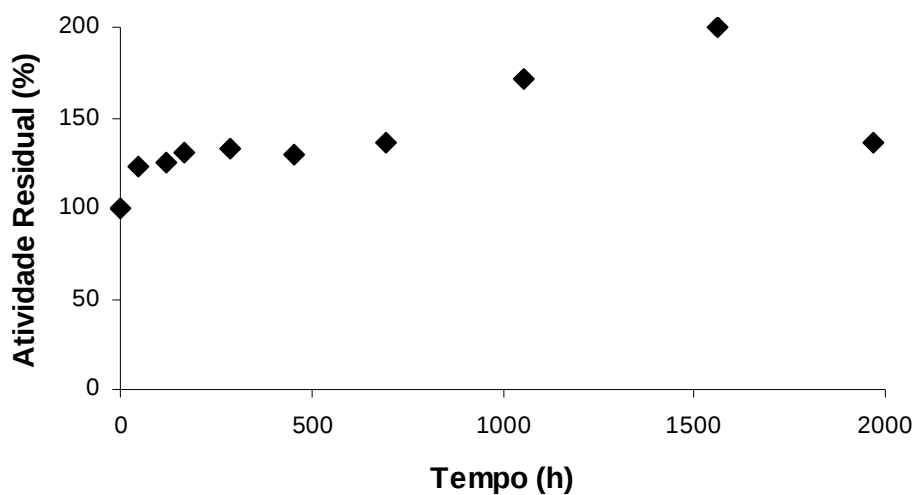


Figura 14 - Estabilidade térmica da enzima imobilizada a -80°C.

5.7 Efeito do pH na estabilidade da inulinase imobilizada

A influência do pH na estabilidade da inulinase imobilizada foi verificada nas faixas de pH de 3,5 a 5,5 conforme a Figura 15. A análise dos resultados demonstram que a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade em pH 3,5 depois de 448 horas de reação, com perda de atividade de 37% em relação ao valor original. Porém, nos valores de pH de 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 a perda de

atividade foi significativamente maior sendo 78%; 77%; 75%; 74%, respectivamente, em relação à atividade inicial, depois de 304 horas nos dois primeiros pHs e 328 horas nos últimos.

Por meio da análise do estudo de Astolfi (2010), utilizando a mesma inulinase testada neste trabalho, na forma livre, valores diferentes foram encontrados, demonstrando uma possível interferência do suporte utilizado na mudança de estabilidade da enzima, onde esta passou a aceitar melhor um pH ácido.

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. Ettalibi e 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.

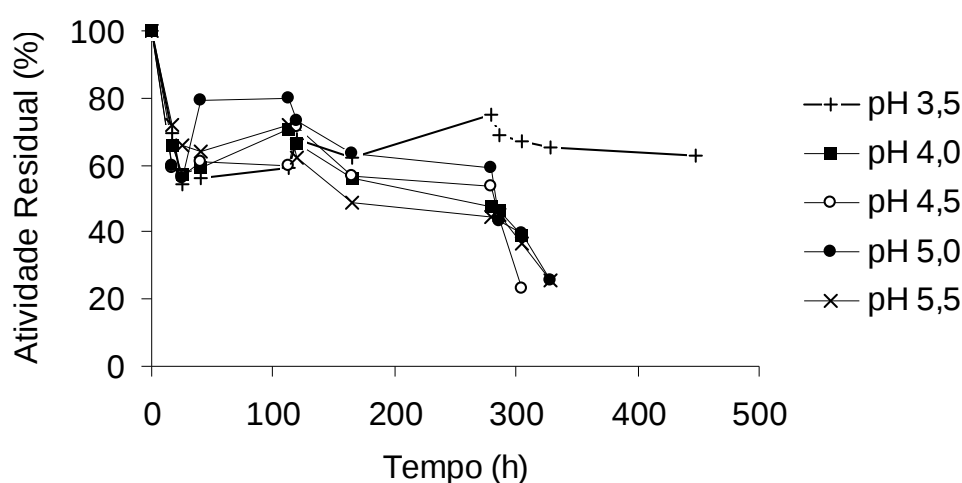


Figura 15 - Influência do pH na estabilidade da inulinase imobilizada.

