

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

**AGENTES ENCAPSULANTES E TECNOLOGIA DE SPRAY**  
**DRYING NA IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE**

**Gabriela Pegoraro Zemolin**

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

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**JANEIRO DE 2011**

# **AGENTES ENCAPSULANTES E TECNOLOGIA DE SPRAY DRYING NA IMOBILIZAÇÃO DE INULINASE**

Gabriela Pegoraro Zemolin

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. Helen Treichel, D. Sc.  
Orientador (URI – Campus de Erechim)

---

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti, D. SC.  
Orientador (URI – Campus de Erechim)

---

Prof. Morgana Karin Pierozan, D. Sc.  
(UDESC)

---

Prof. Altemir Mossi, D. Sc  
(UFFS-Campus de Erechim)

---

Prof. Clarissa Dalla Rosa, D. Sc  
(URI-Campus de Erechim)

Erechim, 07 de janeiro de 2011

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu “*noivo-marido*” Luciano!!!

Pelo seu amor, carinho, compreensão e constantes palavras de incentivo.

E, principalmente, por existir e fazer parte da minha vida!!!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Ser Superior, pela Vida! Obrigada por me amar o suficiente e permitir que me aconteça somente aquilo que eu possa suportar.

Ao Luciano, meu amor, pela sua paciência, por escutar, compreender, por simplesmente estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha família, meus pais, Rita e João, que apesar da distância estão sempre perto com o coração.

À minha segunda família, meus sogros, Vilma e Bertilo, por me receberem tão carinhosamente e pelas constantes palavras de incentivo. E à Anelise, minha cunhada, por todas as dicas, por me escutar e compreender minhas dificuldades.

Em especial, aos meus orientadores, Helen e Marcio, por compartilharem seu tempo e me emprestarem um pouco dos seus conhecimentos, pela paciência, incentivo, palavras de motivação e incentivo. Obrigada pela confiança. Gostaria ainda de expressar minha admiração, respeito e carinho.

Aos meus bolsistas, Michele Gazoni e Giovani Zobot, pela colaboração na execução deste trabalho, pela prestatividade e disponibilidade em me ajudar, e principalmente pela amizade.

À Simone Golunski, por ser verdadeiramente colega e amiga.

Aos demais colegas do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI Campus de Erechim e dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Vegetal, que de uma forma ou outra contribuíram no desenvolvimento de meus experimentos.

À URI – Campus de Erechim e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

Às minhas colegas do Curso de Nutrição/URI, pelas “cobranças”, compreensão e incentivo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Dizem que o que procuramos é um sentido para a vida. Penso que o que procuramos são experiências que nos façam sentir que estamos vivos.”

(J. Campbell)

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.

## Agentes Encapsulantes e Tecnologia de *Spray Drying* na Imobilização de Inulinase

Gabriela Pegoraro Zemolin

Orientadores: Helen Triechel

Marcio Antonio Mazutti

O objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade da imobilização de inulinase obtida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, através da estratégia de imobilização e desidratação em *Spray Drying* (SD). A inulinase foi produzida em um reator leito fixo por fermentação em estado sólido, usando resíduos agroindustriais como substrato. O extrato de inulinase bruto, após 24 h de fermentação, apresentou atividade de  $185,7 \pm 9,58 \text{ U.gds}^{-1}$ . Inicialmente, foram realizados testes preliminares de imobilização com maltodextrina e goma arábica, seguido de desidratação em SD. A partir dos resultados obtidos, foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$ , tendo como variáveis de estudo: temperatura do ar de secagem na entrada do *Spray Drying*, proporção dos agentes encapsulantes maltodextrina/goma arábica e volume de extrato enzimático. Foi obtida uma atividade enzimática máxima de 292,42 U/g, quando se utilizou 70 mL de extrato enzimático, uma concentração de maltodextrina: goma arábica (M:G) 20:80, à temperatura de 200°C. Após esta etapa, foram realizados testes com variações de volume do extrato enzimático (80, 100 e 120 mL), mostrando que esta variável influenciou positivamente a atividade da enzima. Ensaios de precipitação enzimática em etanol a 70% (60mL), seguidos de imobilização com 70mL de extrato enzimático, concentração de malto/goma 0:100, a 150° C foram

realizados, obtendo-se um incremento percentual de 422,03% na atividade enzimática. Após, foram realizados testes experimentais para síntese de FOS em meio orgânico e aquoso, obtendo um rendimento (YFOS) de 5,2% em meio orgânico e 4,5% em meio aquoso, após 8 horas de reação. O estudo da caracterização parcial da enzima precipitada com 70% de etanol, imobilizada em goma arábica e desidratada em SD a 155°C mostrou que a inulinase apresenta maior estabilidade em temperatura de 50° C e pH de 4,0, 4,5 e 5,0.

Abstract of Dissertation submitted to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining a Master Degree in Food Engineering.

## Encapsulants Agents and Spray Drying Technology in the immobilization of inulinasis

Gabriela Pegoraro Zemolin

Advisors: Helen Triechel

Marcio Antonio Mazutti

The aim of this work was to study the possibility of immobilization of inulinasis obtained from the yeast *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, by the strategy of immobilization and dehydration in Spray Drying (SD). The inulinasis was produced in a fixed bed reactor by fermentation in solid state, using agro-industrial residues as substrate. The crude inulinasis extract, after 24h of fermentation, showed an activity of  $185.7 \pm 9.58$  U.gds<sup>-1</sup>. Initially, preliminary tests of immobilization were conducted with maltodextrin and arabic gum, followed by dehydration in SD. From the obtained results, it was performed a full factorial project 2<sup>3</sup>, with the study variables: drying air temperature at the entrance of Spray Drying, proportion of the encapsulant agentsf maltodextrin/arabic gum and volume of enzymatic extract. It was obtained a maximum enzymatic activity of 292.42 U/g, when using 70 mL of enzymatic extract, a concentration of maltodextrin: Arabic gum (M:G) 20:80 at a temperature of 200°C. After this stage, tests were performed with variations in the volume of the enzymatic extracts (80, 100 and 120mL), showing that this variable positively influenced the enzymatic activity. Tests for enzymatic precipitation in 70% ethanol (60mL), followed by immobilization with 70ml of enzymatic extract, concentration of maltodextrin/gum 0:100, 150°C were performed, resulting in an increase of 422.03% in the enzymatic activity. Following, tests were carried out for synthesis of FOS in organic and aqueous media, obtaining an income (YFOS) of 5.2% in organic media and 4.5% in

aqueous media after 8 hours of reaction. The study of partial characterization of the enzyme precipitated with 70% ethanol, immobilized in Arabic gum and dehydrated in SD at 155°C showed that inulinase has greater stability at the temperature of 50°C and pH 4.0, 4.5 and 5.0.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
SUMÁRIO.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
I.1 Inulinases.....	6
I.2 Fermentação em Estado Sólido.....	7
I.3 Produção de Inulinase por FES.....	8
I.4 Imobilização.....	11
I.4.1. <i>Spray Drying</i> .....	12
I.5 Frutooligossacarídeos.....	15
I.6 Caracterização.....	17
I.6.1 Temperatura Ótima e Termoestabilidade.....	17
I.6.2 pH Ótimo e Estabilidade do pH.....	19
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
II.1 Micro-organismo, Pré-inóculo e Substratos – 1º Etapa.....	23
II.2 Fermentação em Estado Sólido – 1º Etapa.....	23
II.3 Imobilização em Maltodextrina e Goma Arábica – 2º Etapa.....	25
II.3.1 Planejamento de Experimentos – 3º Etapa.....	25
II.4 Precipitação Enzimática – 4º Etapa.....	26
II.5 Variações no Volume do Extrato Enzimático – 5º Etapa.....	26

II.6 Síntese de Frutooligossacarídeos (FOS): Testes Experimentais em Meio Orgânico e Aquoso - 6º Etapa.....	27
II.7 Caracterização da Inulinase Precipitada, Imobilizada em Goma Arábica e Desidratada em <i>Spray Drying</i> – 7º Etapa.....	27
II.7.1 Temperatura de Estabilidade.....	27
II.7.2 pH de Estabilidade.....	29
II.8 Métodos Analíticos.....	29
II.8.1 Determinação da Atividade Enzimática.....	29
II.8.2 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	30
II.8.3 Determinação de Proteína.....	30
II.8.4 Determinação de Frutooligossacarídeos.....	30
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
III.1 Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	32
III.2 Teste Preliminar de Imobilização de Inulinase por <i>Spray Drying</i> Usando Maltodextrina e Goma Arábica.....	33
III.3 Planejamento de Experimentos.....	34
III.4 Testes de Variações de Volume de Extrato Enzimático.....	39
III.5 Precipitação de Inulinase em Etanol a 70%, Imobilização e Desidratação.....	40
III.6 Testes Experimentais de Síntese de FOS em Meio Orgânico e Aquoso.....	41
III.7 Caracterização Parcial da Inulinase.....	44
III.7.1 Influência da Temperatura na Estabilidade da Inulinase.....	44
III.7.2 Influência do pH na Estabilidade da Inulinase.....	52
CONCLUSÕES.....	56
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 Desenho esquemático de um <i>Spray Drying</i> .....	14
Figura I.2: Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).....	17
Figura II.1: Fluxograma das etapas desenvolvidas.....	22
Figura II.2: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo empregado neste estudo: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO <sub>2</sub> , temperatura e umidade.....	24
Figura III.1. Superfície de Resposta e Curva de Contorno para atividades da inulinase.....	37
Figura III.2. Síntese de frutooligossacarídeos em meio orgânico após 8 horas. ....	41
Figura III.3. Síntese de frutooligossacarídeos em meio aquoso após 8 horas.....	41
Figura III.4. Conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) em meio orgânico e aquoso.....	42
Figura III.5. Influência da Temperatura na Estabilidade da Inulinase Imobilizada e Desidratada.....	49
Figura III.6. Gráfico linearizado para a Equação de Arrhenius.....	51
Figura III.7. Influência do pH na Estabilidade da Inulinase Imobilizada e Desidratada.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela II.1. Valores utilizados no primeiro planejamento fatorial completo $2^3$ .....	26
Tabela III.1. Atividade enzimática após imobilização e desidratação.....	33
Tabela III.2. Matriz do planejamento de experimentos .....	34
Tabela III.3. Análise dos efeitos dos termos do modelo para a atividade da inulinase, após imobilização e desidratação.....	36
Tabela III.4. ANOVA para atividades enzimáticas.....	37
Tabela III.5. Atividade enzimática, proteína e atividade específica após testes de variações de volume de extrato enzimático.....	39
Tabela III.6. Atividade enzimática, proteína e atividade específica após testes de precipitação enzimática, imobilização e desidratação.....	40
Tabela III.7. Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 50° C.....	44
Tabela III.8. Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 55° C.....	45
Tabela III.9. Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 60° C.....	46
Tabela III.10. Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 65° C.....	47
Tabela III.11. Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 70° C.....	48
Tabela III.12. Valores de desativação térmica para cada temperatura estudada..	50
Tabela III.13. Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados.....	53

## **INTRODUÇÃO**

Os conceitos de alimentação e nutrição têm merecido especial atenção nos últimos tempos. A crescente preocupação com alimentação saudável e qualidade de vida traz à tona temas como nutrição funcional e alimentos funcionais. Neste contexto, o uso de alimentos que promovam um estado de bem-estar, melhoria da saúde e redução do risco de doenças tornaram-se populares e o consumidor está se tornando cada vez mais consciente dos seus benefícios à saúde (MUSSATTO & MANCILHA, 2007). O estudo dos alimentos funcionais e o desenvolvimento de produtos alimentícios que tragam benefícios à saúde humana vêm sendo cada vez mais explorados pela indústria alimentícia. A fabricação de produtos alimentares que conferem benefícios à saúde é uma tendência relativamente nova, e reconhece a crescente aceitação do papel da dieta na prevenção da doença, tratamento e bem-estar. Esta mudança de atitude para a concepção e desenvolvimento de produtos tem forçado as organizações e indústrias envolvidas na formulação de alimentos para beneficiar a saúde em novas áreas de conhecimento (SANGEETHA, RAMESH & PRAPULLA, 2005).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos de ocorrência natural em produtos de origem vegetal, principalmente. São chamados açúcares não convencionais e têm apresentado impacto na indústria do açúcar, devido às suas excelentes características funcionais em alimentos, além de seus aspectos fisiológicos e físicos (PASSOS & PARK, 2003).

Os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina são carboidratos de reserva encontrados em algumas espécies vegetais. São homopolímeros lineares formados por unidades de frutose na posição  $\beta$ -2,1 e, eventualmente, por uma unidade de glicose terminal em posição  $\beta$ -1,2 (ASTOLFI, 2010). A inulinase é largamente estudada na literatura científica como enzima utilizada na produção de xaropes com alto teor de frutose, etanol, inulo-oligossacarídeos, ácido glucônico, sorbitol, acetona e butano, principalmente. Ela pode ser encontrada em fungos filamentosos, leveduras terrestres, bactérias e tecidos de armazenamento de plantas.

Historicamente, muitos micro-organismos são estudados para a produção de inulinase, entre eles destaca-se o gênero *Kluyveromyces*, sendo que a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 apresenta vantagens como crescimento

rápido em altas concentrações celulares e alto rendimento da enzima, principalmente em meios contendo resíduos agroindustriais.

A produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido (FES) tem recebido muita atenção nos estudos em biotecnologia para a produção de lipases, inulinasas, proteases, etc. A utilização de resíduos de baixo custo, as maiores produtividades, baixas exigências de energia, menor produção de resíduos, a estabilidade estendida de produtos e baixos custos de produção são algumas das principais vantagens da FES (MAZUTTI *et al.*, 2006). Recentemente, trabalhos na literatura vêm reportando a produção de inulinase por FES, utilizando resíduos agroindustriais como bagaço de cana e água de maceração de milho, como alternativa de aplicação industrial e baixos custos de produção.

