

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

**GRACIELE DE OLIVEIRA KUHN**

**IMOBILIZAÇÃO E TRATAMENTO DE INULINASES DE**  
***Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 E *Aspergillus niger***  
**EM FLUIDOS PRESSURIZADOS:**  
**EFEITO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E SÍNTESE DE**  
**FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

**ERECHIM, RS**  
**SETEMBRO DE 2013**

**GRACIELE DE OLIVEIRA KUHN**

**IMOBILIZAÇÃO E TRATAMENTO DE INULINASES DE  
*Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 E *Aspergillus niger*  
EM FLUIDOS PRESSURIZADOS:  
EFEITO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E SÍNTESE DE  
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim.

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Débora de Oliveira

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Clarissa Dalla Rosa

**ERECHIM, RS**

**SETEMBRO DE 2013**

GRACIELE DE OLIVEIRA KUHN

IMOBILIZAÇÃO E TRATAMENTO DE INULINASES DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 E *Aspergillus niger* EM FLUIDOS PRESSURIZADOS:  
EFEITO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E SÍNTESE DE  
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Tese de Doutorado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito necessário à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

---

Débora de Oliveira, D. Sc.  
UFSC (Orientadora)

---

Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.  
URI (Orientadora)

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.  
UFSC (Orientador)

---

Rogério M. Dallago, D. Sc.  
URI (Banca Examinadora)

---

Natália Paroul, D. Sc.  
URI (Banca Examinadora)

---

Ignácio Vieitez, D.Sc.  
UDELAR – Uruguai (Banca Examinadora)

---

Helen Treichel, D. Sc.  
UFFS (Banca Examinadora)

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

Dedico este trabalho a todos que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao iniciar uma caminhada não sabemos dos obstáculos que com certeza irão surgir, porém, a grande virtude é a coragem de nunca desistir. Assim, ao terminar uma jornada, não há prazer no mundo que possa ser comparado àquele momento. Todas as dificuldades são esquecidas, mesmo que momentaneamente, e após a euforia, novas metas, novos objetivos são traçados e o ser humano recomeça sua caminhada.

De coração eu agradeço as pessoas que caminharam comigo, a elas devo minha amizade, carinho, admiração e respeito.

Agradeço a minha família, pai, mãe, mano, que me ensinaram o amor e a bondade, ensinamentos que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus oris mais que queridos Débora e Vladimir por todo o conhecimento que me foi passado, pelo compromisso e dedicação, e por contribuírem tanto ao meu crescimento profissional e pessoal. Mais ainda pela amizade e carinho. Déby eu amo tu!

A Clarissa, minha amigona, conselheira e orientadora. A Helen sempre presente na construção do trabalho, e nas caipiras do Silvio, obrigada, você é muito especial.

A todos os professores que colaboraram para a minha formação, por toda a informação transmitida.

A todos os colegas de laboratório, pela amizade e convivência, pelo compartilhamento do chimarrão, do café, bolachas e as imprescindíveis balinhas.

A todos os funcionários do Centro Tecnológico.

A URI – Campus de Erechim e ao departamento de Engenharia de Alimentos por possibilitarem a minha formação.

A Capes pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, meus sinceros agradecimentos ao Dr. Ignácio Vieitez, Dra Natália, Dra Helen e Dr. Tuca, pelas correções e

sugestões, as quais serão de fundamental importância para melhorar a qualidade desta tese.

A minha mana de coração, Claudinha, obrigada pela amizade e companheirismo de todas as horas.

Enfim, a todas estas pessoas maravilhosas que tornaram meus dias mais felizes e fazem a vida valer à pena! Obrigada, as levarei sempre comigo.

”Quem acredita sempre alcança“  
Renato Russo

## RESUMO

Apesar de suas excelentes propriedades catalíticas, as características em geral das enzimas precisam ser melhoradas antes da sua aplicação em escala industrial (onde muitos ciclos de processos de alto rendimento são desejados). Algumas estratégias para melhorar essas propriedades da enzima são aqui analisadas. Na literatura encontra-se o uso de fluidos pressurizados, sub ou supercríticos como meio reacional alternativo para reações enzimáticas, explorando propriedades singulares de tais fluidos. Inulinases constituem uma importante classe de enzimas para produção de frutose e frutooligossacarídeos, que são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consiste em investigar a influência da pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade de inulinases imobilizadas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e *Aspergillus niger*, em propano e GLP pressurizados. Para tal, os experimentos foram realizados utilizando uma célula de aço com volume interno de 3 mL, na temperatura de 40 °C, variando a pressão (30–270 bar), sob diferentes tempos de exposição (1–6 h) e adotando distintas taxas de descompressão (20–100 bar/min). Um planejamento experimental com dois níveis e três repetições no ponto central foi utilizado para identificar o efeito das variáveis do processo bem como das possíveis interações entre elas na perda/ganho da atividade enzimática. Os resultados mostraram que as atividades dos biocatalisadores foram sempre superiores a uma atividade inicial e que as alterações obtidas na atividade enzimática dependem das condições experimentais avaliadas, ou seja, maiores ou menores efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema de investigação. As maiores atividades residuais observadas foram 218,7% para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, 145% para a inulinase de *Aspergillus niger*, ambas tratadas em GLP pressurizado e imobilizadas em montmorillonita, e para a inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em PU a maior atividade residual foi de 433,4% quando tratada em GLP pressurizado. Os catalisadores pré-tratados nas melhores condições foram então utilizados para a produção de frutooligossacarídeos, utilizando sacarose e inulina como substratos, em sistema aquoso e orgânico. O objetivo desta etapa foi avaliar o rendimento e a produtividade em frutooligossacarídeos, utilizando alternativas para aumentar a atividade da enzima por meio dos fluidos pressurizados e usando suportes de baixo custo para a imobilização, na busca de um biocatalisador estável para ser usado em reações de síntese. Rendimentos de 31% foram alcançados, com 5,4% de Kestose (GF2); 22,3% de nistose (GF3) e 3,5% de frutossilnistose (GF4), obtidos para inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em PU e pré-tratada em GLP pressurizado, o que demonstra o potencial deste procedimento.