5.8 Determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max}

O efeito da concentração de sacarose e inulina na atividade enzimática foi testado na faixa de 0,5 a 35g/L (Tabelas 6 e 7). Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Para a

determinação dos parâmetros utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a Equação 3, descrita a seguir:

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

Através da linearização, tem-se a Equação 4:

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

O coeficiente de correlação entre $1/v$ e $1/[S]$, forneceu os valores de k_m e $v_{\text{máx}}$. As equações obtidas foram as seguintes:

$1/v = 0,0059 (1/[S]) + 4,0205$ com $R^2 = 0,96$ para sacarose

$1/v = 0,0016 (1/[I]) + 4,1726$ com $R^2 = 0,98$ para inulina

Tabela 6 - Atividade enzimática em função da concentração da sacarose [S].

Sacarose g.L ⁻¹	Sacarose (mol/L)	Atividade (U.g ⁻¹)	1/Atividade (L.min/mol)	1/Sacarose (mol)
0,5	0,001	161,82	6,18	684,60
0,75	0,002	164,02	6,10	456,40
1	0,003	170,46	5,87	342,31
1,5	0,004	180,39	5,54	228,21
2	0,006	194,91	5,13	171,16
3	0,009	209,28	4,78	114,10
4	0,012	219,84	4,55	85,58
5	0,015	222,53	4,49	68,46
10	0,029	234,42	4,27	34,23
15	0,044	244,00	4,10	22,82
20	0,058	255,96	3,91	17,12
25	0,073	279,86	3,57	13,70
30	0,088	289,28	3,46	11,40
35	0,102	290,54	3,44	9,80

Os valores de k_m encontrados para sacarose e inulina foram 1,46 e 0,38mM, respectivamente, e os valores de $v_{\text{máx}}$ foram de 0,2487 e 0,2396mol.L.min⁻¹ para sacarose e inulina, respectivamente. Observa-se

também que o baixo valor de k_m (0,38mM) e o valor de $v_{m\acute{a}x}$ (0,2396mol.L.min⁻¹) demonstram aproximadamente 3 vezes mais afinidade da enzima por inulina do que por sacarose.

Comparando os resultados encontrados com os valores para a enzima livre avaliada por Astolfi (2010), o qual encontrou valores de k_m para sacarose e inulina de 2,94 e 8,71mM, respectivamente, e os valores de $v_{m\acute{a}x}$ foram de 0,0527 e 0,0175mol.L.min⁻¹ para sacarose e inulina, respectivamente. Observa-se que após a imobilização houve uma diminuição do k_m consequentemente um aumento da especificidade para os dois substratos. Com relação ao $v_{m\acute{a}x}$ ocorreu o inverso, sendo este aumento ocorrido em ambos os substratos, podendo-se verificar um aumento da velocidade inicial da reação quando a enzima imobilizada foi utilizada como catalisador do processo.

Tabela 7 - Atividade enzimática em função da concentração da inulina [I].

Inulina g.L ⁻¹	Inulina (mol/L)	Atividade (U.g ⁻¹)	1/Atividade (L.min/mol)	1/Inulina (mol)
0,5	0,0003	144,68	6,91	3200,00
0,75	0,0005	153,67	6,51	2133,33
1	0,0006	163,46	6,12	1600,00
1,5	0,0009	167,34	5,98	1066,67
2	0,0013	182,70	5,47	800,00
3	0,0019	200,50	4,99	533,33
4	0,0025	209,78	4,77	400,00
5	0,0031	212,15	4,71	320,00
10	0,0063	215,78	4,63	160,00
15	0,0094	224,64	4,45	106,67
20	0,0125	230,68	4,34	80,00
25	0,0156	232,72	4,30	64,00
30	0,0188	233,72	4,28	53,33
35	0,0219	241,00	4,15	45,71

Ettalibi e Baratti (2001), imobilizando inulinases de *Aspergillus ficuum*, obtiveram valores de 0,060M para k_m e 192U.g⁻¹ para $v_{m\acute{a}x}$, utilizando sacarose como substrato. Nguyen *et al.* (2011), avaliando os parâmetros cinéticos de k_m e $v_{m\acute{a}x}$ da inulinase livre e imobilizada em quitina, encontraram valores de

2,04% (w/v) e 80,88U/mg, e 2,19% (w/v) e 291,58U/g, respectivamente, utilizando sacarose como substrato.

Tabela 8 - Valores de k_m e $v_{m\acute{a}x}$ obtidos para hidrólise de sacarose e inulina na enzima livre e imobilizada.