O método de imobilização de enzimas é particularmente eficaz por permitir a reutilização contínua do biocatalizador, maior estabilidade enzimática em faixas mais amplas de temperatura e pH, além de evitar a contaminação do produto. A imobilização de inulinase tem sido avaliada por vários autores e o uso de um método de imobilização barato e simples, mas eficaz, seria de se esperar a desempenhar um papel importante nas indústrias de alimentos em que o xarope de frutose é amplamente utilizado (PAULA *et al.*, 2008). Imobilização de inulinase em matriz de gel, pedra-pomes, esponja de poliuretano, aprisionamento em alginato de cálcio são algumas das técnicas utilizadas. Não há relatos na literatura sobre imobilização de enzimas por agentes encapsulantes como maltodextrina e goma arábica.

A tecnologia de *Spray Drying* (SD) é largamente utilizada em inúmeros processos industriais como produção de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos e cosméticos. Na indústria alimentícia, destaca-se a produção de leite em pó, sucos, secagem de erva-mate, além de microencapsulação antocianinas de cenoura preta e bagaço de uva. Na indústria alimentícia, a microencapsulação é empregada principalmente para melhorar a estabilidade dos alimentos, aumentando o tempo de armazenamento e mantendo o valor nutritivo. A técnica oferece diversas vantagens, tais como baixo custo de operação, alta qualidade das micropartículas produzidas, capacidade de processar diversas matérias-primas, produção de micropartículas com elevada área superficial,

processo de etapa única e apresenta flexibilidade na formulação do material empregado (OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, há poucos relatos de estudos científicos avaliando estratégias de utilização de SD em enzimologia.

Com base nestes aspectos, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a viabilidade da imobilização de inulinase obtida por FES a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, através da estratégia de imobilização e desidratação em *Spray Drying*.

Para atender este objetivo, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

1. Testes preliminares de imobilização com maltodextrina e goma arábica e desidratação em SD de inulinase;
2. Otimização das condições de secagem/imobilização, usando a metodologia de planejamento de experimentos;
3. Precipitação enzimática em etanol 70%, seguida de imobilização e desidratação na condição otimizada no planejamento experimental;
4. Caracterização da inulinase precipitada, imobilizada e desidratada em SD.
5. Ensaio para produção de frutooligossacarídeo (FOS) em meio orgânico e aquoso.

Como forma de apresentação, o presente trabalho foi dividido em capítulos. O Capítulo I apresenta uma revisão da literatura acerca dos principais assuntos abordados neste trabalho. São enfocados temas como a importância e aplicação da inulinase na indústria alimentícia, aspectos da fermentação em estado sólido (FES) e da produção de inulinase por FES, imobilização enzimática, tecnologia de *Spray Drying* e avaliação do pH e temperatura na estabilidade enzimática. O Capítulo II apresenta os materiais e métodos empregados para o desenvolvimento de todas as etapas do trabalho. No Capítulo III são apresentados e discutidos os resultados obtidos, com um confronto com a literatura disponível. Nos tópicos finais, são apresentadas as conclusões obtidas com a realização deste trabalho juntamente com as sugestões para trabalhos futuros e as referências bibliográficas.

## **CAPÍTULO I**

---

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## I. 1 Inulinases

Inulinases são 2,1- $\beta$ -D frutano furohidrolase (CE 3.2.1.7), que hidrolisam inulina, um polímero de frutose encontrado em muitas espécies como os tubérculos de dália, alcachofra de Jerusalém e raízes de dente-de-leão ou chicória (PAULA *et al.*, 2008). Além destes, leveduras terrestres, fungos filamentosos, bactérias, e alguns derivados de levedura de cepa marinha também podem produzir elevado nível de inulinase (ZHANG *et al.*, 2009).

As inulinases são úteis para a produção de frutooligosacarídeos, os quais possuem propriedades nutricionais e funcionais, sendo usados em dietas de baixa caloria, estimulação de Bifidus e como fonte de fibra alimentar nas preparações alimentícias (SILVA-SANTISTEBAN & MAUGERI, 2005). Inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes de frutose (EHF) a partir da hidrólise enzimática de inulina, com altos rendimentos, de até 95% (ETTALIBI & BARATTI, 2001). A produção de frutose através da hidrólise do amido convencional inclui três etapas: a ação da alfa-amilase, amilo glicosidase e glicose isomerase, resultando em apenas 45% de frutose como produto final devido ao equilíbrio termodinâmico da reação (MAZUTTI, *et al.*, 2010b).

Comparada à sacarose, a frutose é considerada uma alternativa segura porque tem maior capacidade edulcorante, com efeitos benéficos em pacientes diabéticos e aumento na absorção de ferro em crianças. O uso da sacarose está associado a uma série de problemas como a corpulência, cariogenicidade, aterosclerose e o diabetes (CHEN *et al.*, 2009).

Outras aplicações importantes da inulinase estão na produção de etanol, inulo-oligosacarídeos, ácido glucônico, sorbitol, pululana e acetona-butanol. A produção de inulinase é afetada pela composição do meio e do tipo de organismo utilizado para a fermentação. Para a produção comercial de uma enzima, fatores como micro-organismos de alto rendimento, uma matéria-prima barata e sua viabilidade são consideradas (SINGH, DHALIWAL, PURI, 2006).

Inulinase microbiana pode ser dividida em exo e endo-enzima, agindo de acordo com sua ação sobre inulina. Endoinulinases (2,1  $\beta$ -D frutano frutanohidrolase; EC 3.2.1.7) são específicas para a hidrólise de inulina e ligações

internas de  $\beta$ -2,1-frutofuranosídico para produzir inulooligosacarídeos como os principais produtos, por exemplo, inulotriose, inulotetraose e inulopentaose. Exoinulinasas ( $\beta$ -D frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.80), sucessivamente, cisão unidades de frutose a partir do terminal de redução final não de inulina, bem como a hidrólise de sacarose e rafinose (CHEN *et al.*, 2009).

## I. 2 Fermentação em Estado Sólido

Fermentação em Estado Sólido (FES) é definida como aquela em que o crescimento microbiano e a formação do produto ocorrem em um substrato sólido na ausência de água livre (MAZUTTI *et al.*, 2010b). Uma das principais características da Fermentação em Estado Sólido (FES) é a utilização de substratos com baixa atividade de água, na qual as condições de crescimento aproximam-se do habitat natural de fungos, o que facilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (MENONCIN, DOMINGUES, FREIRE, OLIVEIRA, Di LUCCIO, TREICHEL & OLIVEIRA 2009).

A Fermentação em Estado Sólido (FES) apresenta algumas vantagens como a disponibilidade de recuperação de bioproduto, além do uso de substratos naturais como suporte nutricional. Vários resíduos agrícolas ou agroindustriais, celulósicos ou amiláceos, têm sido utilizados em Fermentação em Estado Sólido, tais como: bagaço de cana, bagaço de mandioca, arroz e farelo de trigo, palha de café, e outros (ALBERTON, VANDENBERGHE, ASSMANN, FENDRICH, RODRIGUÉZ-LEÓN, & SOCCOL, 2009). Outras vantagens da FES estão na utilização de resíduos de baixo custo, maiores produtividades, baixos requerimentos de energia, menor produção de águas residuais, estabilidade estendida de produtos e baixos custos de produção (MAZUTTI *et al.*, 2006).

No entanto, o uso de FES também apresenta desvantagens, tais como: dificuldades de homogeneização, devido à natureza sólida dos substratos, tendo como resultados os gradientes de temperatura, água e metabólitos ao longo do

leito (ASHLEY, MITCHELL & HOWES, 1999), a ausência de água livre, dificuldades no controle da concentração de células, pH, temperatura e umidade (HAMIDI-ESFAHANI *et al.*, 2007), dificuldades de aumento de escala, principalmente associadas com a remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento dos micro-organismos (LEKANDA & PÉREZ-CORREA, 2004).

Outros aspectos importantes em FES são a seleção das variáveis do processo que possuem efeito sobre o mesmo, bem como a sua otimização. Nisso incluem-se os parâmetros físico-químicos e bioquímicos, tais como: tamanho de partícula, umidade inicial, pH, pré-tratamento dos substratos, umidade relativa, temperatura de incubação, agitação, aeração, idade e tamanho do inóculo, suplementação de nutrientes, extração do produto e purificação do mesmo, entre outros (PANDEY, 2003). Para a otimização dessas variáveis, a utilização da metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta é uma boa ferramenta e pode auxiliar na escolha das faixas apropriadas que levam à otimização do processo (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

### **I. 3 Produção de Inulinase por FES**

Apesar da produção de inulinase ser extensivamente estudada em Fermentação Submersa FS, o primeiro artigo reportando sua produção por FES foi publicado por Selvakumar e Pandey (1999), que investigaram a influência de diversos resíduos agroindustriais na produção de inulinase, usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466 e uma nova bactéria do gênero *Staphylococcus*. Entre os resíduos testados encontram-se farelos de trigo e arroz, casca de arroz, farinha de milho e torta de coco. As atividades máximas obtidas para os micro-organismos *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466 e *Staphylococcus* foram 123 U.gds<sup>-1</sup> (gds = grama de substrato seco) em 72 horas de fermentação e 108 U.gds<sup>-1</sup> em 48 horas de fermentação, respectivamente. Os dois micro-organismos apresentaram melhor desempenho em meio contendo somente farelo de trigo a 37°C e 65% de umidade.

Bender *et al.* (2006) usaram bagaço de cana para a produção de inulinase usando o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Foram

investigados os efeitos da temperatura de fermentação, umidade inicial do bagaço, concentração de melaço de cana e concentração de água de maceração de milho (AMM), através do uso da metodologia de planejamento de experimentos. A máxima atividade encontrada foi de  $445 \text{ U.g}^{-1}$  em 72 horas de fermentação com 23,4% de AMM (p/p – base seca),  $40^\circ\text{C}$  e umidade inicial de 65% (base seca). A adição de melaço de cana apresentou efeito negativo para o processo, diminuindo a atividade final. Os autores associam essa queda na atividade à presença de compostos inibidores no melaço de cana, uma vez que esse não foi pré-tratado antes do seu uso na fermentação. Mazutti *et al.* (2006) otimizaram a concentração de AMM e a temperatura do processo de produção de inulinase. Na condição otimizada foi atingida uma atividade de  $392 \text{ U.gds}^{-1}$  a  $36^\circ\text{C}$  e verificou-se que a concentração de AMM não apresentou influência na faixa entre 13 e 27,1% em 96 horas de fermentação.

Xiong, Jinhua e Dongsheng (2007) otimizaram a concentração da suplementação do farelo de trigo para a produção de inulinase por FES, usando uma linhagem nova de *Kluyveromyces* S120. Na condição otimizada, contendo 12,7% de inulina, 10,8% de AMM e 1,6% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , foi possível a obtenção de  $410 \text{ U.gds}^{-1}$  de atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados a  $30^\circ\text{C}$  por 72 horas, onde a umidade inicial dos substratos foi corrigida para 80%. Ayyachamy *et al.* (2007) avaliaram o efeito de diversas fontes de carbono na produção de inulinase por FES usando a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego de alho, onde a máxima produção de enzima foi  $117 \text{ U.gds}^{-1}$  após 72 horas de fermentação.

Mazutti *et al.* (2007) avaliaram os efeitos dos parâmetros de processo sobre a produção de inulinase pelo micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, usando bagaço de cana como substrato. Foram investigados os efeitos de tamanho de partícula, densidade de inóculo, concentração de AMM e concentração de farelo de soja. Todos os experimentos foram realizados a  $36^\circ\text{C}$  e 65% de umidade. A máxima atividade obtida foi de  $250 \text{ U.gds}^{-1}$  em meio contendo 20% de AMM e 5% de farelo de soja. Além disso, a granulometria dos substratos ficou na faixa de 9/32 mesh e a densidade de inóculo  $1 \times 10^{10}$  células.mL<sup>-1</sup>. O uso de farelo de soja reduziu o tempo máximo de fermentação de 96 para 24 horas, o

que permitiu um aumento de 2 vezes na produtividade do processo quando comparado com o trabalho de Mazutti *et al.* (2006), mesmo com a atividade atingindo valores menores.

Guo *et al.* (2009) investigaram a produção de inulinase por FES, usando a levedura *Pichia guilliermondii*, a qual foi isolada de uma alga. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para a otimização do meio de cultura e das condições operacionais. Após a otimização, foi possível obter uma atividade enzimática de 455,9 U.gds<sup>-1</sup> após 24h de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5% de umidade inicial dos substratos, 2,5% de volume de inóculo, 0,42 a razão farelo de trigo/farelo de arroz, 30°C de temperatura e pH 6,5.

Sheng *et al.* (2009) otimizaram a produção de inulinase por FES, usando a levedura *Cryptococcus aureus*, a qual também foi isolada de uma alga. Após o processo de otimização, onde foi empregada a metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, foi possível a obtenção de uma atividade enzimática de 420,9 U.gds<sup>-1</sup> após 120h de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5% de umidade inicial dos substratos, 2,5% de volume de inóculo, 0,42 a razão farelo de trigo/farelo de arroz, 29°C de temperatura e pH 5,5.

Mazutti *et al.* (2010a), em seu estudo sobre a produção de inulinase a partir de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, por FES, em biorreator de leito fixo, utilizando bagaço de cana como substrato, obtiveram valores de atividade enzimática que variaram de 76,9±1,8 U.gds<sup>-1</sup> até 436,7±36,3 U.gds<sup>-1</sup>. As variáveis operacionais analisadas foram: massa inicial de células, temperatura e vazão volumétrica do ar de entrada. Após a otimização, a produção foi de 429±7 U.gds<sup>-1</sup> após 24 h de fermentação, conduzindo a uma produtividade de 18,2 U.gds<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 30°C, vazão volumétrica do ar de entrada de 2,2 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> e massa inicial de células de 22,0g.

#### I. 4 Imobilização

A técnica da imobilização enzimática é utilizada para fornecer estabilidade, facilitar a recuperação e reutilização de enzimas. As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, que podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação e que poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação (MENONCIN *et al.*, 2009).

A imobilização é um procedimento vantajoso, pois permite o uso contínuo das células, previne contaminações de produtos com as células, estabiliza a biocatálise e mantém as células igualmente distribuídas no reator de maneira que cada molécula de enzima é provida com igual suprimento do substrato (MORAES *et al.*, 2005).