**Palavras-chave:** Inulinase. Atividade enzimática. Fluidos pressurizados. Frutooligossacarídeos.

## ABSTRACT

In spite of its excellent catalytic properties, the characteristics of enzymes, in general, must be enhanced prior to the application on industrial scale. Some approaches to improve the properties of enzymes are discussed below. In the literature, the use of pressurized fluids, such as sub or supercritical reaction medium for enzymatic reactions appears as an alternative. The inulinases constitute an important class of enzymes for the production of fructose and fructooligosaccharides, which are widely used in food industry. In this context, the aim of this work is to investigate the influence of pressure, exposure time, and depressurization rate on the activity of immobilized inulinase of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 and *Aspergillus niger* in pressurized propane and LPG. To achieve this, experiments were performed using a cell of internal volume of steel 3 mL, temperature of 40 °C, varying the pressure (30-270 bar), the exposure times (1-6 h) and adopting different depressurization rates (20-100 bar/min). An experimental design with two levels, three variables and three replicates at the central point was used. The results show that the activities of the biocatalyst were always higher than the initial activity and the changes in enzyme activity obtained depends on the experimental conditions, ie, higher or lower effects may be obtained depending on the characteristics of the system. The highest residual activities observed were 218,7% for inulinase of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, to 145% inulinase of *Aspergillus niger*, both treated and pressurized LPG immobilized on montmorillonite, and the inulinase of *Aspergillus niger* immobilized on PU the highest residual activity was 433,4% when treated in pressurized LPG. Catalysts pre-treated in the best conditions were then used for the production of fructooligosaccharides, using sucrose and inulin as substrate in aqueous and organic systems. The main objective of this step was to evaluate the yield and productivity in fructooligosaccharides, using alternatives for enhance the enzyme activity by means of pressurized fluids and also using low cost supports for enzyme immobilization, aiming at obtaining a stable biocatalyst to be used for synthesis reactions. Yields of 32% were achieved, with 5,4 % of kestose (GF2); 22,3% of nystose (GF3) and 3,5% of fructosylnystose (GF4), obtained for inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in PU and pre-treated in pressurized LPG, demonstrating the potential of this procedure.

**Keywords:** Inulinase. Enzyme activity. Pressurized fluid. Fructooligosaccharides.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – PROPRIEDADES CRÍTICAS DOS SOLVENTES. ....	42
<b>TABELA 2</b> – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL REALIZADO PARA AS INULINASES COMERCIAL E NÃO COMERCIAL IMOBILIZADAS. ....	61
<b>TABELA 3</b> - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS EMPREGADAS NA PRODUÇÃO DE FOS, UTILIZANDO INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADA EM GLP PRESSURIZADO COMO CATALISADOR EM MEIO AQUOSO.....	64
<b>TABELA 4</b> – ATIVIDADE RESIDUAL (%) DA INULINASE NÃO COMERCIAL DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> NRRL Y -7571 IMOBILIZADA EM MONTMORILONITA APÓS TRATAMENTO EM FLUIDOS PRESSURIZADOS. ....	67
<b>TABELA 5</b> – ATIVIDADE RESIDUAL (%) DA INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILONITA APÓS TRATAMENTO EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	72
<b>TABELA 6</b> – ATIVIDADE RESIDUAL (%) DA INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> IMOBILIZADA EM POLIURETANO APÓS TRATAMENTO EM GLP PRESSURIZADO.....	76
<b>TABELA 7</b> – PRODUÇÃO DE FOS A PARTIR DA INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADA EM FLUIDOS PRESSURIZADOS, UTILIZANDO A SACAROSE COMO SUBSTRATO. ....	86
<b>TABELA 8</b> – PRODUÇÃO DE FOS A PARTIR DA INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADA EM FLUIDOS PRESSURIZADOS, UTILIZANDO A INULINA COMO SUBSTRATO. ....	86
<b>TABELA 9</b> – PRODUÇÃO DE FOS A PARTIR DA INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> IMOBILIZADA EM PU E PRÉ-TRATADA EM GLP PRESSURIZADO, UTILIZANDO A SACAROSE COMO SUBSTRATO.....	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: KESTOSE (A), NISTOSE (B) E FRUTOSILNISTOSE (C) .....	25
<b>FIGURA 2</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE INULINASES. ....	56
<b>FIGURA 3</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE INULINASES COM ESPUMA DE POLIURETANO. ....	57
<b>FIGURA 4</b> - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO APARATO UTILIZADO NO TRATAMENTO DAS ENZIMAS NOS FLUIDOS PRESSURIZADOS. A– RESERVATÓRIO DE SOLVENTE; B– BANHO TERMOSTATIZADO; C– BOMBA DE SERINGA; D– REATOR/CÉLULA DE AÇO; E– INDICADOR DE PRESSÃO; F– TRANSDUTOR DE PRESSÃO; G– VÁLVULA MICROMÉTRICA. ....	59
<b>FIGURA 5</b> – DETALHES DA CÉLULA DE AÇO INOXIDÁVEL COM VOLUME INTERNO DE 3 ML (A); CÉLULA DE AÇO ACOPLADA A VÁLVULA MICROMÉTRICA (B). ....	60
<b>FIGURA 6</b> – VISTA DO SISTEMA MERGULHADO NO BANHO TERMOSTATIZADO (A); UNIDADE EXPERIMENTAL UTILIZADA NO TRATAMENTO DAS ENZIMAS (B). ....	61
<b>FIGURA 7</b> - DIAGRAMA DE PARETO PARA A INULINASE NÃO COMERCIAL DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> NRRL Y -7571 IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA NO SISTEMA PROPANO PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDA.....	68
<b>FIGURA 8</b> - DIAGRAMA DE PARETO PARA A INULINASE NÃO COMERCIAL DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> NRRL Y -7571 IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA NO SISTEMA GLP PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDA. ....	71
<b>FIGURA 9</b> - DIAGRAMA DE PARETO PARA A INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA NO SISTEMA PROPANO PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDA.....	74
<b>FIGURA 10</b> - DIAGRAMA DE PARETO PARA A INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA NO SISTEMA GLP PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDA.....	75