Enzima	Sacarose		Inulina	
	k_m (mM)	$v_{m\acute{a}x}$ (mol.L.min ⁻¹)	k_m (mM)	$v_{m\acute{a}x}$ (mol.L.min ⁻¹)
Enzima livre	2,94	0,0527	8,71	0,0175
Enzima imobilizada	1,46	0,2487	0,38	0,2396

Fazendo uso de montmorillonita K-10 como suporte para a imobilização de invertase, os autores Sanjay e Sugunan (2005), obtiveram os seguintes valores para k_m 70,36mg.mL⁻¹ e $v_{m\acute{a}x}$ 6,57 x 10⁻⁴ mol ml⁻¹ min⁻¹ utilizando a sacarose como substrato.

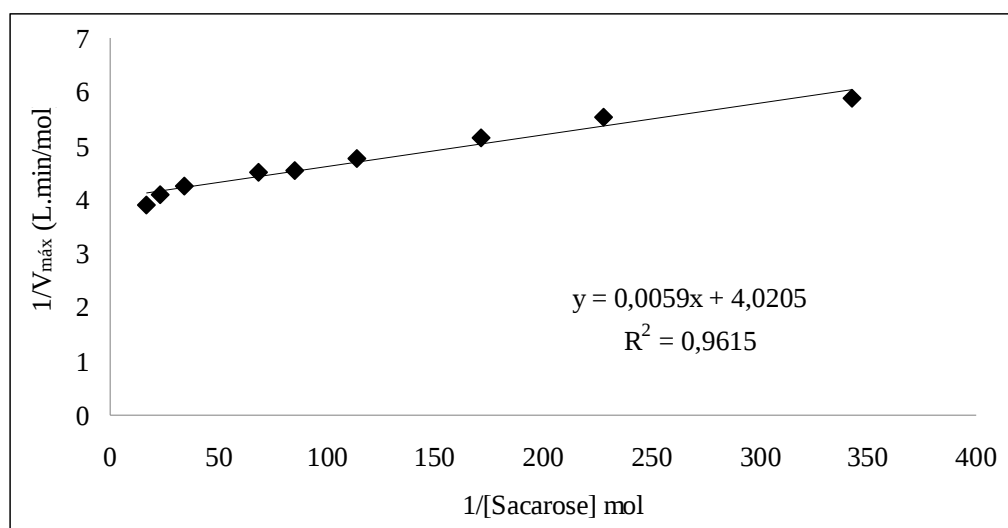


Figura 16 - Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e $v_{m\acute{a}x}$ pelo método de Lineweaver-Burk para sacarose.

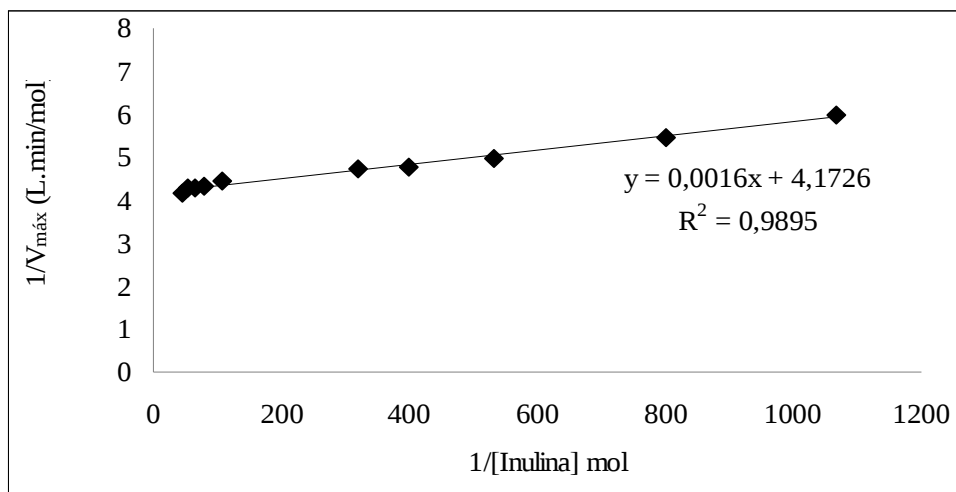


Figura 17 - Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e $v_{\text{máx}}$ pelo método de Lineweaver-Burk para inulina.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

Neste trabalho foi estudada a influência das variáveis no processo de imobilização inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571 em suporte inorgânico e posterior caracterização parcial da enzima imobilizada.