Segundo Paula *et al.*, (2008), a imobilização da inulinase já foi avaliada por diversos autores, e o uso de um barato e simples, mas eficaz, método de imobilização é o que se espera nas indústrias de alimentos em que o xarope de frutose é amplamente utilizado. Estes mesmos autores estudaram um método simples para a imobilização de inulinase em uma matriz de gelatina, por aprisionamento em gel e em seguida, cruzada por tratamento com glutaraldeído. O rendimento de imobilização foi 82,60% e a quantidade de proteína ligada foi máxima para o suporte testado. A grande vantagem observada neste método é o seu baixo custo na imobilização em suporte de gelatina, associado ao seu alto rendimento.

Vários suportes têm sido usados para imobilizar inulinase. A inulinase de *Aspergillus ficuum* foi imobilizada em esferas de vidro poroso de diferentes porosidades, mantendo 70-77% de atividade da enzima. Estes dados podem ser comparados com inulinase de *Kluyveromyces fragilis*, que apresentou 22,5% de retenção e 54% de atividade quando imobilizados em tubo de Tygon e amino etil celulose, respectivamente. Já a inulinase de *Fusarium oxysporum* apresentou 30 - 40% de retenção em dietilaminoetil-celulose - DEAE-celulose (PAULA *et al.*, 2008).

Uma desvantagem dos métodos de imobilização é quando suportes caros são obrigatórios. Além disso, é necessário o uso de quantidades relativamente grandes de catalisador, e as técnicas de acoplamento covalente, comumente aplicadas para a imobilização de enzimas, envolvem várias etapas de reação que promovem modificações químicas do biocatalisador. As enzimas imobilizadas desta forma geralmente perdem a atividade em processo de imobilização (PAULA *et al.*, 2008).

#### **I.4.1 *Spray Drying***

*Spray Drying* é a transformação de um alimento do estado líquido em uma forma seca por pulverização, em um processo de secagem em meio quente. Esta técnica de secagem é utilizada em uma série de indústrias de processos para a produção de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos e cosméticos (GABITES, ABRAHAMSON & WINCHESTER, 2010).

Segundo Oliveira *et al.* (2009), a técnica de *Spray Drying* tem sido utilizada em diversos segmentos industriais devido à rápida e eficiente secagem de alimentos, produtos farmacêuticos, entre outras substâncias. Além do processo de desidratação, é amplamente usada para microencapsulação de produtos farmacêuticos aplicados em sistemas de liberação controlada de drogas. Na indústria alimentícia, a microencapsulação é empregada principalmente para melhorar a estabilidade dos alimentos, aumentando o tempo de armazenamento e mantendo o valor nutritivo.

Isono, Araya & Hoshino (1995) destacaram as principais vantagens do uso de *Spray Drying*: ( 1 ) materiais sensíveis ao calor podem ser secados à pressão atmosférica e à temperaturas baixas; ( 2 ) O processo *Spray Drying* permite um volume de produção em larga escala em funcionamento contínuo com equipamentos relativamente simples; ( 3 ) produtos desidratados em *Spray Drying* são relativamente homogêneos e; ( 4 ) embora a temperatura do gás de operação seja relativamente baixa, a eficácia é comparável à de outros tipos de secadores diretos.

Embora a tecnologia de *Spray Dryer* necessite de altos investimentos em instalações e operação, muitas são as razões pelas quais a mesma é muito utilizada. Estas vantagens incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais termossensíveis e termorresistentes, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas e a flexibilidade para a definição de um projeto com base na formulação. Para fazer uso dessas vantagens, existem diversos aspectos que devem ser considerados. Dentre eles, estão a avaliação da formulação e dos parâmetros de processo, o tipo específico de partícula a ser produzida e as propriedades do material utilizado (LANNES & MEDEIROS, 2003).

O processo de secagem de materiais em sprays é uma interação complexa, envolvendo aparelhos, processos e parâmetros do produto, o que afeta a qualidade final dos materiais. A qualidade de alimentação do *Spray Dryer* é bastante dependente dos parâmetros de operação do spray. A atomização é fortemente afetada pela vazão de alimentação, temperatura do ar de entrada, a velocidade do atomizador, concentração de alimentação, temperatura da alimentação, vazão de ar de admissão, etc. Cada um deles pode ter vários graus de efeito sobre o processo, que deve ser considerado durante o processo de secagem. Esta situação necessita da utilização de um sistema inteligente de controle automático, de precisão de unidades de secagem, com base no processo e os parâmetros do produto (CHEGINI, *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos com *Spray Drying* foram conduzidos em laboratório ou equipamentos em escala piloto. Isso facilita a medição das propriedades de fluxo, utilizando técnicas experimentais tais como a anemometria de fio quente e anemometria laser Doppler e, portanto, a validação de simulações através da metodologia de fluidodinâmica computacional. Estes estudos fornecem informações valiosas sobre o calor, transferência de massa e momento que ocorre entre as gotículas de líquido, a secagem do ar e partículas sólidas dentro de um *Spray Dryer*, mas eles não representam verdadeiramente a situação industrial (GABITES, ABRAHAMSON & WINCHESTER, 2010).

Imtiaz-UI-Islam e Langrish (2009) compararam a cristalização da sacarose e lactose em *Spray Dryers* de bancada, em diferentes temperaturas do gás de

entrada (90°C e 220°C). Os autores verificaram que é possível obter grandes mudanças no grau de cristalinidade do produto final no *Spray Dryer*, utilizando diferentes temperaturas de entrada do gás, em comparação com mudanças muito pequenas na cristalinidade de lactose para uma série similar de temperaturas de entrada. Estes resultados apoiam a sugestão de que a velocidade de cristalização está relacionada à diferença entre a temperatura do material e da temperatura de transição vítrea, uma vez que a sacarose tem muito menor temperatura de transição vítrea que a lactose.

A Figura I.1 apresenta um esquema de *Spray Drying* utilizado neste trabalho.

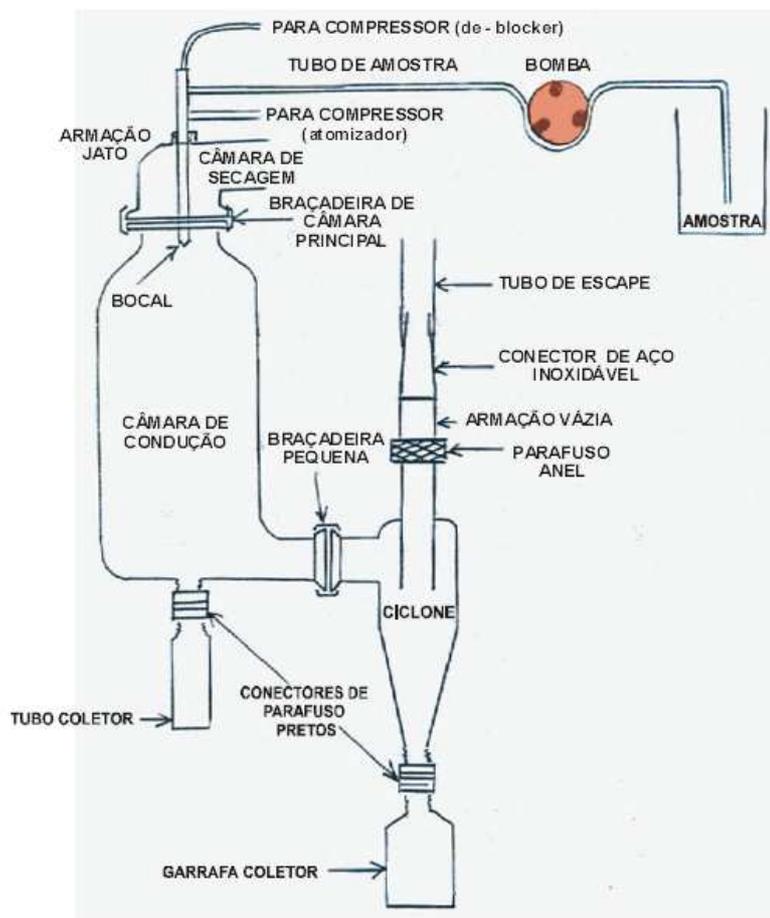


Figura I.1. Desenho esquemático de um *Spray Drying*

No que se refere à imobilização de enzima utilizando *Spray Drying*, Oliveira *et al.* (2009) imobilizaram a lacase (oxiredutase encontrada em plantas, insetos,

bactérias e fungos), em micropartículas de quitosana reticuladas com glicoxal e com tripolifosfato de sódio (TPP) obtidas por *Spray Drying*, visando à construção de biossensores para determinação de rutina em produtos farmacêuticos, obtendo resultados satisfatórios.

## **I. 5 Frutooligossacarídeos**

Oligossacarídeos são encontrados na superfície das células como glicoproteína ou glicolípido conjugado e desempenham importantes papéis estruturais e funcionais de numerosos processos biológicos reconhecidos. Esses processos incluem infecção viral ou bacteriana, a metástase do câncer, da resposta inflamatória inata e imunidade adaptativa, e muitos outros processos mediados por sinais de receptores. Oligossacarídeos e polissacarídeos são amplamente utilizados no setor de alimentos e cosméticos. Apesar de os frutooligossacarídeos (FOS) não desempenharem papel importante na superfície das células, têm recebido atenção especial devido às suas características funcionais em alimentos (BEINE *et al.*, 2008).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose com grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos, porque eles têm propriedades funcionais, baixo valor calórico, não são cariogênicos e podem ser usado por diabéticos. Além disso, podem diminuir os níveis de fosfolípidos, triglicerídeos e colesterol, ajudam na absorção intestinal de cálcio e magnésio, e estimulam o crescimento de bifidobactérias no cólon humano (MUSSATTO *et al.*, 2009).

Os FOS possuem características que permitem sua aplicação em várias áreas. Como apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, não podem ser considerados carboidratos ou açúcares nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por pacientes diabéticos. Têm solubilidade maior que o da sacarose, não cristalizam, não precipitam, e nem deixam sensação de secura ou areia na boca. Os FOS não são

degradados durante a maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolisados em frutose em condições muito ácidas e em condições de exposição prolongada de determinados binômios tempo / temperatura (PASSOS & PARK, 2003).

Os FOS são compostos principalmente de 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e frutofuranosil nistose (GF<sub>4</sub>), em que as unidades de frutose (F) são ligadas na posição beta- 2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros. (SÁNCHEZ, *et al.*, 2008). A formação de frutooligossacarídeos ocorre quando a sacarose (GF) é utilizada como substrato, tem-se como produtos glicose (G) e kestose (GF<sub>2</sub>). A sacarose age tanto como doador ou aceptor, assim 1 mol de glicose e 1 mol de kestose são formados simultaneamente, a partir de 2 moles de sacarose:  $2GF \rightarrow GF_2 + G$  (RISSO, 2004). Na figura II.2 é apresentada a estrutura química dos principais frutooligossacarídeos.

FOS são produzidos industrialmente a partir da sacarose por enzimas microbianas com atividade de transfrutossilacção, encontrado principalmente em fungos como *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Arthrobacter* e *Fusarium*. FOS comercial pode conter frutose, glicose e sacarose em mais de 500 g / kg de FOS total de peso seco (SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

Os desenvolvimentos recentes em enzimologia industrial tornaram possível a produção em grande escala de FOS por síntese enzimática. O processo industrial para a produção de FOS pode ser dividido em duas classes: a primeira é o sistema em lotes, usando uma enzima solúvel, a outra é o processo contínuo, utilizando células imobilizadas ou conjunto de enzimas. A inulinase é uma enzima importante no processamento de alimentos, principalmente utilizada para sintetizar FOS e pode ser sintetizada a partir da sacarose por transfrutossilacção, catalisada pela inulinase ou enzima  $\beta$ - frutossiltransferase (RISSO *et al.*, 2009).

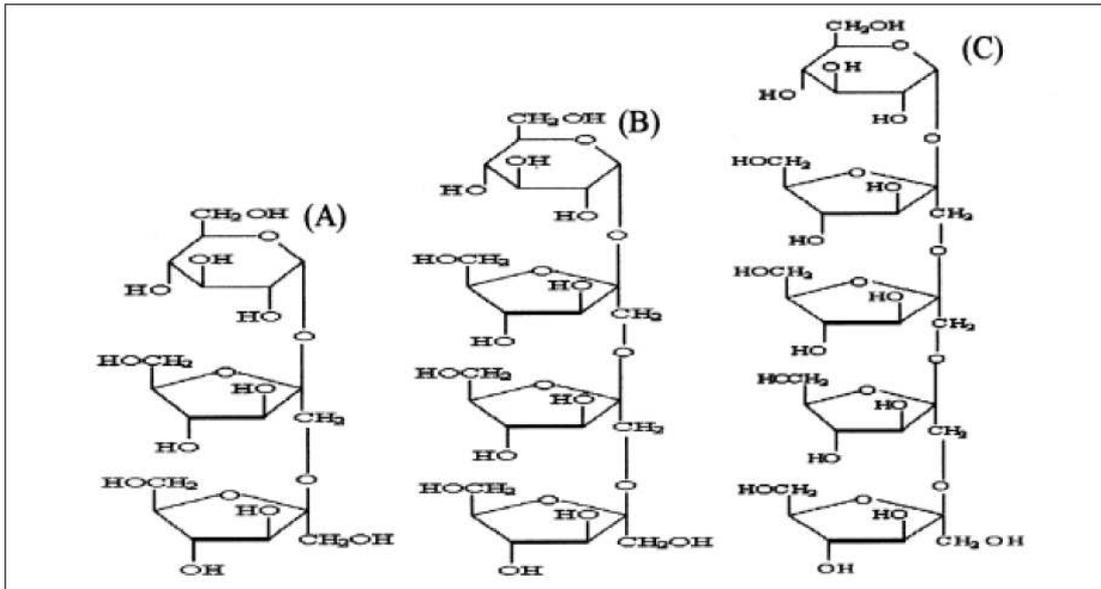


Figura I.2: Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).