<b>FIGURA 11-</b> DIAGRAMA DE PARETO PARA A INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADA EM PU NO SISTEMA GLP PRESSURIZADO, EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES ESTUDADAS E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA OBTIDA. ...	77
<b>FIGURA 12–</b> ESTABILIDADE DA INULINASE NÃO COMERCIAL DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> NRRL Y -7571 APÓS SER SUBMETIDA AO FLUIDO PRESSURIZADO (A) PROPANO; (B) GLP. ....	82
<b>FIGURA 13 –</b> ESTABILIDADE DA INULINASE COMERCIAL DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> APÓS SER SUBMETIDA AO FLUIDO PRESSURIZADO (A) PROPANO; (B) GLP. ....	83
<b>FIGURA 14 -</b> CINÉTICA PARA A SÍNTESE DE FOS EM MEIO AQUOSO A PARTIR DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA, PRÉ-TRATADA EM GLP. ....	88
<b>FIGURA 15 –</b> ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DA SÍNTESE DE FOS REALIZADA EM MEIO AQUOSO, UTILIZANDO SACAROSE COMO SUBSTRATO E INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADAS EM ESPUMA DE POLIURETANO PRÉ-TRATADAS EM GLP. ....	90
<b>FIGURA 16 –</b> ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS PADRÕES QUÍMICOS (KESTOSE (GF2), NISTOSE (GF3) E FRUTOSILNISTOSE(GF4)). ....	90

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 OBJETIVOS .....	20
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 ENZIMAS.....	21
2.1.1 <i>Inulinasas</i> .....	23
2.1.2 <i>Frutooligossacarídeos</i> .....	25
2.1.2.1 Mecanismos de ação e efeitos benéficos.....	27
2.1.2.2 Produção de FOS.....	29
2.1.3 <i>Atividade enzimática</i> .....	33
2.1.4 <i>Imobilização de inulinasas</i> .....	34
2.2 FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	40
2.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ....	45
2.3.1 <i>Água</i> .....	45
2.3.2 <i>Solvente</i> .....	46
2.3.3 <i>Temperatura</i> .....	50
2.3.4 <i>Pressão</i> .....	50
2.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	52
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
3.1 MATERIAIS .....	54
3.1.1 <i>Reagentes</i> .....	54
3.1.2 <i>Enzimas</i> .....	55
3.2 EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA .....	55
3.2.1 <i>Processos de imobilização</i> .....	55
□ <i>Imobilização A: suporte argila montmorillonita natural poço A</i> .....	56
3.2.2 <i>Determinação da atividade enzimática das inulinasas</i> .....	58
3.2.3 <i>Tratamento das enzimas em propano e GLP pressurizados</i> .....	58
3.2.4 <i>Condições experimentais</i> .....	61
3.2.5 <i>Estabilidade da atividade enzimática da inulinase em baixas temperaturas após o tratamento a alta pressão</i> .....	62
3.2.6 <i>Caracterização estrutural do catalisador</i> .....	62

3.2.7	<i>Síntese de frutooligossacarídeos</i> .....	63
3.2.8	<i>Estudo cinético para a otimização da síntese de frutooligossacarídeos</i> .....	64
3.2.9	<i>Metodologia analítica para a quantificação de FOS</i> .....	64
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>66</b>
4.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM PROPANO E GLP PRESSURIZADOS SOBRE A ATIVIDADE DE INULINASE DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> NRRL Y-7571 IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA.....	66
4.1.1	<i>Inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 tratada em propano pressurizado</i> .....	67
4.1.2	<i>Inulinase de Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 tratada em GLP pressurizado</i> .....	70
4.2	EFEITO DO PROPANO E GLP PRESSURIZADOS SOBRE A ATIVIDADE DE INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA .....	72
4.2.1	<i>Inulinase de Aspergillus niger tratada em propano pressurizado</i> ...	73
4.2.2	<i>Inulinase de Aspergillus niger tratada em GLP pressurizado</i> .....	74
4.3	EFEITO DO GLP PRESSURIZADO SOBRE A ATIVIDADE DE INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADAS EM PU.....	76
4.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS INULINASES IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA EM BAIXAS TEMPERATURAS APÓS O TRATAMENTO EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	81
4.5	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA INULINASE NÃO COMERCIAL DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> NRRL Y-7571 ANTES E APÓS O TRATAMENTO EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	84
4.6	SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS.....	85
4.7	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADAS EM GLP.....	87

4.8 SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO INULINASES DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> IMOBILIZADAS EM POLIURETANO E PRÉ-TRATADAS EM GLP PRESSURIZADO .....	89
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO 1 .....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO 2 .....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO 3 .....</b>	<b>143</b>
<b>APÊNDICE D – ARTIGO SUBMETIDO.....</b>	<b>150</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A aplicação de processos biotecnológicos é conhecida pela humanidade há milhares de anos. Os primeiros relatos de processos fermentativos pelas civilizações antigas referem-se à fermentação de cereais em grãos para produção de bebidas alcoólicas pelos sumérios e babilônios há cerca de 6000 a. C. Relatos sobre a fabricação do vinho estão presentes no livro dos Gênesis, e o fermento para a fabricação de pão já era utilizado no Egito antigo (2000 a. C.). Além dessas aplicações, a produção de queijo e iogurtes é utilizada pelo homem há milhares de anos (800 a. C.), embora os agentes responsáveis por esses processos fossem ainda desconhecidos (LERESHE, 2006).

A biocatálise teve um rápido crescimento nos últimos anos, o que está certamente associado às ferramentas de biologia molecular e engenharia de proteínas que permitem gerar variáveis com propriedades diferentes, como: estruturas, função, seletividade e, também, tolerância a solventes não aquosos. Hoje já são conhecidas várias enzimas que atuam em solventes orgânicos ou fluidos supercríticos na ausência de água. Maior solubilidade do substrato, especificidade enzimática modificada e reversão das reações hidrolíticas são algumas das vantagens acumuladas com estas adaptações. Isso permite ampliar a gama de aplicação das reações via catálise enzimática e possibilita expandir o emprego destas reações na resolução de compostos farmacêuticos e intermediários químicos quirais e em reações de polimerização régio- e enantiosseletivas (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

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

Dentre as enzimas utilizadas no setor de alimentos, as inulinases microbianas podem ser destacadas como uma importante classe de enzimas industriais, as quais vêm recebendo especial atenção nos últimos anos (CONTIERO, 2004).

As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando a inulina como matéria-prima (ETTALIBI; BARATTI, 2001). O xarope de frutose tem efeitos benéficos em pacientes diabéticos, aumenta a absorção de ferro em crianças, tem elevada capacidade adoçante para que possa ser usado na dieta de pessoas obesas, estimula a absorção de cálcio em mulheres pós-menopáusicas, estimula o crescimento de bifidobactérias no intestino grosso e delgado e evita o câncer do cólon (ROCHA et al., 2006). A frutose também é amplamente usada em muitos alimentos, medicamentos e bebidas, em substituição à sacarose (GILL et al., 2006a; CHEN et al., 2009).