A melhor condição para o processo de imobilização da inulinase não comercial, foi na diluição 3:10 (enzima/tampão) com um valor de atividade específica de 233,17U/mg de proteína, atingindo um percentual de retenção da enzima no suporte de 42,08% e um rendimento de 63,67%. Por meio do planejamento de experimentos foi verificado que 10 minutos de imobilização representou tempo suficiente para a adsorção da enzima no suporte.

Na avaliação da estabilidade térmica na faixa de 40 a 70°C, foi verificado que a enzima imobilizada permaneceu de 456 a 1826 horas de estabilidade. As baixas temperaturas (4, -10, -80°C) permaneceram por 1968 horas sem perda significativa da atividade. Com relação aos pHs avaliados, o pH de 3,5 conduziu a maior atividade da enzima imobilizada. Quanto aos parâmetros cinéticos calculados, os valores de k_m para sacarose e inulina foram 1,46 e 0,38mM, respectivamente, e os valores de $v_{m\acute{a}x}$ foram de 0,2487 e 0,2396mol.L.min⁻¹ para sacarose e inulina, respectivamente.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

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

- Analisar a eficiência da imobilização por meio de análise do suporte, da enzima livre e da enzima imobilizada, por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Aplicação de fluidos pressurizados como tratamento na tentativa de aumentar a atividade enzimática;
- Avaliação do comportamento da enzima imobilizada em ultrassom.
- Avaliar o uso repetido da enzima imobilizada nas reações de hidrólise e síntese.

- Aplicação da enzima imobilizada como catalizador em reações de síntese de fruto-oligossacarídeos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilized enzymes. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. (Ed.). **Enzymes in food processing**. San Diego: Academic Press, cap. 5, p. 103-119, 1993.

AKGÖL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. **Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres**. Food Chemistry, v. 74, p. 281-288, 2001.

ASTOLFI, V. **Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2010.

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.

BASHA, S. Y.; PALANIVELU, P. **A novel method for immobilization of invertase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus***. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 16, p. 151-154, 2000.

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.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**, Rio de Janeiro, cap 6. 2008.

BRÍGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lípase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), 2006.

CABRAL, J. M. S.; KENNEDY, J. F. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: TAYLOR, R. F. (Ed.). **Protein immobilization: Fundamentals and applications.** New York: Marcel Dekker, cap. 3, p. 73-138, 1991.

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

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.

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

CHI, Z. M.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G. L.; YUE, L. **Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases**. Applied Microbiology and 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.

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. 461-466, 2004.

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

DUMITRIU, E.; SECUNDO, F.; PATARIN, J.; FECHETE I. **Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 22, p. 119-133, 2003.

ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. **Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices**. Reactive & Funcional 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.

FUENTES, I. E., VISERAS, C. A., UBIALI, D., TERRENI, M., ALCANTARA, A. R. **Different phyllosilicates as supports for lipase immobilization**. Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic, v. 11, p. 657–663, 2001.

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

GIACOMMINI, ET AL. **Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilization chemistry on the properties of immobilized b-galactosidases.** Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic, v. 11, p. 597-606, 2001.

GITLESEN T., BAUER M., ADLERCREUTZ P. **Adsorption of lipase on polypropylene powder.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1345, p. 188-196, 1997.

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.

GOULART, A. J. **Imobilização multipontual de invertase e inulinase em Suportes sólidos: caracterização físico-cinética dos derivados estabilizados.** Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista (UEP), 2007.

GOPINATH, S., SUGUNAN, S. **Enzymes immobilized on montmorillonite K-10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity.** Applied Clay Science, v. 35, p. 67-75, 2007.

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

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.

KEMENY, D. M., CHALLACOMBE, S. J. In: **Elisa and other solid phase immunoassays**. New York, John Wiley & Sons Ltda, 1988.

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

KENNEDY, J. F. e ROIG, M. G. **Principles of immobilization of enzymes**. In: **Handbook of enzyme biotechnology**. 3 ed. London, T. P. Press, 1995.

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.

KRAGL, U; DWARS, T. **The development of new methods for the recycling of chiral catalysts**. Trends in Biotechnology, v.19, p.442-449, 2001.

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.

LI, Y.; ZHOU, G.; LI, C.; QIN, D.; QIAO, W.; CHU, B. **Adsorption and catalytic activity of porcine pancreatic lipase on Rod-like SBA-15 mesoporous**

material. Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects, v. 341, p. 79-85, 2009.

LI, Y.; ZHOU, G.; QIAO, W.; WANG, Y. **Immobilization of porcine pancreas lipase on fiber-like SBA-15 mesoporous material.** Materials Science and Engineering. B, v. 162, p. 120-126, 2009.