## I. 6 Caracterização

Sabendo-se que altas temperaturas (em torno de 50°C) e baixos valores de pH (em torno de 4,0) são condições operacionais de grande interesse industrial, uma vez que diminuem os riscos de contaminação microbiana, melhoram a solubilidade de alguns substratos, como por exemplo inulina, e no preparo de xaropes reduzem a formação de cor, uma característica indesejável, é importante estudar a estabilidade da enzima (TREICHEL, 2004).

### I.6.1 Temperatura ótima e Termoestabilidade

Zhang *et al.* (2009) estudaram os efeitos do pH e da temperatura sobre a inulinase recombinante de *Pichia guilliermondii* e *Pichia pastoris*, e observaram que a enzima foi estável até 60°C, mantendo mais de 96,9% de atividade, mas rapidamente inativando a temperaturas acima desta. Esses resultados

demonstram que a temperatura ideal e a termoestabilidade da inulinase recombinante foram idênticos aos da inulinase nativa da cepa *P. guilliermondii*.

Sharma, Kainth & Gill (2006) caracterizaram a inulinase obtida de *Streptomyces sp.*, com relação aos efeitos da temperatura sobre a atividade enzimática e sua estabilidade. A atividade de inulinase foi determinada na faixa de temperatura de 40 a 80°C, com o uso de tampão citrato (pH 6,0). A enzima apresentou atividade máxima em 60°C, cuja temperatura foi maior do que 45 - 55°C reportadas para outras inulinases microbianas.

Quanto à determinação da estabilidade térmica, Sharma, Kainth & Gill (2006) verificaram que a inulinase de *Streptomyces sp.* não apresentou perda significativa de atividade após 6 h, e se manteve cerca de 72% de atividade após 12 h de incubação à 60 °C. No entanto, após tempo prolongado, a 60°C resultou em uma perda gradual da atividade, mas ainda mantendo 36% da atividade após 72 h. A incubação de inulinase em 70°C resultou em rápida perda da atividade (50%) nas 3 h iniciais, após o qual a enzima apresentou 33% da sua atividade inicial após 72 h.

A temperatura ótima da inulinase recombinante de *Aspergillus niger* AF10 expressa em *Pichia pastoris* foi de 55 ° C, após medições em diferentes temperaturas (45 ° - 65 ° C) e pH 5,5 (ZHANG *et al.*, 2004).

Chen *et al.* (2009), em seu estudo sobre caracterização de exo e endo inulinase de *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, em um faixa de temperaturas de 20° C a 80 °C, pH 5,0 por 30 min, utilizando inulina e sacarose como substrato, obtiveram uma temperatura ótima em torno de 45° C, para exoinulinase e endoinulinase. Para a determinação da estabilidade térmica da inulinase purificada, os autores verificaram que todas as inulinase purificadas retiveram 80% de atividade relativa após 1 h (pré-aquecido a 50 ° C), mas apenas 40% em relação à atividade foi observada após 1 h (pré-aquecido a 60 ° C). No entanto, a inativação completa foi observada quando a enzima foi incubada a 80°C por 1 h.

Kango (2008) estudou a produção de inulinase de *Aspergillus Niger* a partir de raízes de dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), mostrando que a temperatura ótima para a atividade máxima relativa da enzima foi de 50 ° C.

Liu *et al.* (2010), em seu estudo sobre hidrólise de inulina e produção de ácido cítrico a partir de inulina, empregando uma inulinase obtida a partir de *Yarrowia lipolytica*, encontraram resultados semelhantes aos estudos anteriormente descritos. A inulinase imobilizada em células de levedura apresentou temperatura ótima de 50°C. Quanto à estabilidade térmica, a inulinase imobilizada foi estável a partir de 50°C e a atividade enzimática foi diminuindo rapidamente à temperatura superior a 50°C.

No estudo de Risso *et al.* (2010) sobre os efeitos de solventes orgânicos nas características da inulinase livre e imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, os autores observaram que a temperatura ótima para inulinase livre foi de 55°C independente do percentual de solvente orgânico utilizado. Já para a inulinase imobilizada a temperatura ótima foi 55°C em 70% de solvente orgânico. No que se refere à estabilidade térmica, a enzima livre apresentou maior estabilidade a 50°C, e a fração solvente orgânico não teve efeito significativo sobre a estabilidade. A estabilidade da enzima livre diminuiu drasticamente em temperaturas superiores a 55°C. Análoga à da enzima livre, a maior estabilidade da forma imobilizada foi de 50°C e a fração de solvente orgânico não afetou a estabilidade.

### **1.6.2 pH ótimo e estabilidade do pH**

Zhang *et al.* (2009) estudaram a atividade de inulinase recombinante em diferentes pHs, obtendo uma atividade máxima em pH 6,0. Para investigar a estabilidade do pH da inulinase recombinante purificada, os autores incubaram a enzima a 4°C por 2 horas em soluções com a faixa de pH 4 – 9, contendo a mesma concentração iônica, sendo a atividade residual determinada em pH 6,0. A atividade da enzima foi estável apenas entre pH 6,0 e 7,0. A atividade máxima da inulinase nativa da cepa *P. guilliermondii* também é observada em pH 6,0, e sua atividade é estável entre pH 6,0 - 7,0, o que sugere que o pH ótimo e pH de estabilidade da inulinase foram consistentes com os da inulinase nativa.

Com relação ao efeito do pH na atividade da inulinase de *Streptomyces sp.*, Sharma, Kainth & Gill (2006) obtiveram uma atividade máxima em pH 6,0.

Este resultado está de acordo com o intervalo geral de muitas fontes microbianas relatadas até o momento: *A. niger* (4,4), *A. versicolor* (5,5), *Penicillium janczewskii* (4,8 - 5,0) e *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 (5,5).

Zhang *et al.*, (2004) estudaram as propriedades enzimológicas de inulinase recombinante de *Aspergillus niger* AF10, em níveis diferentes de pH (pH 3,0 - 7,0), com tampão acetato de sódio a 55 ° C, obtendo um pH ótimo de 4.5.

Chen *et al.* (2009) observaram em seu estudo sobre os efeitos do pH na atividade e estabilidade de exo e endo inulinase de *Aspergillus ficuum* JNSP5-06, que a exoinulinase apresentou atividade máxima em pH 4,5, mas a endoinulinase exibiu a maior atividade em pH 5,0. Já à 50°C, ambas, exoinulinase e endoinulinase, mantiveram-se estáveis ao longo de um ampla faixa de pH (4 - 8). No entanto, a atividade da enzima reduziu drasticamente para além desse intervalo, e quase perdeu a atividade abaixo do pH 2,0 e pH acima de 10,0.

Quanto ao efeito do pH na atividade de inulinase obtida por *Aspergillus Niger*, Kango (2008) incubou a enzima em diferentes tampões, a uma temperatura de 50°C e por um tempo de 20 minutos, obtendo um pH ótimo de 5,0.

No pH ótimo para a inulinase imobilizada em células de levedura, Liu *et al.* (2010) encontraram uma atividade máxima para a enzima em pH 4.5. A enzima foi estável entre pH 3 e 7,0, com diminuição significativa da atividade quando o valor de pH foi superior a 7,0.

Inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, mantida em diferentes concentrações de acetato de butila, apresentou um pH ótimo de 4,8, enquanto que o pH ótimo para a inulinase imobilizada da mesma cepa foi de 4,4, para todas as frações de solventes orgânicos (SO) utilizados. Com relação ao pH de estabilidade da enzima livre, em 25 e 50% de SO, a inulinase foi mais estável em pH 4,8, mostrando uma meia-vida de 530 e 866 minutos, respectivamente. No entanto, a maior estabilidade da enzima livre foi encontrado em 70% de SO e pH 4,0, quando a meia-vida foi de 990 min. Considerando-se a enzima imobilizada, a 25% de SO, a inulinase foi mais estável em pH 5,2 (meia-vida de 770 min). Aos 50 e 70% de SO, a inulinase mostrou maior estabilidade em pH 4,8, com meia-vida de 2310 e 1386 min, respectivamente. Em termos gerais, a enzima

imobilizada mostrou-se mais estável em toda faixa de pH investigada (RISSO *et al.*, 2010).

---

**MATERIAL E MÉTODOS**

Nesta secção, são descritas todas as etapas desenvolvidas para a execução deste trabalho, conforme esquematiza a Figura II.1:

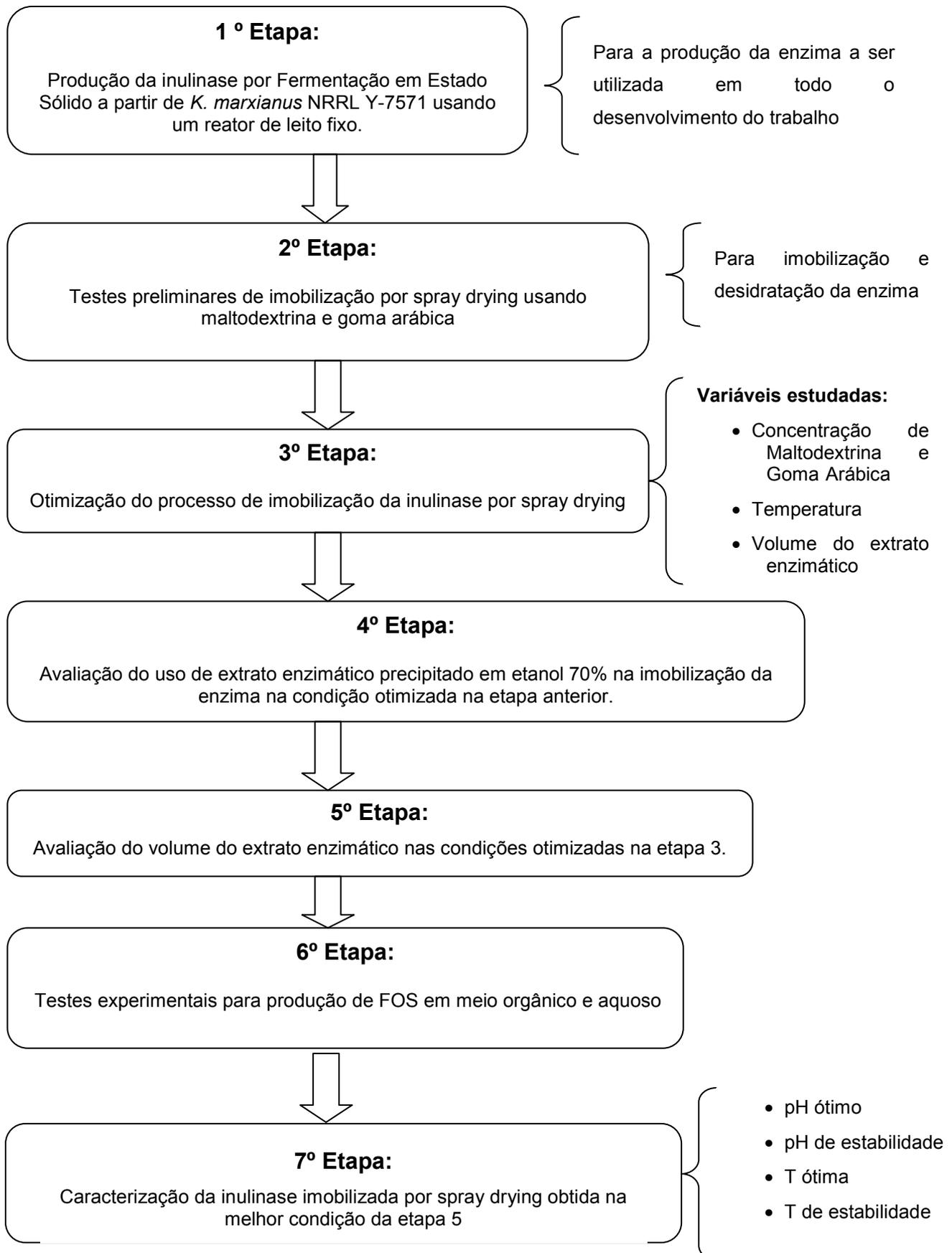


Figura II.1: Fluxograma das etapas desenvolvidas

## II. 1 Micro-organismo, Pré-inóculo e Substratos - 1º Etapa

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase por FES e é pertencente ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007). O micro-organismo foi mantido a 4°C em caldo YM, contendo: 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O meio para o pré-inóculo contém: 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 5 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 1,15 g.L<sup>-1</sup> de KCl e 0,65 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Cada tubo de caldo YM foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio, o qual foi encubado a 30°C, 150 rpm por 24 horas.

O meio sólido usado como substrato em FES para a produção de inulinase era composto por bagaço de cana suplementado com 15% (p/p) de melaço de cana pré-tratado, 30% (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20% (p/p) de farelo de soja, cuja composição foi definida em trabalhos anteriores, onde o processo foi conduzido em micro-escala (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007).

## II. 2 Fermentação em Estado Sólido (FES) - 1º Etapa

As fermentações foram realizadas num biorreator de leito fixo em escala de laboratório com capacidade útil de 3 kg de bagaço de cana seco. A unidade experimental consiste basicamente de um cilindro metálico (34 cm de diâmetro e 50 cm de altura) conectado a uma linha de ar saturado com água. O umidificador de ar, o qual fornece ar com umidade relativa em torno de 95%, consiste de um cilindro de PVC disposto horizontalmente antes da entrada do ar no biorreator. Ar seco, fornecido por um compressor de ar, foi bombeado diretamente dentro do umidificador, usando um difusor, onde o ar permanecia em contato com a água por um tempo suficiente para que fosse obtido ar úmido nas condições de processo. O ar próximo da saturação, na temperatura de operação, entra na base do biorreator, percorrendo todo o leito, até sua saída no topo. A Figura III.2 apresenta um diagrama esquemático do biorreator de leito fixo utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

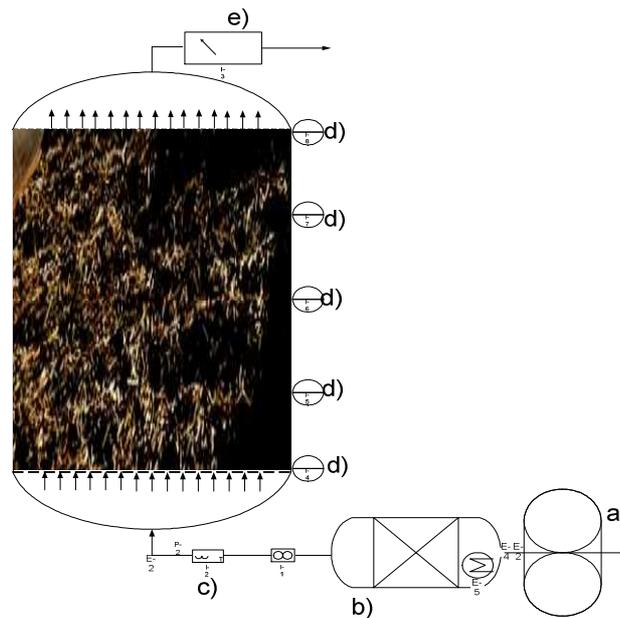


Figura II.2: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo empregado neste estudo: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade.