As inulinases também têm sido utilizadas na produção de frutooligossacarídeos (KIM et al., 1997). Estes compostos têm atraído especial atenção pelo aumento da demanda no consumo de alimentos saudáveis ou ingredientes de alimentos considerados saudáveis, como são designados os frutooligossacarídeos (CHIEN et al., 2001). A ingestão destes compostos estimula o aumento da população de bifidobactérias, que é o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal (GIBSON; WANG, 1994).

A utilização de enzimas na indústria alimentícia é limitada devido a fatores como instabilidade operacional, custos e dificuldade de recuperação para a reutilização após o término do processo catalítico. Técnicas de imobilização enzimática vêm sendo bastante estudadas a fim de diminuir ou eliminar os problemas pelo emprego de enzimas solúveis em processos industriais (MATEO et al., 2007). A maioria das enzimas imobilizadas utilizadas em processos de hidrólise é de origem microbiana, por apresentarem baixo custo, boa estabilidade e elevada atividade catalítica (FUREGON et al., 1996).

Em geral, a utilização de enzimas é acompanhada do emprego de solventes orgânicos líquidos para melhorar a estabilidade da mesma e permitir o adequado contato entre os substratos e o(s) centro(s) ativo(s) da enzima. Entretanto, o uso destes solventes apresenta desvantagens, como a sua toxicidade, difícil separação dos produtos e uso de volumes elevados. Neste sentido, esforços consideráveis têm sido apresentados na literatura no sentido da realização de reações utilizando tecnologias limpas conduzidas em fluidos sub e supercríticos (KNEZ et al., 1998; KUMAR et al., 2004; OLIVEIRA;

OLIVEIRA, 2000; DALLA ROSA et al., 2008). O uso de fluidos pressurizados como solventes para reações químicas pode ser uma rota promissora no sentido de eliminar traços de solventes líquidos convencionais dos produtos da reação. Adicionalmente, processos industriais em condições próximas ao ponto crítico podem ser vantajosos em termos de consumo de energia, facilidade de recuperação do produto e minimização da formação de produtos secundários (KNEZ et al., 1998).

O poder catalítico e seletividade das enzimas dependem da manutenção da sua estrutura terciária e, se multimérica, também da quaternária. Qualquer agente que altere essas estruturas tais como pH, temperatura e solventes hidrofóbicos podem causar a inativação da enzima.

Fazendo-se uma análise geral na literatura, observa-se que, enquanto existe uma considerável quantidade de dados acerca da atividade e estabilidade de enzimas em dióxido de carbono, há proporcionalmente, pouca informação relacionada a outros solventes pressurizados, tais como o propano e o GLP (Gás Liquefeito de Petróleo), principalmente quando se tratam também de enzimas não comerciais, muito importantes devido ao seu baixo custo de obtenção.

Tendo em vista suas propriedades e capacidade de dissolver compostos hidrofóbicos, aponta-se o emprego do propano e também do GLP, este último de baixo custo, como solventes interessantes para as reações catalisadas por inulinases.

Levando-se em consideração o exposto até o momento, da grande importância da investigação do comportamento de enzimas em fluidos pressurizados, do potencial de aplicação industrial das inulinases, e da observação do estado da arte que revela ausência de um estudo mais detalhado no que se refere ao objeto de interesse deste trabalho; de grande relevância é a avaliação deste processo, o qual utiliza a inulinase como biocatalisador em diferentes fluidos pressurizados e suportes de imobilização, buscando alcançar altas atividades e estabilidade para esta enzima, bem como empregar tecnologias de baixo custo para sua aplicação na síntese de FOS.

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consiste em investigar, de forma ampla, o comportamento das inulinases *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e *Aspergillus niger*, não comercial e comercial, respectivamente, ambas imobilizadas em montmorillonita e a *Aspergillus niger* também em espuma de poliuretano (PU), pré-tratadas nos fluidos propano e GLP pressurizados, com posterior aplicação destes catalisadores na síntese de frutooligossacarídeos.

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

- ✓ Avaliar a influência das variáveis pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade enzimática da inulinase não comercial *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, imobilizada em argila montmorillonita Poço A, quando submetida ao tratamento com propano e GLP pressurizados;
- ✓ Avaliar a influência das variáveis pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade enzimática da inulinase comercial *Aspergillus niger*, imobilizada em argila montmorillonita Poço A, quando submetida ao tratamento com propano e GLP pressurizados;
- ✓ Avaliar a influência das variáveis pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização na atividade enzimática da inulinase comercial *Aspergillus niger*, imobilizada em espuma de poliuretano, quando submetida ao tratamento com GLP pressurizado;
- ✓ Estudo da estabilidade das enzimas imobilizadas armazenadas em baixas temperaturas após tratamento em fluido pressurizado;
- ✓ Aplicação das enzimas imobilizadas e tratadas em fluidos pressurizados na catálise de reações de interesse da indústria de alimentos, mais especificamente, na síntese de frutooligossacarídeos, fazendo uso de meio orgânico e aquoso e utilizando como substrato sacarose e inulina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta uma explanação sobre o estado da arte concernente aos aspectos a serem abordados neste trabalho, procurando evidenciar a relevância do tema sob investigação para a literatura científica. Na sequência será apresentada uma visão geral sobre as enzimas, inulinases, evidenciando suas vantagens e características. Após, especificamente de interesse para o desenvolvimento deste trabalho, aborda-se o uso de fluidos pressurizados sobre a atividade e estabilidade das enzimas, enfatizando as variáveis que influenciam nas mesmas, bem como a aplicação destas enzimas pré-tratadas na síntese de FOS.

### 2.1 ENZIMAS

Muito da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Em 1926, James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ . As enzimas desempenham a função de catalisar as reações nos organismos, têm a capacidade de promover e acelerar reações químicas.

As enzimas são, em sua grande maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência as reações metabólicas sob diversas condições de pH, temperatura, meio iônico, entre outros.

A natureza quiral das enzimas resulta na formação de produtos de maneira altamente estéreo- e regiosseletiva. A capacidade em atuar a temperaturas brandas, condições neutras e aquosas, além do elevado número de ciclos catalíticos, chama a atenção para o uso de enzimas em síntese química. Os biocatalisadores permitem a biotransformação de compostos polifuncionalizados e sensíveis em condições amenas, ao contrário das variantes químicas correspondentes que exigem condições reacionais severas. As enzimas também possuem alta especificidade pelo substrato e reduzida

formação de produtos indesejáveis. Muitas delas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinado substrato. Este centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e de um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima (LEHNINGER, et al., 2002).