MACARIO, A.; KATOVIC, A.; GIORDANO, G.; FORNI, L.; CARLONI, F.; FILIPPINI, A.; SETTI, L. **Immobilization of lipase on microporous and mesoporous materials: studies of the support surfaces.** Studies in Surface Science and Catalysis, v. 155, p. 381-394, 2005.

MACARIO, A.; CALABRÒ, V.; CURCIO, S.; PAOLA, M.; GIORDANO, G.; IORIO, G.; KATOVIC, A. **Preparation of mesoporous materials as a support for the immobilization of lipase.** Studies in Surface Science and Catalysis, v. 142, p. 1561-1568, 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.

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

MAZUTTI, M. A.; SKOVRONSKI, A.; BONI, G.; ZABOT, G.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H. **Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a**

comparative study. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2009. DOI 10.1007/s12010-009-8687-8.

MENONCIN, S.; DOMÍNGUES, N. M.; FREIRE D. M. G.; TONIAZZO, G.; CANSIAN R. L.; Oliveira J. V.; DI LUCCIO M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. **Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran**, 2008: DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

MEUNIER, S. M.; LEGGE, R. L. **Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 62, p. 53–58, 2010.

MILLER, G. H. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

MUNARETTO, C. B. **Imobilização da inulinase de *kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em carvão ativado e alginato de sódio.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2011.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA K. **On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 91, p. 232-244, 2002.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CZUKORB, B.; HOSCHKEA, Á. **Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase.** Process Biochemistry, v. 46, p. 298-303, 2011.

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.

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.

RISSO, F. V. A.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Comparison between systems for synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.** Food and Bioprocess Technology, v. 101007, p. 11947-009-02721, 2009.

RISSO, F.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; COSTA, F. A. de A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Effect of organic solvent on the characteristics of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045.** Food Technology and Biotechnology, v. 48, p. 143-150, 2010.

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

RODRIGUES, R. C.; BOLIVAR, J.M.; PALAU-ORS, A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. **Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 44, p. 386-393, 2009a.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; FILICE, M.; BOLIVAR, J.M.; PALAU-ORS, A. ; GARCIA-VARGAS, J. M.; ROMERO, O.; WILSON, L.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. **Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus***. Process Biochemistry, v. 44, p. 641-646, 2009b.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. **Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: critical role of chemical amination**. Process Biochemistry, v. 44, p. 963-968, 2009c.

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

ROSSETTO, E., BERALDIN, R., PENHA, F. G., PERGHER, S. B. C. **Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes**. Química Nova. v. 32, p. 2064-2067, 2009.

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

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. **Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching**. Catalysis Communications, v. 6, p. 81-86, 2005.

SANTOS, A. M. P. **Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Tese de

Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

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

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A. **Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: Aplicação na síntese de ésteres**. Química Nova, v. 30, p. 1182-1187, 2007.

SERRALHA, F. N.; LOPES, J. M.; LEMOS, F.; RIBEIRO, R.; PRAZERES, D. M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. **Application of factorial design to the study of an alcoholysis transformation promoted by cutinase immobilized on NaY zeolite and Accurel PA6**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 27, p. 19-27, 2004.

SILVA, M. F. **Produção e caracterização parcial de lípases de *Penicillium Verrucosum* e *Penicillium brevicompactum* utilizando como substratos torta de babaçu e farelo de mamona**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2010.

SISO, M. I. G.; LANG, E.; CARREÑO-GÓMEZ, B.; BECERRA, M.; ESPINAR, F. O.; MÉNDEZ, J. B. **Enzyme encapsulation on chitosan microbeads**. Process Biochemistry, v. 32, n. 3, p. 211-216, 1997.

SPAGNA, G., PIFFERI, P. G., GILIOLI, E. **Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology**. Enzyme and Microbial Technology, v. 17, p. 729-738, 1995.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. **Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules**. Process Biochemistry, v. 36, p. 1081 -1083, 2001.

VANDAMME, 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.

VERMUË, M. H.; TRAMPER, J.; **Biocatalysis in non-conventional media: medium engeneering aspects**. Pure & Applied Chemistry, v. 67, p. 345-373, 1995.

VICENTE, A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. Dissertação de Mestrado. 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, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de 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.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W.; **Fundamentos de Bioquímica**, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, cap 4, 2000.

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.

YESILOGLU, Y. **Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase**. Process Biochemistry, v. 40, p. 2155-2159, 2005.

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.