O biorreator foi carregado com 2 kg (base seca) de bagaço de cana devidamente suplementado. A umidade dos substratos foi corrigida para 65% (Base seca - p/p) e autoclavado a 121°C por 20 minutos. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo correspondente a 14 g de massa inicial de células (MAZUTTI *et al.*, 2010a). Todos os experimentos foram conduzidos por 24 horas.

O método de extração utilizado neste trabalho foi baseado no estudo de otimização da produção de inulinase a partir de *K. marxianus* NRRY-7571 por FES em biorreator de leito fixo, descrito por Mazutti *et al.* (2010a).

O meio sólido usado como substrato em FES para a produção de inulinase era composto por bagaço de cana suplementado com 15% (p/p) de melaço de cana pré-tratado, 30% (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20% (p/p) de farelo de soja. A umidade inicial dos substratos foi corrigida para 65%. O melaço de cana foi pré-tratado preparando-se uma solução 200 g.L<sup>-1</sup> em ácido sulfúrico pH 5,0. Esta solução permaneceu em repouso por 24 horas. Após esse

período, o pH final foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico. A solução resultante foi centrifugada a 15000 x g por 15 minutos a 4°C.

### **II.3 Imobilização em Maltodextrina e Goma Arábica - 2º Etapa**

Para a imobilização da enzima, preparou-se uma solução com maltodextrina e goma arábica, conforme descrito por Valduga *et al.* (2008), que estudaram estes agentes para encapsulamento das antocianinas. Para isso, utilizou-se 30 mL de extrato enzimático, adicionando-se 70 mL de uma solução composta por maltodextrina e goma arábica, na proporção de 50:50. O volume final da solução foi fixado em 100 mL. Tendo-se o preparo desta solução, inulinase + agente encapsulante, realizou-se a desidratação em *Spray Drying*, da marca Lab Plant SD-0,5, nas seguintes condições operacionais: temperatura do ar de secagem de entrada 180°C e saída 90°C a 102°C, e vazão média de alimentação de 0,08L/h.

Foi realizado este teste preliminar, valendo-se dos resultados obtidos através da metodologia de planejamento de experimentos no trabalho de Valduga *et al.* (2008), nas condições acima descritas.

#### **II.3.1. Planejamento de Experimentos - 3º Etapa**

Após a realização do teste preliminar para a imobilização da inulinase com o uso dos encapsulantes maltodextrina e goma arábica, e posterior desidratação em *Spray Drying*, partiu-se para um planejamento de experimentos fatorial completo ( $2^3$  ensaios, com triplicata do ponto central para cada variável independente, além de 2 pontos axiais para cada variável independente). Foram realizados 17 ensaios, tendo como variáveis: temperatura do ar de secagem de entrada, proporção dos agentes encapsulantes maltodextrina/goma arábica e volume de extrato enzimático, para otimização da melhor condição de imobilização da inulinase. O volume final da solução foi fixado em 100mL.

Os níveis das variáveis estudadas podem ser visualizados na Tabela II.1.

Tabela II.1. Valores utilizados no primeiro planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

<b>Variáveis Independentes/ Níveis</b>	<b>-1,68</b>	<b>-1</b>	<b>+ 1</b>	<b>+1,68</b>	<b>0*</b>
Temperatura (°C)	79	110	200	231	155
Concentração de Maltodextrina/Goma arábica	0:100	20:80	80:20	100:00	50:50
Volume de Extrato (mL)	16	30	70	84	50

#### **II. 4 Precipitação Enzimática - 4º Etapa**

Tendo obtido a melhor condição da enzima imobilizada em goma arábica a partir da metodologia de planejamento de experimentos, partiu-se então para a precipitação enzimática, com o intuito de manter uma alta atividade da inulinase, para posterior imobilização, na condição já otimizada.

Para viabilizar a separação do sobrenadante realizou-se uma centrifugação por 20 minutos, em 5000 RPM e 5° C. Após a centrifugação, o precipitado foi descartado.

Para ocorrer a precipitação da enzima adicionou-se etanol ao sobrenadante até concentração de 70%. A enzima foi mantida em banho de gelo, sob agitação branda, adicionando-se etanol em bomba peristáltica, numa vazão de 1mL/min. Imediatamente submeteu-se a solução inulinase e etanol à centrifugação por 15 minutos, em 9000 RPM e 4° C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o precipitado contendo a enzima foi ressuspendido em 30 mL de tampão acetato 0,1 M e pH 4,8. Por fim, determinou-se a atividade enzimática (Risso et al. 2010, com modificações).

#### **II.5 Variações do Volume do Extrato enzimático – 5º Etapa**

Após a obtenção da melhor condição de imobilização da inulinase, foram realizados testes com diferentes volumes de extrato enzimático: 80mL, 100mL e

120mL, na temperatura de 155°C e concentração de maltodextrina/goma arábica (M:G) de 0:100.

## **II.6 Síntese de Frutooligossacarídeos (FOS): testes experimentais em meio orgânico e aquoso - 6º Etapa**

Após as etapas de precipitação e imobilização da enzima, realizou-se a síntese para a produção dos frutooligossacarídeos que são formados por GF, GF<sub>2</sub> (kestose) e GF<sub>3</sub> (nistose). Neste estudo, foram utilizados reatores encamisados, onde foram adicionadas a enzima, a solução de sacarose, o solvente orgânico e o solvente aquoso.

A síntese foi realizada em sistemas aquoso e aquoso-orgânico, conforme metodologia descrita por Risso *et al.* (2009).

Em sistema aquoso, o meio reacional foi composto por tampão de acetato de sódio 0,1 M, temperatura de 40°C, pH 5,0, concentração de sacarose de 55%, e atividade da inulinase de 4 U/mL<sup>-1</sup>.

No sistema aquoso-orgânico, os solventes utilizados foram tampão acetato de sódio 0,1 M e acetato de butila, atividade enzimática de 4,0 U/mL<sup>-1</sup>, temperatura de 40°C, relação solvente orgânico/sistema total de 25/100, concentração de sacarose de 50%, e pH 6,0.

## **II.7 Caracterização da Inulinase precipitada, imobilizada em goma arábica e desidratada em *Spray Drying* – 7º Etapa**

### **II.7.1 Temperatura de Estabilidade**

Segundo Contiero (1992), a estabilidade térmica da enzima foi determinada através da utilização da equação de Arrhenius (Equação 1).

$$K = A * e^{-E_d/RT} \quad (\text{Equação 1})$$

As soluções enzimáticas, diluídas em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 foram incubadas nas temperaturas: 50,0; 55,0; 60,0, 65,0 e 70,0 °C. As amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, dependendo da temperatura, para as medidas de atividade enzimática.

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

$$\ln K_d = \ln K - \frac{E_d}{RT} \quad (\text{Equação 2})$$

sendo que:

$K_d$  = constante de desativação da enzima

$K$  = constante de proporcionalidade

$E_d$  = energia de desativação enzimática

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

$T$  = temperatura absoluta (K)

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

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

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{Kd} \quad \text{(Equação 3)}$$

### II.7.2 pH de estabilidade

A enzima foi incubada a 50°C nos seguintes valores de pH: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 em tampão acetato 0,1M. As amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, dependendo do pH, para as medidas de atividade enzimática.

A determinação da atividade enzimática foi realizada pelo método do DNS, com tampão acetato 0,1M a pH 4,8, conforme descrito no próximo item.

## II.8 Métodos Analíticos

### II.8.1 Determinação da Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade da inulinase encapsulada e desidratada em *Spray Drying*, foi utilizado a seguinte metodologia: a uma amostra de 0,5 g de enzima, adicionou-se 10 mL de tampão acetato 0,1M e pH 4,8. Retirou-se 0,5 mL da amostra e adicionou-se 4,5 mL de tampão acetato 2% sacarose. Em seguida, colocou-se em banho quente a 50°C por 10 min. Retirou-se novamente 0,5 mL da amostra e acrescentou-se 0,5 mL de DNS. Posteriormente, submeteu-se a amostra em banho quente, em ebulição por 5min. Após, colocou-se em banho de gelo para resfriar a amostra. Acrescentou-se 8 mL de tartarato de Na e K em cada amostra e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para cada amostra, foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. Uma unidade de inulinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 µmol

de ART por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por grama de sólidos seco (U/mL).

### **II.8.2. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)**

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

### **II.8.3. Determinação de Proteína**

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### **II.8.4. Determinação de Frutooligossacarídeos**

Para a determinação de FOS, as amostras foram colhidas em intervalos regulares de tempo (0, 4 e 8 horas) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificar e quantificar os açúcares e FOS, usando a curva padrão de kestose, nistose e frutossilnístose adquiridos pela companhia japonesa Wako Dako Industries, Ltd. e sacarose, glicose e frutose da Merck. Foi utilizado cromatógrafo de íons, Dionex DX500. Este equipamento é constituído por uma bomba de gradiente GP50, detector eletroquímico ED40 e coluna de troca aniônica analítica CarboPac PA100 (250 x 4 mm). O gradiente de eluição foi aplicado, utilizando dois solventes: 0,1 M de hidróxido de sódio aquoso (A) e 0,1 M de hidróxido de sódio aquoso, contendo acetato de sódio 0,6 M (B). Ambos os eluentes foram preparados com água ultrapura, e desgaseificada por borbulhamento de nitrogênio. O volume de injeção foi de 25µL. A eluição começou com 100% de solvente A em 10 min, a uma vazão de 0,1 mL min<sup>-1</sup>. Este foi seguido por gradiente linear de 0% a 90% de solvente B em solvente A por 15 min. Depois disso, a coluna foi lavada por 5 min com 100% de B. A próxima

injeção foi realizada após equilibrar a coluna com 100% de solvente A durante 5 min (RISSO *et al.*, 2009).

## **CAPÍTULO III**

---

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **III.1 Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido (FES)**

A atividade enzimática obtida utilizando o meio e condições previamente otimizadas (Mazutti et al., 2010) foi de  $185,5 \text{ U.gds}^{-1}$ . Astolfi (2010), em seu estudo sobre a produção de inulinase a partir de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, por FES, usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo, usando a mesma levedura, obteve valores de atividade enzimática que variaram de  $107 \pm 48 \text{ U.gds}^{-1}$  até  $586 \pm 63 \text{ U.gds}^{-1}$ , com as maiores atividades obtidas nas fermentações em batelada alimentada, seguida pela fermentação batelada simples com entrada de ar úmido. Neste trabalho, a produção de inulinase em termos de atividade enzimática aumentou conforme aumenta a altura do biorreator, independente do tipo de fermentação, resultados estes que diferem dos encontrados nesta pesquisa, em que se obteve maior atividade na zona inferior do biorreator.

Mazutti et al. (2010a), em seu trabalho sobre cinética e modelagem matemática da produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo, obteve os valores de atividade enzimática que variaram experimentalmente de  $76,9 \pm 1,8 \text{ U.gds}^{-1}$  até  $436,7 \pm 36,3 \text{ U.gds}^{-1}$ . Em outro estudo conduzido por Mazutti et al. (2006), os autores obtiveram  $345 \pm 41 \text{ U.gds}^{-1}$  após 96 h de fermentação, usando 5 g de sólidos secos. Xiong, Jinhua e Dongsheng (2007) obtiveram atividade máxima de  $410 \text{ U.gds}^{-1}$  após 72 h de fermentação, usando 100 g de sólidos secos. Mazutti et al. (2010a), estudando a produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo, obtiveram uma atividade máxima de  $436 \text{ U.gds}^{-1}$  após 24 horas de fermentação.

### **III.2 Teste preliminar de imobilização de inulinase por *Spray Drying*, usando maltodextrina e goma arábica**

Os resultados dos testes preliminares de imobilização da inulinase em maltodextrina e goma arábica, e as condições operacionais no Spray Drying são apresentados na Tabela III.1.

Tabela III.1: Atividade enzimática após imobilização e desidratação

<b>Volume do extrato enzimático (mL)</b>	<b>M:G</b>	<b>Volume final da solução (mL)</b>	<b>T °C do ar de entrada</b>	<b>T °C do ar de saída</b>	<b>Vazão Média de alimentação (L/h)</b>	<b>Atividade Enzimática (U/g)</b>
30	50:50	100	180	90 – 102	0,08	26,3

\* M:G – Maltodextrina/Goma arábica

### III.3 Planejamento de experimentos

Com base nos dados obtidos no teste preliminar, realizou-se um planejamento experimental fatorial  $2^3$ , com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, com o intuito de avaliar o efeito das variáveis: temperatura, relação entre maltodextrina/goma arábica e volume do extrato enzimático. A matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados das variáveis independentes, bem como as atividades enzimáticas obtidas, expressos em U/g, são apresentados na Tabela III.2.

Tabela III.2: Matriz do planejamento de experimentos (valores reais e codificados) para a atividade da inulinase imobilizada por *Spray Drying*.