O estudo das ações de enzimas em reações do metabolismo levou à identificação e purificação de milhares delas, à elucidação de sua estrutura molecular e do seu mecanismo químico de ação leva a uma compreensão geral de como elas funcionam (LEHNINGER, 1970 apud BRÍGIDA, 2006).

Todas as enzimas conhecidas são proteínas e estas, sejam das mais antigas linhagens de bactérias ou das formas de vida mais evoluídas, são construídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, unidos covalentemente em sequências características. Esta sequência apresenta quatro níveis de estruturas. A estrutura primária, que determina a forma e a função da proteína, é somente uma sequência dos aminoácidos, sem levar em conta a orientação espacial da molécula, dando uma completa descrição das ligações covalentes da proteína. A estrutura secundária é função dos ângulos formados pelas ligações peptídicas que ligam os aminoácidos. A conformação espacial é mantida graças às interações intermoleculares (pontes de hidrogênio) entre os hidrogênios dos grupos amino e os átomos de oxigênio dos outros aminoácidos. Em geral, estas ligações forçam a proteína a assumir uma forma helicoidal, como uma corda enrolada em torno de um tubo imaginário. Esta forma, a mais comum, é chamada de  $\alpha$ -hélice. A estrutura terciária relaciona-se com as dobraduras da cadeia protéica sobre ela mesma. A forma das proteínas está relacionada com sua estrutura terciária. O que determina a estrutura terciária são as cadeias laterais dos aminoácidos; algumas cadeias são tão longas e hidrofóbicas que perturbam a estrutura secundária helicoidal, provocando a dobra da proteína. Muitas vezes, as partes hidrofóbicas da

proteína agrupam-se no interior da proteína dobrada, longe da água e dos íons do ambiente onde a proteína se encontra, deixando as partes hidrofílicas expostas na superfície da estrutura da proteína. Regiões como "sítios ativos", "sítios regulatórios" e módulos são propriedades da estrutura terciária. Existe, finalmente, a estrutura quaternária, que se refere à conformação espacial das subunidades. Esta estrutura é mantida pelas mesmas forças que determinam as estruturas secundárias e terciárias (LEHNINGER et al., 2002).

A especificidade enzimática baseia-se nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals e as interações eletrostáticas. Isto ocorre somente quando várias dessas interações acontecem simultaneamente entre as duas moléculas (enzima e substrato/inibidor) em uma estrutura tridimensional (DIXON, 1979).

A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima, depende da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (LIMA et al., 2001).

### **2.1.1 Inulinases**

Dentre as enzimas utilizadas no setor de alimentos, as inulinases microbianas podem ser destacadas como uma importante classe de enzimas industriais, as quais vêm recebendo especial atenção nos últimos anos (CONTIERO, 2004). As inulinases podem ser obtidas de leveduras, fungos, bactérias e de plantas (MANZONI; CAVAZZONI, 1992).

Inulinases são 2,1- $\beta$ -D-frutano-furohidrolases (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero formado por moléculas de frutose com ligações  $\beta$ -2,1, liberando moléculas de frutose (ETTALIBI; BARATTI, 2001). A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose e na produção de frutooligossacarídeos (FOS), os quais têm assumido grande importância como ingredientes funcionais, devido às suas

características de estimular a microflora intestinal e a absorção de minerais, além de melhorar a vida de prateleira e qualidade nutricional dos alimentos (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

As inulinases foram descobertas por Lindner, em 1900, que observou a capacidade de utilização de inulina por cepas de leveduras *Kluyveromyces marxianus*. Desde então o seu estudo prende a atenção de cientistas, focando objetivos como indução, síntese, isolamento, mecanismos de reação e propriedades de inulinases produzidas tanto por vegetais como por micro-organismos. Dentre os pioneiros citam-se: Pringsheim e Kohn, os quais produziram inulinase sintetizada por *Aspergillus niger*; Edelman e Jefford, Flood et al. e Rutherford e Deacon, que isolaram inulinases de tubérculo de alcachofra de Jerusalém, raiz de chicória e raiz de dália, respectivamente (VANDAME; DERYCKE, 1983).

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

Os gêneros *Kluyveromyces marxianus* e *Aspergillus niger* são descritos como os micro-organismos mais promissores na produção de inulinase. As leveduras deste gênero podem crescer rapidamente atingindo alta concentração celular em um curto período de tempo, produzindo grandes quantidades da enzima (HENSING et al., 1994).

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

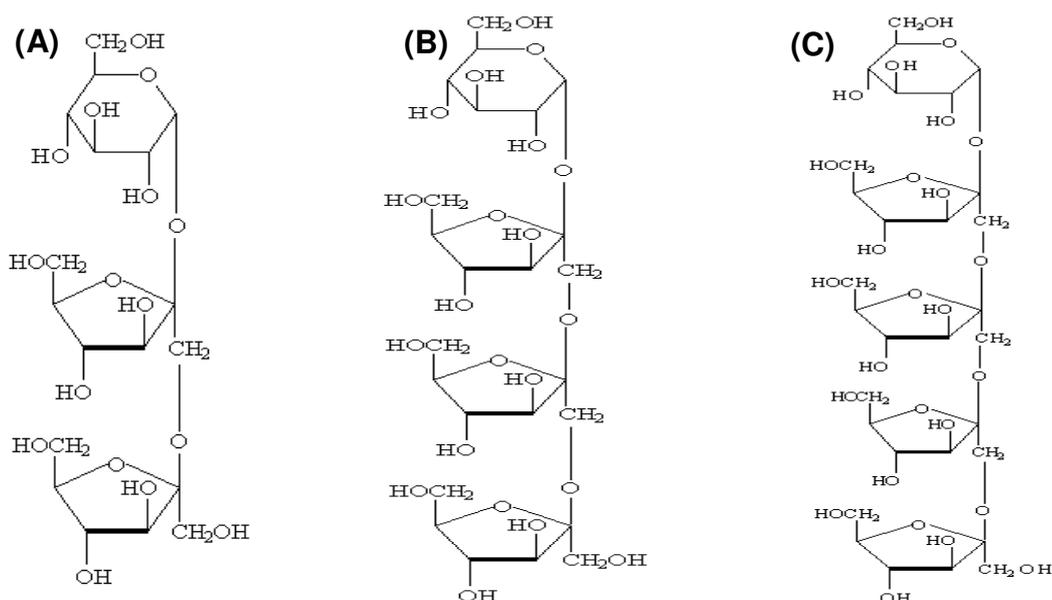
polímero vegetal, em frutose praticamente pura (VANDAMME; DERYCKE, 1983).

Assim, as inulinasas podem ser utilizadas em processos de hidrólise da inulina para obtenção de xarope de frutose e de frutooligossacarídeos, e também na síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose.

### 2.1.2 Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos – FOS – são oligossacarídeos de ocorrência natural, principalmente em produtos de origem vegetal, como alcachofra, aspargo, beterraba, cana-de-açúcar, chicória, banana, alho, cebola e trigo. São considerados açúcares não convencionais e compostos por uma molécula de sacarose na qual são ligadas de 1 a 3 moléculas de frutose, resultando nos compostos kestose (GF2), nistose (GF3) e frutossilnistose (GF4) (Figura 1) (PASSOS, 2003; SILVA, 2008).

**Figura 1:** Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: kestose (A), nistose (B) e frutossilnistose (C)



A inulina (inulo-oligofrutose) e os frutooligossacarídeos são considerados alimentos, ingredientes alimentares ou fibras em diferentes países. Eles têm recebido muita atenção, por causa do seu efeito sobre a flora intestinal. A inulina contém em média 30 unidades de frutose, enquanto que os frutooligossacarídeos (também denominados oligofrutoses) contêm 2 a 9 unidades de frutose que são ligadas a uma unidade de glicose terminal (MAKINO, 2004).

Essa é uma das áreas que vêm crescendo ano a ano, e refere-se ao grupo de alimentos funcionais onde o Brasil apresenta grande potencial de desenvolvimento. Os frutooligossacarídeos se enquadram nesse grupo, e representam uma das principais classes de oligossacarídeos bifidogênicos, importantes no processo digestivo humano.

Os frutooligossacarídeos são normalmente produzidos por dois processos distintos, mas que não apresentam diferenças significativas no produto final. No primeiro processo a sacarose é utilizada como substrato, obtendo como produto frutooligossacarídeos de 2 a 4 unidades frutossil com ligações  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1), com um resíduo  $\alpha$ -D-glicosil terminal, conhecidos como kestose, nistose e frutossilnistose (SANTOS, 1998). O segundo processo constitui-se na hidrólise enzimática da inulina, produzindo frutooligossacarídeos de cadeia longa (PLAYNE; CRITTENDEN, 1996).

Os frutooligossacarídeos são os principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, açúcares formados de 1 a 3 moléculas de frutose ligadas a uma molécula de sacarose na posição  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1). Apresentam propriedades físicas e fisiológicas que os tornam compostos de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São açúcares não digeridos pelo organismo humano, passam através do intestino delgado sem serem absorvidos e vão direto para o intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microflora intestinal (MITSOUKA, 1990).

Os FOS são considerados prebióticos, pois promovem, seletivamente, o crescimento de probióticos como *acidophilus* e *bifidus* no trato digestivo. Essa característica faz com que os FOS gerem uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol cérico até a sua utilização por

diabéticos, por ser um açúcar de baixas calorias (BORNET, 1994). O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de açúcar, sendo a região Centro-Sul o grande pólo produtor, onde o crescimento em produção deve chegar a 9% em 2013/2014 em função das condições climáticas favoráveis e do aumento da produtividade. O Centro-Sul deve produzir 35,8 milhões de toneladas em 2013/2014, ante 32,8 milhões de toneladas em 2012/2013. As exportações de açúcar da região, que respondem por cerca de 90% da produção brasileira de açúcar, podem aumentar de 22,7 milhões de toneladas para 25,5 milhões de toneladas (ANDRIOLI, 2012).

#### 2.1.2.1 Mecanismos de ação e efeitos benéficos

A inclusão de prebióticos na dieta acarreta vários benefícios à saúde, principalmente os relacionados com seu efeito bifidogênico. Vários trabalhos *in vitro* e em humanos têm demonstrado que a inulina e o FOS passam por um processo de fermentação diferenciado produzindo esse efeito (PIMENTEL et al., 2005). Gibson (1999) realizou estudos com culturas mistas, visando retratar um meio ambiente parecido com o intestinal, demonstrando que o crescimento de bifidobactérias é estimulado pelo uso de FOS, de tal maneira que esse gênero prevalece em números maiores que outras bactérias. A inulina também é frequentemente metabolizada por bactérias anaeróbicas (bifidobactérias). Em humanos, o número de trabalhos sobre o efeito desses frutanos (inulina e oligofrutose) no metabolismo mineral é limitado e a ação positiva na absorção de cálcio parece ocorrer sob condições de maior necessidade deste mineral como, por exemplo, em adolescentes e mulheres na pós-menopausa. A intensidade dos efeitos está relacionada com o grau de fermentação dos carboidratos pela microbiota intestinal e pode depender da dose ingerida dentro de determinada faixa (CUPPARI, 2005).

Devido as suas características físico-químicas e bioquímicas, os oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para alimentação humana (bebidas, adoçantes, leite em pó

infantil) e animal (ração), assim como aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos (PLAYNE; CRITTENDEN, 1996). Sua utilização como alimento funcional é proposta desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias, em função disso, são denominados prebióticos.

A ingestão de FOS estimula o aumento da população de bifidobactérias do cólon, que é numérica e fisiologicamente o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal, visto que atuam com consequente supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas existentes no intestino grosso, restringindo, portanto, a formação de toxinas e outras substâncias nocivas ao ser humano (GIBSON; WANG, 1994). As bifidobactérias, micro-organismos anaeróbicos não formadores de esporos e gram-positivos, ocorrem naturalmente no intestino humano, trazendo uma série de benefícios para a saúde (MODLER, 1994).

As bifidobactérias são responsáveis pelos seguintes efeitos benéficos: manutenção normal da flora intestinal, atividade anticariogênica, estímulo ao sistema imunológico e melhora no valor nutricional dos alimentos (MARX et al., 2000).

A indigestibilidade dos oligossacarídeos parece ter efeitos similares ao das fibras prevenindo a constipação, porém o uso excessivo pode causar flatulência e diarreia (SPIEGEL et al., 1994).

Com relação à frutose, a obtida por hidrólise da inulina é mais desejável comparada à obtida por processo convencional, no qual a frutose é produzida a partir de amido. Frutose obtida a partir da inulinase consiste em uma reação enzimática simples, na qual se pode obter produtos com 95% de frutose. Por outro lado, a produção convencional de frutose precisa de três etapas enzimáticas incluindo a ação da  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e glicose isomerase, produzindo apenas 45% de solução de frutose no melhor caso, pois o equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose é próximo de 50% de glicose e 50% de frutose (KIM; RHEE, 1989).