<b>Experi- mento</b>	<b>T (°C)</b>	<b>M:G</b>	<b>V extrato enzimático (mL)</b>	<b>Atividade Enzimática (U/g)</b>	<b>Atividade específica (U/mg PTN)</b>
1	110 (-1)	20:80 (-1)	30 (-1)	221,5	1232,5
2	200 (1)	20:80 (-1)	30 (-1)	210,2	1213,4
3	110 (-1)	80:20 (1)	30 (-1)	150,8	1057,9
4	200 (1)	80:20 (1)	30 (-1)	102,3	831,3
5	110 (-1)	20:80 (-1)	70 (1)	172,9	336,5
6	200 (1)	20:80 (-1)	70 (1)	292,4	780,6
7	110 (-1)	80:20 (1)	70 (1)	215,5	635,2
8	200 (1)	80:20 (1)	70 (1)	202,8	292,9
9	79 (-1,68)	50:50 (0)	50 (0)	231,9	626,1
10	231 (1,68)	50:50 (0)	50 (0)	193,9	517,8
11	155 (0)	0:100 (-1,68)	50 (0)	267,9	731,5
12	155 (0)	100:0 (1,68)	50 (0)	28,9	152,9

13	155 (0)	50:50 (0)	16 (-1,68)	75,3	317,0
14	155 (0)	50:50 (0)	84 (1,68)	192,9	102,8
15	155 (0)	50:50 (0)	50 (0)	227,3	314,3
16	155 (0)	50:50 (0)	50 (0)	242,7	557,9
17	155 (0)	50:50 (0)	50 (0)	246,9	1852,3

Os resultados obtidos, com relação à atividade da inulinase após o processo de imobilização, mostram que a máxima atividade foi obtida no ensaio 6, cujo valor é 292,4 U/g, quando foi utilizado 70 mL de extrato enzimático, uma relação de M:G 20:80, a temperatura de 200°C, seguidos pelos ensaios 11 e 17, com atividades de 268,0 U/g e 247,0 U/g, respectivamente. A menor atividade enzimática foi obtida quando se utilizou 50 mL de extrato, relação entre malto/goma de 100:00 e 155° C (28,9 U/g).

É importante ressaltar que o uso da tecnologia de SD tem por objetivo, entre outros fatores, a obtenção de um produto final seco, com partículas uniformes e com um alto rendimento. Observou-se que maiores concentrações de maltodextrina e temperaturas mais baixas resultaram em um pó encapsulado totalmente aderido nas paredes da câmara de secagem, o que dificultou a remoção das partículas e perdas do material, além de um maior tempo de secagem.

Os dados referentes à imobilização e desidratação de inulinase apresentados foram analisados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A Tabela III.3 apresenta a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes. Os termos significativos no modelo foram selecionados baseados no valor de p, que serve como uma ferramenta para checar a significância de cada um dos coeficientes. Foram considerados como significativos os termos que apresentaram valores de  $p < 0,10$ . Como pode ser visto, os termos significativos do modelo ( $p < 0,10$ ) foram concentrações de M:G linear, volume de extrato linear e volume de extrato quadrático. Não foram significativos para o modelo ( $p > 0,10$ ) T,  $T^2$ ,  $M:G^2$ , T X M:G, T X Vol Extr e M:G X Vol Extr.

Tabela III.3. Análise dos efeitos dos termos do modelo para a atividade da inulinase, após imobilização e desidratação.

	<b>Coefficiente de Regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(7)</b>	<b>P</b>
Média*	236,59	24,6252	9,61	0,000028
T	-1,23	11,5710	-0,11	0,92
T <sup>2</sup>	-1,30	12,7475	-0,10	0,92
M:G*	-45,97	11,57	-3,97	0,01
M:G <sup>2</sup> *	-24,15	12,75	-1,89	0,10
V*	29,05	11,57	2,51	0,04
V <sup>2</sup> *	-29,23	12,75	-2,29	0,05
T X M:G	-21,16	15,11	-1,40	0,20
T X V	20,83	15,11	1,38	0,21
M:G X V	16,44	15,11	1,09	0,31

\* fatores estatisticamente significativos ( $p < 0,10$ )

A análise de variância (ANOVA) apresentada na tabela III. 4 foi empregada para a validação do modelo usado para imobilização de inulinase em malto e goma arábica e condições operacionais de *Spray Drying*. O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média

devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Conforme é apresentado na Tabela III.5, o valor calculado de F é 3,87, maior que o valor de F tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,83, sugere que o modelo gerado a partir dos dados da Tabela III.3 pode explicar 83,28% da variação total dos resultados.

Tabela III.4. ANOVA para atividades enzimáticas

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrados Médios</b>	<b>F</b>
Regressão	63688,63	9	7076,51	3,87
Resíduo	12788,05	7	1826,86	
Total	76476,68	16		

$R^2 = 0,8328$ . F tab 90% = 2,72

O modelo validado pela análise de variância foi usado para gerar a superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de inulinase, em função das concentrações de maltodextrina e goma arábica e volume de extrato enzimático, variáveis relevantes no estudo, as quais estão apresentadas na Figura III.1.

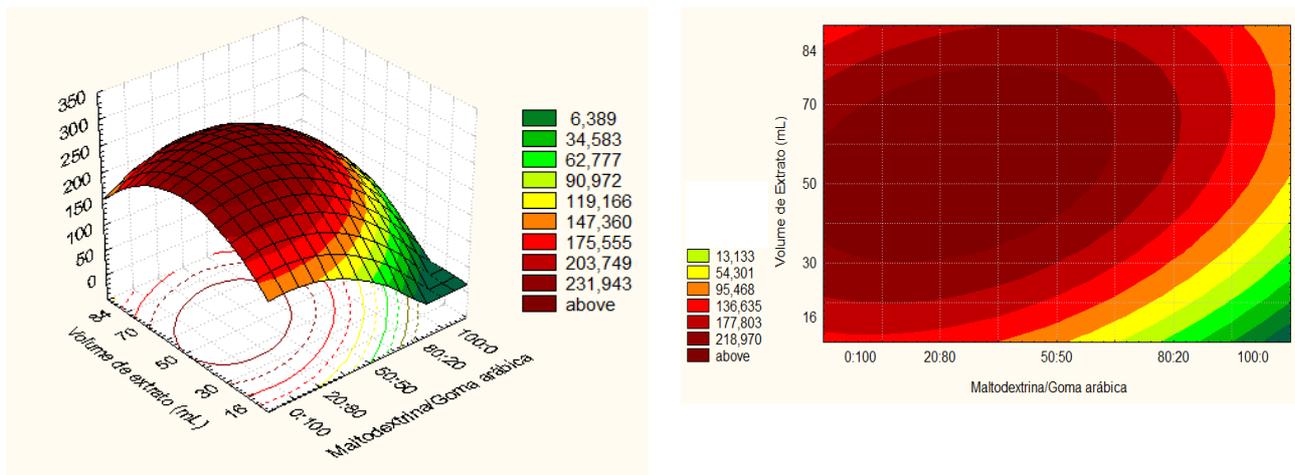


Figura III.1. Superfície de Resposta e Curva de Contorno para atividades da inulinase após o processo de imobilização.

Não há na literatura científica trabalhos que reportam sobre imobilização de inulinase em agentes encapsulantes como maltodextrina e goma arábica, e uso de tecnologia de *Spray Drying* para desidratação.

Vários suportes têm sido usados para imobilizar inulinase. Paula *et al.* (2008) utilizaram suporte de gelatina para aprisionamento em gel seguido de tratamento com glutaraldeído, para imobilizar o sobrenadante bruto de inulinase a partir de *K. marxianus* var. *bulgaricus*. O rendimento de imobilização foi 82,60% e a quantidade de proteína ligada foi máxima para o suporte testado.

Oliveira *et al.* (2009) utilizaram micropartículas de quitosana reticuladas com glioxal e com tripolifosfato de sódio (TPP) obtidas por *Spray Drying* para imobilizar a lacase, visando à construção de biossensores para determinação de rutina em produtos farmacêuticos.

Valduga *et al.* (2008) utilizaram o método de secagem por atomização (*Spray Drying*) para obter um corante natural (antocianina), na forma de pó, a partir do bagaço de uva da cultivar Isabel (*Vitis labrusca*). As variáveis estudadas foram: relação Maltodextrina:Goma (0:100, 50:50, 100:0) e volume de extrato concentrado (30 - 70 mL). A maior concentração de antocianinas totais, após secagem do pigmento, atingiu um valor de 160 mg/100g, para as condições de

encapsulamento, utilizando-se somente maltodextrina e 70 mL de extrato previamente extraído.

Ersus & Yurdagel (2007) estudaram o efeito de diferentes temperaturas de secagem do *Spray Drying* no conteúdo de antocianinas de cenoura preta e o efeito de diferentes tipos de maltodextrina sobre as propriedades de *Spray Drying* e sua estabilidade no armazenamento.

#### III.4 Testes de variações de Volume de Extrato Enzimático

Após a otimização das condições de imobilização da inulinase, em que os termos significativos do modelo ( $p < 0,10$ ) foram concentrações de M:G linear, volume de extrato linear e quadrático, foram realizados testes adicionais para avaliar o efeito do volume de extrato enzimático, com variações na faixa de 80 a 120mL, na temperatura de 155°C, contendo somente goma arábica. A Tabela III.5 apresenta os valores em termos da atividade enzimática, teor de proteínas e atividade específica, expressa em média e desvio padrão, obtidas em três ensaios realizados para cada experimento.

Tabela III.5: Atividade enzimática, Proteína e Atividade específica após testes de variações de volume de extrato enzimático.

<b>Experimento</b>	<b>Atividade enzimática (U/g)</b>	<b>PTN (mg/g)</b>	<b>Atividade específica (U/mg PTN)</b>
80mL	247,84 ± 18,40	0,65 ± 0,13	389,61 ± 51,30
100mL	217,89 ± 4,44	0,36 ± 0,05	610,64 ± 104,60
120mL	225,42 ± 4,52	0,59 ± 0,05	384,14 ± 30,09

A análise dos dados apresentados na Tabela III.5 mostraram que as variações no volume de extrato enzimático influenciaram na atividade enzimática e na atividade específica da inulinase, além da obtenção de um pó homogêneo, seco e com boa rentabilidade de produto final.

Observa-se que com um aumento no volume do extrato enzimático para 100mL, a atividade específica aumenta em 1,57 vezes, em relação à atividade específica com 80mL de extrato.

### **III.5 Precipitação de inulinase em etanol a 70%, imobilização e desidratação**

Após testes com variações de volume do extrato enzimático, optou-se pela realização de ensaios de precipitação enzimática com 70% de etanol (60mL e 90mL), seguidos de imobilização com 70mL de extrato enzimático, usando goma arábica como agente encapsulante à 150° C. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela III.6, em termos de atividade enzimática, proteína e atividade específica. A atividade enzimática após precipitação em 60mL de etanol, 62,5 U/g, foi aproximadamente 2,75 vezes maior que a atividade do extrato bruto. Após a imobilização e desidratação, a atividade enzimática subiu para 95,97 U/g, um incremento percentual de 422,03%.

Tabela III.6. Atividade enzimática, Proteína e Atividade específica após testes de precipitação enzimática, imobilização e desidratação.

<b>Experimento</b>	<b>Atividade enzimática (U/g)</b>	<b>PTN (mg/g)</b>	<b>Atividade específica (U/mg PTN)</b>
Extrato Bruto	22,74	0,1923	118,25
Prec. 60mL	62,50	0,1836	340,46
Prec. 90mL	102,99	0,2974	346,25
Prec. 60mL e SD	95,97	0,0490	1958,94
Prec. 90mL e SD	142,60	0,0595	2395,75

Ao precipitar em 90mL de etanol, houve um acréscimo na atividade enzimática de 22,74 U/g para 102,99 U/g, respectivamente, para extrato bruto e

extrato enzimático precipitado. Após imobilização e desidratação em SD, houve um aumento de aproximadamente 627%, em relação ao extrato bruto (Tabela III.6).

Os resultados obtidos demonstram a efetividade da realização de testes de precipitação enzimática, imobilização em goma arábica e desidratação em *Spray Drying*.

### III.6 Testes experimentais de síntese de FOS em meio orgânico e aquoso

Os resultados obtidos a partir de síntese de frutooligossacarídeos em meio orgânico e aquoso e a conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOS), após 8 horas são apresentados nas figuras III.2, III.3 e III.4.