A frutose é utilizada atualmente como adoçante em alimentos e indústrias farmacêuticas. Ela tem melhores propriedades organolépticas sendo

mais doce que a sacarose e a glicose, e também tem algumas vantagens fisiológicas que permitem sua utilização como um substituto do açúcar em alimentos e preparações farmacêuticas. Ela é menos cariogênica; pode ser melhor indicada para diabéticos, devido ao seu maior poder adoçante; além de mascarar o sabor residual amargo provocado pela sacarina. A sacarose é um importante adoçante utilizado em todo o mundo, porém implica em alguns aspectos negativos, contribuindo para a arteriosclerose, levando à obesidade, devido ao alto teor calórico, e ao ser contra indicada para a maioria das pessoas. Uma extensiva busca tem sido realizada para identificar adoçantes com baixo poder calórico e ausente de efeitos tóxicos (BARRANCO-FLORIDO et al., 2001; VANDAMME; DERYCKE, 1983).

#### 2.1.2.2 Produção de FOS

A evolução da biotecnologia tornou possível a produção em grande escala de FOS por síntese enzimática.

A inulinase, principal enzima utilizada para sintetizar FOS, apresenta propriedades funcionais e pode ser sintetizada a partir da sacarose (SANTOS; MAUGERI, 2007). A estequiometria global de ação da inulinase em sacarose pode ser caracterizada por duas reações paralelas (VANKOVÁ et al., 2008). Um conjunto de reações fornece FOS e glicose (como um sub-produto) a partir da atividade da frutossiltransferase, enquanto a atividade hidrolítica da enzima resulta na formação de glicose e frutose como sub-produtos (ABOUDZADEH et al., 2006).

Os micro-organismos utilizados inicialmente para a produção industrial de FOS foram *Aspergillus niger* (Meiji Seika Cia., Japão) e mais tarde células imobilizadas de *A. pullulan* (Cheil Foods & Chemicals Co., Coréia). Entretanto, as enzimas com potencial para a aplicação industrial na produção de FOS podem ser produzidas por fungos como o *Aerobasidium* sp., *Arthrobacter* sp., *Aspergillus* sp., e por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, etc (YUN, 1996a).

A síntese de FOS em sistemas aquosos é amplamente estudada e analisada por vários autores (CHIEN et al., 2001; SANGEETHA et al., 2004 e 2005). Santos e Maugeri (2007) investigaram a síntese de FOS em sistema aquoso, utilizando sacarose e inulinase, em reatores agitados e empacotados, em modo batelada e contínuo, com a enzima livre e imobilizada. Os resultados mostraram pequena diferença entre os processos investigados.

A aplicação de enzimas como catalisador em sistemas utilizando solvente orgânico, também recebeu uma grande atenção, sendo uma alternativa viável, devido algumas características notáveis, como a fácil preparação, as suaves condições reacionais, e a fácil separação dos produtos ao término da reação. Além disso, com a introdução de uma enzima em um meio orgânico, esta é submetida a uma série de fatores, os quais podem alterar sua função e estrutura nativa (QUIROGA et al., 2007). Quando a fração molar de água em uma mistura reacional é reduzida pela adição de um solvente orgânico, é possível deslocar o equilíbrio de uma reação reversível - hidrólise e síntese – a favor da síntese (OGINO; ISHIKAWA, 2001). De acordo com Illanes e Barberis (1994), a catálise em meio orgânico apresenta algumas vantagens quando comparada a catálise em meio aquoso, como mudanças no equilíbrio da reação, redução da inibição causada por substratos e produtos, menor risco de contaminação, e de variação da especificidade de algumas enzimas. Embora existam vários relatos na literatura de que a utilização de solventes orgânicos em reações enzimáticas melhoraram o rendimento, há poucos dados em termos de síntese de FOS neste meio, utilizando inulinase ou  $\beta$ -frutossiltransferase.

Somiari e Bielecki (1998) estudaram a síntese de oligossacarídeos pela invertase comercial em meio orgânico. Entre os solventes utilizados o que apresentou melhores resultados para a síntese foi o acetato de butila com 12,1%, enquanto que em meio aquoso foi de 1,5% .

Com relação às concentrações de substrato, o trabalho de Cruz et al. (1998) mostra que o aumento da concentração de sacarose no sistema reacional produziu um linear aumento na produção de FOS, até uma concentração ótima de 65%. A maior síntese de FOS em soluções

concentradas de sacarose foi observada pela primeira vez por Hidaka et al. (1988), embora as concentrações testadas foram de no máximo 50%. Park e Almeida (1991) verificaram um considerável aumento na produção de FOS, paralelo a diminuição no conteúdo de frutose livre quando a concentração de sacarose aumentou de 30 para 60%, o que foi explicado devido à competição entre a água e os substratos utilizados como aceptores nas reações catalisadas pela  $\beta$ -frutossiltransferase. Concentrações mais elevadas de sacarose também produziram maiores concentrações de kestose, com uma consequente diminuição dos oligossacarídeos com número maior de cadeias de frutose, como nistose e frutossilnistose.

De acordo com o modelo proposto por Jung et al. (1989), a síntese de FOS é sempre sequencial, no sentido  $GF2 \rightarrow GF3 \rightarrow GF4$ , como uma consequência do aumento do valor do  $K_m$  apresentado pela frutossiltransferase. Assim, são necessárias concentrações elevadas dos primeiros oligossacarídeos para a síntese de seus homólogos com número maior de unidades de frutose. Isto também explica porquê o conteúdo de kestose é mais elevado no início da reação enzimática.

Hayashi et al. (2000) obtiveram, após o processo de otimização, a partir de células de *Penicillium citrinum*, uma taxa de conversão de sacarose de 55%, sendo 22% de kestose, 14% de nistose e 11% de neokestose. Em outro trabalho, Sangeetha et al. (2002) utilizaram a linhagem *Aspergillus oryzae* CFR 202 e obtiveram uma conversão de 58% da sacarose em relação à concentração inicial, que era de 25%, correspondendo assim a uma produção de 33% de FOS. Neste trabalho, foram otimizadas dezesseis variáveis, como por exemplo, pH e tempo de fermentação.