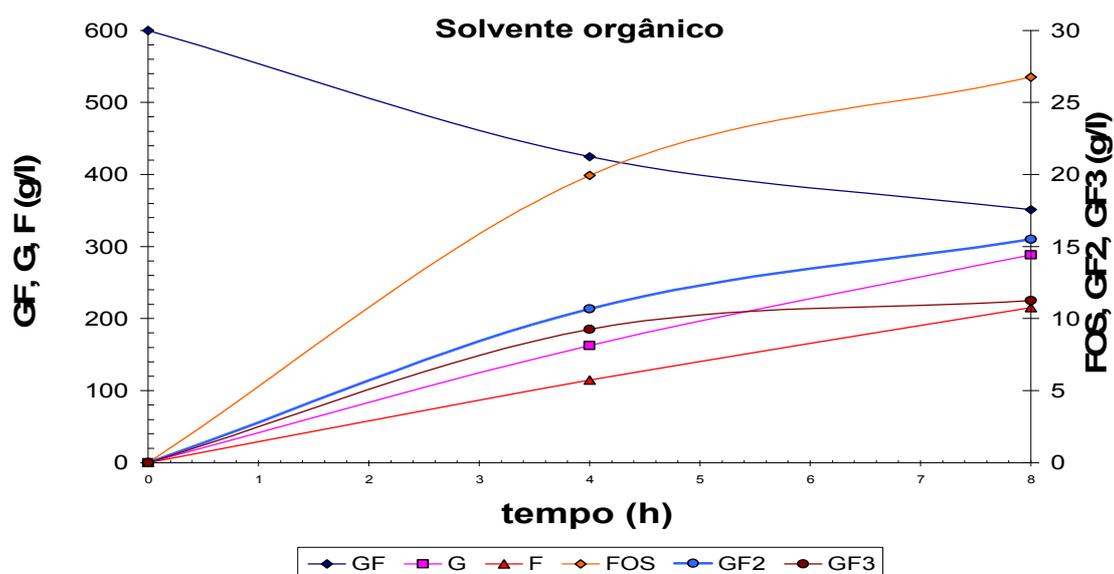


Figura III.2. Síntese de frutooligossacarídeos em meio orgânico após 8 horas

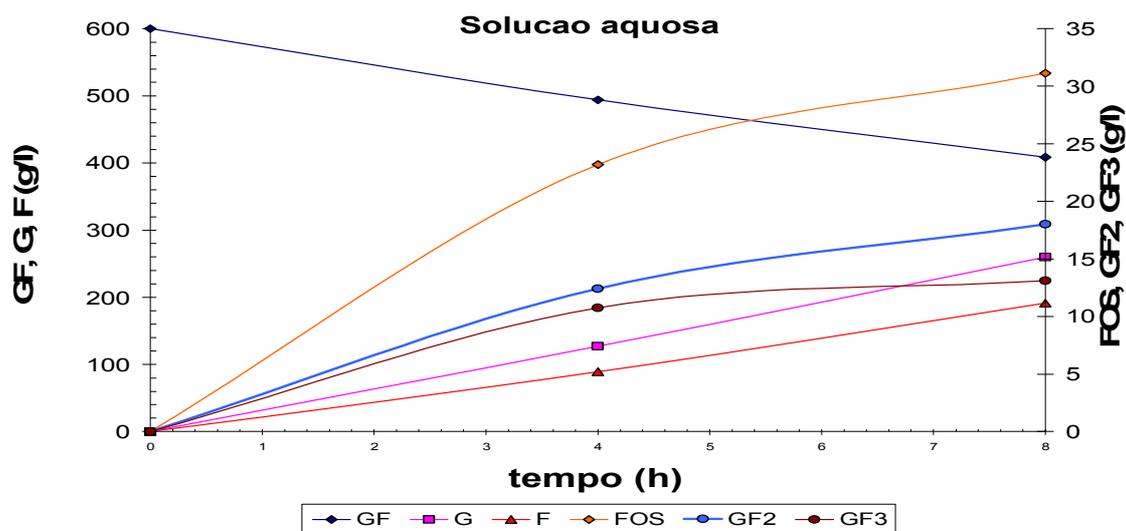


Figura III.3. Síntese de frutooligossacarídeos em meio aquoso após 8 horas.

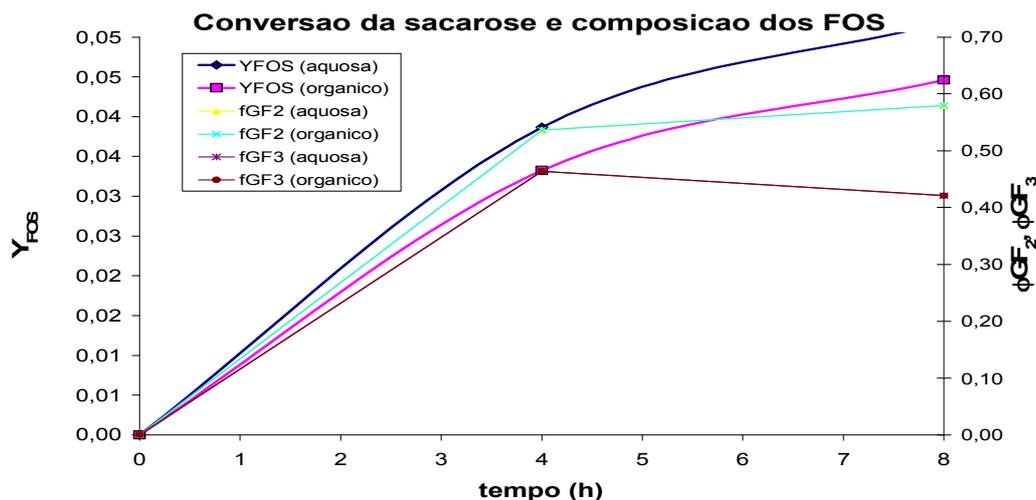


Figura III.4. Conversão da sacarose em frutooligossacarídeos (YFOSs) em meio orgânico e aquoso.

A análise dos resultados obtidos nas Figuras III.2 e III.3 revelam a produção e a composição de FOS em meio orgânico e aquoso. Em solução aquosa, a produção de FOS, após 8 horas, se deu de forma mais eficaz, 31,14 g/L, enquanto que em meio orgânico foi 26,77 g/L, sendo que a composição dos FOS obtida foi semelhante em ambos os meios.

O rendimento da conversão de sacarose em FOS pode ser visualizado na Figura III.4. Em meio aquoso, o rendimento foi superior ao meio orgânico, 5,2% e 4,5%, respectivamente. Estes valores obtidos são expressivos, já que trata-se de um método de produção de inulinase em que se utiliza o extrato bruto, sem purificação. Além disso, o processo de imobilização usado é de fácil aplicação e baixo custo, o que pode viabilizar economicamente o processo.

Risso *et al.* (2009), em seu estudo comparativo entre sistemas para síntese de frutooligossacarídeos a partir de sacarose, usando inulinase livre de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, obteve um rendimento (YFOS) que variou de 7,8% para 11,8% para sistema aquoso/orgânico, em que as variáveis analisadas foram temperatura, pH, concentração de sacarose, atividade enzimática, taxa de solvente aquoso/ orgânico e concentração de polietileno glicol (PEG). Para o sistema aquoso, o melhor resultado para a conversão da sacarose em FOS foi de 15,2%, em pH 5,7 e concentração de sacarose de 65,6%.

### **III.7 Caracterização Parcial da Inulinase**

A caracterização da inulinase baseou-se no estudo da inulinase após precipitação em etanol 70%, imobilização em goma arábica e desidratação em *Spray Drying* à 150°C. Nestas condições, foram estudados temperatura e pH de estabilidade.

#### **III.7.1 Influência da Temperatura na Estabilidade da Inulinase**

Os resultados obtidos de atividade enzimática da inulinase imobilizada e desidratada, em função do tempo de incubação a diferentes temperaturas, de 50, 55, 60, 65 e 70°C, estão apresentados nas Tabelas III.7 a III.11 e graficados na Figura III.5. Estas mostram o decréscimo da atividade enzimática com o tempo, a diferentes temperaturas.

Tabela III. 7: Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 50° C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Atividade (U. mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>
0	364,27	1,0000
0,167	285,04	0,7825
0,5	328,81	0,9027
1	380,93	1,0457
2	311,27	0,8545
3	328,27	0,9012
4	341,62	0,9378
5	317,35	0,8712
6	294,66	0,8089
7	202,87	0,5569

19	266,13	0,7306
24	275,72	0,7569
30	259,13	0,7114
43	306,41	0,8412
50	202,25	0,5552
74	174,55	0,4792
98	201,34	0,5527
124	149,48	0,4104
148	146,43	0,4020

---

Tabela III. 8: Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 55°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Atividade (U. mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>
0,000	366,59	1,0000
0,083	385,07	1,0504
0,167	333,07	0,9086
0,250	433,81	1,1834
0,333	398,47	1,0870
0,500	276,81	0,7551
0,750	247,62	0,6755
1,000	326,85	0,8916
1,500	186,12	0,5077

---

2,000	160,55	0,4380
3,000	201,66	0,5501
3,000	198,88	0,5425
5,000	167,37	0,4565
6,000	127,42	0,3476
7,000	132,73	0,3621
19,000	75,56	0,2061

Tabela III. 9: Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 60°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Atividade (U. mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>
0,000	362,58	1,0000
0,017	354,74	0,9784
0,033	321,66	0,8871
0,050	353,79	0,9757
0,067	273,26	0,7536
0,083	275,72	0,7604
0,117	256,90	0,7085
0,167	273,44	0,7541

0,250	220,66	0,6086
0,333	187,30	0,5166
0,417	159,64	0,4403
0,500	153,08	0,4222
0,667	163,74	0,4516
0,833	133,21	0,3674

Tabela III. 10: Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 65°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Atividade (U. mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>
0,000	349,46	1,0000
0,008	323,23	0,9249
0,017	381,50	1,0917
0,025	325,44	0,9313
0,033	324,32	0,9281
0,042	279,64	0,8002
0,050	220,78	0,6318

0,058	173,73	0,4971
0,067	111,29	0,3185
0,075	104,98	0,3004
0,083	92,56	0,2649
0,100	87,75	0,2511
0,133	75,04	0,2147
0,167	73,15	0,2093
0,200	72,80	0,2083
0,250	69,86	0,1999

Tabela III. 11: Perfis de atividade da inulinase à temperatura de 70°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Atividade (U. mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>
0,000	354,38	1,0000
0,008	251,59	0,7099
0,017	166,71	0,4704
0,025	99,62	0,2811
0,033	84,79	0,2393
0,042	84,65	0,2389

0,050	81,80	0,2308
0,058	88,52	0,2498
0,067	82,51	0,2328
0,075	78,23	0,2207
0,083	80,55	0,2273
0,100	79,14	0,2233
0,117	82,03	0,2315
0,133	75,88	0,2141
0,150	75,65	0,2135
0,167	72,28	0,2040
0,250	71,69	0,2023

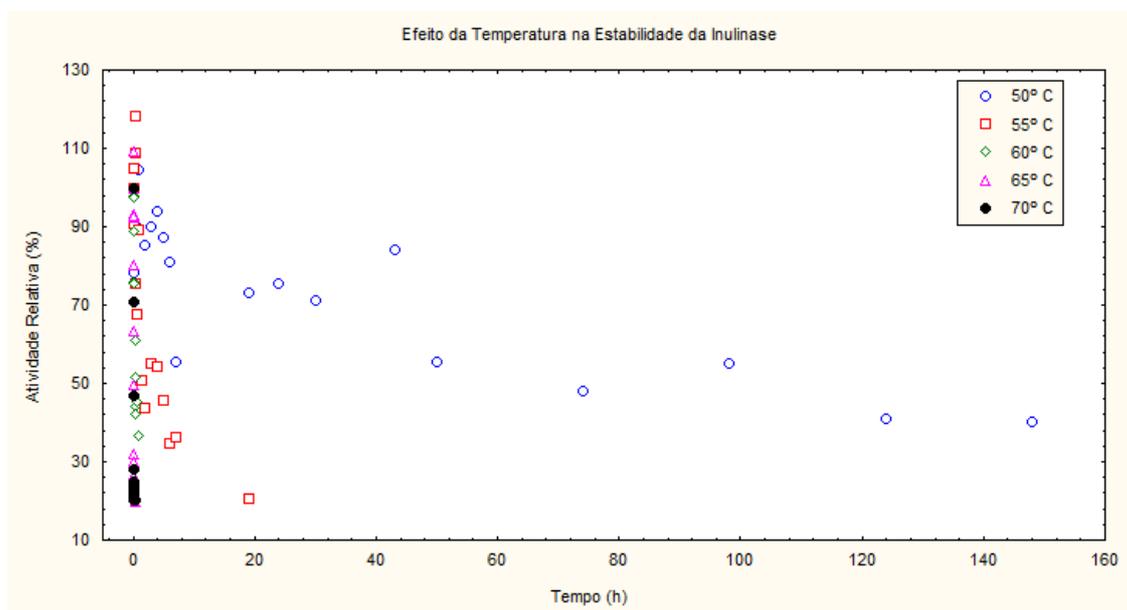


Figura III.5. Influência da Temperatura na Estabilidade da Inulinase Imobilizada e Desidratada

Através dos resultados encontrados para a temperatura de estabilidade para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, precipitada a 70% de etanol, imobilizada em goma arábica e desidratada em SD à 155°C, observou-se que a temperatura de maior estabilidade é a de 50°C dentro da faixa estudada.

Risso *et al.* (2010), em seu estudo sobre os efeitos do solvente orgânico nas características da inulinase livre e imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, observaram que a enzima imobilizada para a cepa ATCC 16045 apresentou uma atividade máxima na mesma temperatura que a livre, ou seja, na temperatura de 55°C, independente da porcentagem de solvente utilizada. Para temperaturas acima de 55°C, a enzima perde rapidamente a atividade devido à desnaturação. Enquanto que para a NRRL Y-7571 a atividade máxima foi na temperatura de 55; 60 e 55°C na presença de 25; 50 e 70% de solvente, respectivamente. Através dos resultados encontrados para a temperatura de estabilidade da inulinase recuperada e imobilizada de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e NRRL Y-7571, observou-se que a temperatura em que a enzima permaneceu por mais tempo estável foi a de 50°C, independente da porcentagem de solvente utilizada.

A inulinase imobilizada em células de levedura marinha de *Yarrowia lipolytica* apresentou temperatura ótima de 50°C. Quanto à temperatura de estabilidade, a enzima mostrou-se estável a partir de 50°C e a atividade enzimática foi diminuindo rapidamente à temperatura superior a 50°C (LIU *et al.* 2010).

Uma curva mais ampla para o perfil de temperatura foi observado para a atividade da inulinase imobilizada em alginato de sódio, de 50° - 60°C, em comparação com a forma livre. A atividade da enzima imobilizada foi deslocada de 60° - 55° C em relação à sua forma livre (CATANA *et al.*, 2005).

Os dados obtidos experimentalmente foram graficados em  $\ln A/A_0$  vs tempo e desses gráficos, obteve-se um valor de  $K_d$  (constante de desativação térmica) para cada temperatura, como mostra a Tabela III.12. Com estes valores, graficou-se o  $\ln K_d$  em função de  $1/T$  (K) para o cálculo de  $E_d$  (energia de ativação para a reação de desnaturação), mostrado na Figura III.6.

Tabela III. 12. Valores de desativação térmica para cada temperatura estudada

T (°C)	T (K)	Kd <i>Experimental</i>	Ln Kd
50	323,15	0,0098	-4,6254
55	328,15	0,1363	-1,9929
60	333,15	1,7516	0,5605
65	338,15	16,562	2,8071
70	343,15	45,658	3,8212

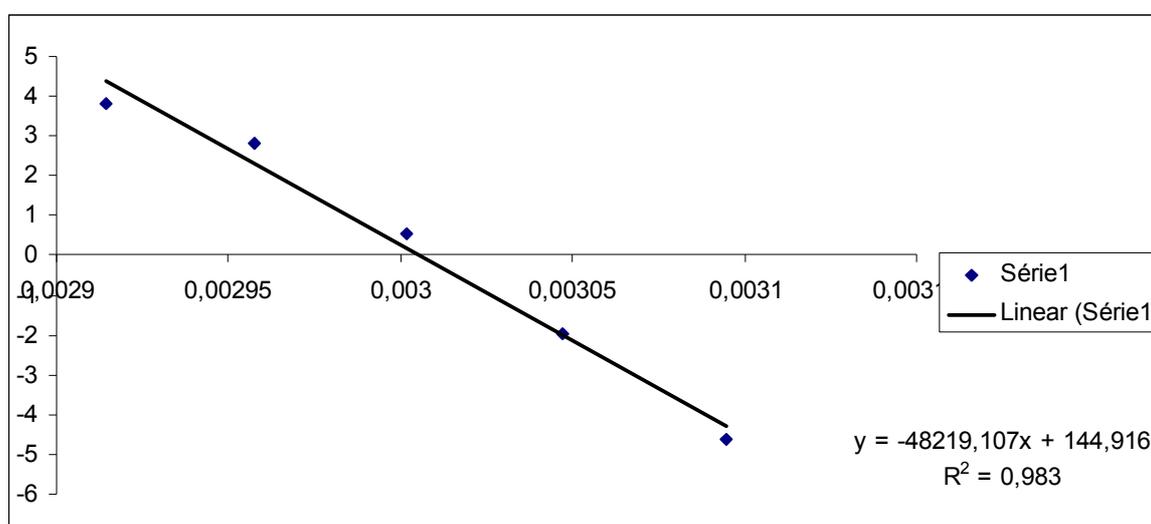


Figura III. 6. Gráfico linearizado para a equação de Arrhenius

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

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

A partir da inclinação da reta obtém-se o valor de Ed, que é 400,89 KJ/mol.

A expressão para determinar os valores de Kd é:

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

### III.7.2 Influência do pH na Estabilidade da Inulinase

A estabilidade da inulinase foi verificada, incubando-a em diferentes valores de pH (3,5 – 5,5) em tampão acetato de sódio 0,1M a 50°C, em diferentes intervalos de tempos. Os resultados estão apresentados na Tabela III.13 e na Figura III.7.

A análise dos resultados demonstra que a inulinase precipitada a 70% de etanol, imobilizada em goma arábica e desidratada em SD à 155°C, apresenta uma maior estabilidade em valores de pH 4,0, 4,5 e 5,0 após 66 horas de incubação, com um decréscimo de aproximadamente 29, 38 e 33,5% de atividade, respectivamente. Em pH 3,5, a atividade reduziu 38,8%, e em pH 5,5 a redução foi de 37,4% em relação à atividade inicial, após 27 horas de incubação.

Risso *et al.* (2010) verificaram, para a cepa ATCC 16045, que a máxima atividade para a inulinase imobilizada em carvão, alginato, sacarose e glutaraldeído, independente da porcentagem de solvente utilizada, foi obtida no pH 4,4, utilizando o tampão acetato de sódio 0,1 M e no pH 7,0, utilizando o tampão fosfato de sódio. O pH de estabilidade encontrado foi 4,8 para a inulinase na forma imobilizada, na presença de 25, 50 e 70% de solvente.

Liu *et al.* (2010), em seu estudo sobre a inulinase imobilizada em células de levedura marinha de *Yarrowia lipolytica*, apresentaram atividade máxima em pH 4.5. A enzima foi estável entre pH 3,0 - 7,0 e a atividade diminuiu significativamente quando o valor de pH foi superior a 7,0.

Catana *et al.* (2005), em seu estudo sobre imobilização de inulinase a partir de *Aspergillus niger*, para hidrólise de sacarose, observaram uma mudança no pH ótimo de 5 - 4 como resultado da imobilização em alginato de sódio, sugerindo que essa mudança de pH é um fenômeno muitas vezes observado quando a enzima é imobilizada numa matriz inerte.

Tabela III.13: Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados.

Tempo (h)	pH				
	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
0,000	456,07	527,51	576,73	567,58	533,97
0,017	640,93	660,99	784,72	824,24	752,89
0,050	669,25	754,64	841,17	879,87	817,76
0,083	633,01	761,76	814,06	852,55	771,97
0,167	560,15	623,56	684,23	710,10	689,43
0,333	402,18	423,15	446,45	486,76	454,21
0,500	395,63	495,21	522,90	549,27	524,85
1,000	391,64	477,10	475,56	537,62	486,70
2,000	488,32	616,95	712,43	720,40	630,63
3,000	379,05	471,80	516,40	526,85	463,15
5,000	813,94	506,03	522,10	545,86	449,14
19,000	191,23	290,76	462,63	439,55	230,34

27,000	177,16	222,45	307,67	325,94	193,66
42,000		194,71	340,15	307,22	
66,000		153,58	219,72	190,43	

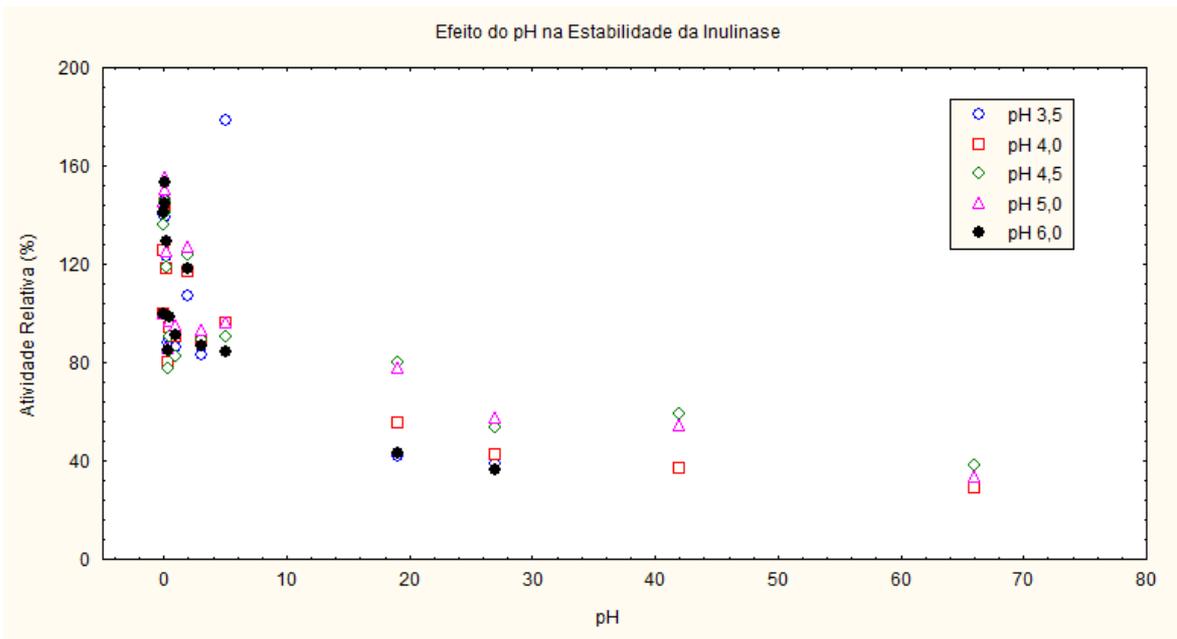


Figura III.7. Influência do pH na Estabilidade da Inulinase Imobilizada e Desidratada.



## CONCLUSÕES

Neste trabalho, propôs-se uma nova estratégia de imobilização da inulinase com o uso de agentes encapsulantes maltodextrina e goma arábica e secagem em *Spray Drying*. Para isto, foram realizados testes preliminares de viabilidade do estudo, planejamento experimental, precipitação em etanol na condição otimizada no planejamento, teste de produção de FOS e caracterização parcial da enzima. Neste contexto, as conclusões obtidas foram:

- A máxima atividade da inulinase após imobilização e desidratação em *Spray Drying* obtida foi de 292,42 U/g, quando se trabalhou com 70 mL de extrato enzimático, uma concentração de M:G 20:80 e temperatura de 200°C, mostrando a viabilidade desta técnica.
- O uso da tecnologia do *Spray Drying* objetiva principalmente a obtenção de um pó seco e homogêneo, com um bom rendimento do produto final, além da manutenção ou aumento da atividade enzimática. Neste sentido, observou-se que em maiores concentrações de goma arábica (0:100), num maior volume de extrato enzimático (50 e 70mL) e numa temperatura média (155°C), obteve-se um pó enzimático seco, com fácil remoção das paredes da câmara de secagem e uma atividade enzimática aumentada.
- Após os testes com variações de volume do extrato de inulinase, realizou-se ensaios de precipitação enzimática com 70% de etanol, seguidos de imobilização com 70mL de extrato enzimático, concentração de malto/goma 0:100 e 150° C. A atividade enzimática após precipitação em 60mL de etanol, 62,5 U/g, foi aproximadamente 2,75 vezes maior que a

atividade do extrato bruto. Após a imobilização e desidratação, a atividade enzimática subiu para 95,97 U/g, um incremento percentual de 422,03%, mostrando ser uma técnica útil para aumento da atividade enzimática, antes do processo de imobilização.

- A síntese de FOS, em meio orgânico e meio aquoso, mostrou que, em meio aquoso, a produção de FOS foi de 31,14g/L e o rendimento de YFOS foi 5,2%, enquanto que em meio orgânico a produção foi de 26,77g/L e o rendimento de YFOS foi de 4,5%. Estes valores são expressivos, já que trata-se de método de produção de inulinase em que se utiliza o extrato bruto, além de a imobilização ser um procedimento relativamente simples e de baixo custo.
- A caracterização parcial da inulinase baseou-se no estudo da enzima após precipitação em etanol 70%, imobilização em goma arábica e desidratação em *Spray Drying* à 150°C. A temperatura de maior estabilidade da inulinase neste estudo foi de 50°C e pH de estabilidade entre 4,0 e 5,0.

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

1. Realizar a otimização da síntese de FOS em meio orgânico e aquoso, a partir da inulinase precipitada, imobilizada e desidratada em *Spray Drying*, testando temperatura, atividade enzimática, pH e concentração de sacarose.
2. Realizar testes para síntese de FOS por inulinase precipitada, imobilizada e desidratada em alta pressão.
3. Testar aplicabilidade dos frutooligossacarídeos em alimentos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALBERTON, L. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; ASSMANN, R.; FENDRICH, R. C.; RODRIGUÉZ-LEÓN, J.; SOCCOL, C. R. Xylanase Production by *Streptomyces viridosporus* T7A in Submerged and Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Residues. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**. v.52, p. 171-180, 2009

ASTOLFI, V. Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido usando Estratégias de Fermentação Batelada e Batelada Alimentada em Biorreator de Leito Fixo. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Universidade Regional Integrada, URI Campus de Erechim. Erechim/RS, 2010.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T., Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 141-150, 1999.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S., Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 439-444, 2007.

BEINE, R.; MORARU, R.; NIMTZ, M.; NA'AMNIEH, S.; PAWLOWSKI, A., BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. **Journal of Biotechnology**. v.138, p. 33–41, 2008.

BENDER, J. P.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 951-958, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

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

CHEGINI, G.R.; KHAZAEI, J.; GHOBADIAN, B.; GOUDARZI, A.M. Prediction of process and product parameters in an orange juice spray dryer using artificial neural networks. **Journal of Food Engineering**, v.84, p.534–543, 2008.

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

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

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p.805–812, 2007.

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

GABITES, J.R.; ABRAHAMSON, J.; WINCHESTER, J.A. Air flow patterns in an industrial milk powder spray dryer. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, p. 899–910, 2010.

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

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, P.; SHOJAOSADATI, S. A.; HOOGSCHAGEN, M.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; RINZEMA, A. A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 100-107, 2007.

IMTIAZ-UL-ISLAM; LANGRISH, T.A.G. Comparing the crystallization of sucrose and lactose in spray dryers. **Food and Bioproducts Processing**, 2009.

ISONO, Y.; ARAYA, G.; HOSHINO, A. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Fermentation on  $\gamma$ -Alumina Particles using a Spray-Dryer. **Process Biochemistry**, 1995.

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

LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L. Processamento de *achocolatado* de cupuaçu por *spray-dryer*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.

LEKANDA, J. S.; PÉREZ-CORREA, J. R. Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1793-1802, 2004.

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

MAZUTTI, M., BENDER, J. P., TREICHEL, H. DI LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 56–59, 2006.

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

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

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

MAZUTTI, M. A. Avaliação Cinética e Modelagem Matemática da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Leito Fixo. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas - SP, 2009.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, nº 2, p. 440-443, 2009.

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

MORAES, A. L. L.; STECKELBERG, C.; SATO, H. H.; PINHEIRO, A. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, nº 1, p. 95-102, 2005.

MUSSATTO, S. I.; AGUILAR, C.N.; RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J. A. Fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 59, p. 76–81, 2009.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**. v.68, p. 587–597, 2007.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da Lacase em Micropartículas de Quitosana obtidas por *Spray Drying* e usadas na construção de Biossensores. **Química. Nova**, v. 32, N. 5, p. 1195-1201, 2009.

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

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.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, 2003.

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

RISSE, F.V.A.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; COSTA, F.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Food Bioprocess Technol.** 2009.

RISSE, F.V.A.; MAZUTTI, M.A.; COSTA, F.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Effect of Organic Solvent on the Characteristics of Free and Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food Technol. Biotechnol.** v. 48, nº 2, p.143–150, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F., **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Casa do Pão, Campinas – SP, Brasil, 2005.

SÁNCHEZ, O.; GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically

agitated airlift reactor. **Food and bioproducts processing**. v. 86, p. 109–115, 2008.

SANGEETHA, 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.

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

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

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

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

SINGH, R.S., DHALIWAL, R., PURI, M. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1703–1707, 2006.

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

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, Secagem por Atomização e Microencapsulamento de Antocianinas do Bagaço da Uva Isabel (*Vitis labrusca*). **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.

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

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

ZHANG, T.; GONG, F.; PENG, Y.; CHI, Z. Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase. **Process Biochemistry**, v. 4, p.1335–1339, 2009.