Nos estudos realizados por Kim et al. (2000), foi encontrada uma nova  $\beta$ -D-frutofuranosidase, com atividade de frutossilção, produzida por um isolado de *Bacillus macerans* EG-6. Neste trabalho, os autores obtiveram, após a fermentação, 42% de produção de GF4, sem formação de qualquer outro frutooligossacarídeo. Essa reação ocorreu em pH e temperatura ótimos de 6,0 e 37 °C, respectivamente.

Em pesquisa realizada por Lin e Lee (2008) foram utilizadas cepas de *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus niger*, ambas imobilizadas em alginato de cálcio. Em um biorreator com capacidade de 3 L adicionou-se meio contendo sacarose (300 g/L), com uma aeração de 7,32 cm/s, na primeira parte da produção adicionou-se 60 g de *Aspergillus japonicus* conseguindo um total de FOS de 55% de conversão em relação ao total de açúcar da mistura para uma reação de 9 horas. Para aumentar a conversão, acrescentou-se ao meio 315 g de *Aspergillus niger*, com isso a fração de FOS encontrada foi de 90%.

Contado (1998) estudou a produção de frutooligossacarídeos utilizando  $\beta$ -frutofuranosidase de *A. niger*. A maior proporção de frutooligossacarídeos (54,21%) em relação aos açúcares totais contidos na reação ocorreu no substrato sacarose 30% após 6 horas de incubação.

A produção de frutooligossacarídeos, obtida por Sangeetha et al. (2004), foi de 54% em relação à concentração inicial de sacarose. Os frutooligossacarídeos foram obtidos a partir da frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* CFR 202 no tempo de reação de 12 horas e temperatura de 55 °C.

Segundo Hang e Woodams (1996), após 14h de reação a 65 °C em tampão acetato (0,05 mol/L de e pH 5,6), a enzima comercial Pectinex Ultra SP-L, converteu 450 g/L de sacarose em 272 g/L de frutooligossacarídeos (224 g/L kestose e 48 g/L de nistose). Os frutooligossacarídeos, sacarose, glicose e frutose constituíam 56,5%, 19,4%, 23,4% e 0,7%, respectivamente, dos açúcares totais presentes no xarope.

Rendimentos máximos de frutooligossacarídeos a partir de sacarose pela ação da frutossiltransferase obtida de *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* foram relatados por variar de 55 para 60% (HIDAKA et al., 1988; HANG; WOODAMS, 1995; HIRAYAMA; HIDAKA, 1989).

Apesar de resultados bastante interessantes encontrados na literatura, a principal desvantagem do processo de síntese de FOS ainda é a falta de um catalisador eficiente e de baixo custo. Estudos têm relatado a seleção de micro-organismos com boa atividade de transfrutossilacção (MAUGERI et al., 2007; MADLOVA et al., 1999; FERNANDEZ et al., 2007), mas pode-se dizer que esta abordagem é complicada, pois um grande número de resultados positivos

ainda podem falhar. Apenas algumas destas enzimas têm o nível de atividade de transfrutossilação necessário para aplicações industriais (BALLESTEROS et al., 2007). Além disso, estas enzimas isoladas não estão ainda comercialmente disponíveis. Atualmente, uma das alternativas mais comuns discutidas na literatura é a imobilização de frutossiltransferases (YUN, 1996a; ONDERKOVA et al., 2007), a qual se justifica pelo alto custo da enzima e sua baixa estabilidade e/ou inativação devido as condições reacionais (YUN, 1996b).

### **2.1.3 Atividade enzimática**

Segundo Scriban (1985), a atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária ou quaternária. Nessas condições, todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento, modificação do pH, pressão), dificultando ou impedindo a fixação do substrato na enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, alterará as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento. Existe uma zona de temperatura, às vezes estreita, para qual a atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é determinada em condições de operação bem definidas. De fato, a variação da atividade enzimática resulta de dois efeitos antagônicos: de um lado, o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima; de outro, a desnaturação da proteína enzimática. Esta desnaturação vai modificar as estruturas terciária e quaternária da proteína globular e fazer, portanto, a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. De fato, na desnaturação das enzimas pelo calor, o que conta, sobretudo, é o binômio tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico.

A expressão da atividade de uma enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (Internacional Union of Biochemistry) considera uma unidade de atividade

como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto em condições de ensaio definidas (LIMA et al., 2001).

#### **2.1.4 Imobilização de inulinases**

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

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições brandas de reação, baixo consumo de energia, e maior atividade catalítica, sua utilização em processos industriais têm sido limitada. Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos.

Com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, têm-se estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio de reação, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (ZANIN; MORAES, 2004).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. A imobilização de enzimas normalmente é necessária, pois esta permite inúmeras vantagens, tais como:

- ✓ A reutilização do biocatalisador;
- ✓ A redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- ✓ A facilidade do controle operacional; operar de forma contínua possibilita um controle mais fácil das variáveis do processo;
- ✓ A fácil purificação do produto sem contaminação pelo catalisador, visto que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação.

De acordo com Dalla-Vecchia (2004), o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não

sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.

Apesar da alta eficiência catalítica das enzimas, fatores ligados ao custo e à estabilidade limitam a utilização destes biocatalisadores. O uso de um catalisador relativamente caro como uma enzima exige, em muitos casos, sua recuperação e reuso para se ter um processo economicamente viável (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007).

A escolha de um processo de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para a fixação da enzima. Assim, o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a controle e *down-streaming process* (DALLA-VECCHIA et al., 2004; CAO, 2005).

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos, isto é, podem ser encapsuladas; adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; copolimerizadas com algum monômero ou se ligar a uma matriz insolúvel por ligações covalentes (GUISAN, 2006; HANEFELD et al., 2009; VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA, 2004; JEGANNATHAN et al., 2008; CARDOSO et al., 2009; MATEO et al., 2007; FREITAS et al., 2007). Estes métodos são bem revisados e discutidos na literatura (GUISAN, 2006; HANEFELD et al., 2009; VILLENEUVE et al., 2000).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

Em geral, os métodos mais utilizados para imobilização de enzimas são adsorção e oclusão da proteína no interior do polímero (POWELL, 1990). O processo de oclusão consiste no aprisionamento de uma enzima em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, de tal forma que se permita a penetração do substrato e difusão dos produtos e impeça a liberação da proteína, conservando integralmente sua estrutura (RODRIGUES, 1997).

No processo de adsorção, a fixação da proteína é puramente física, ou seja, a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e força de Van der Waals (KEMENY; CHALLACOMBE, 1988).

O comportamento da enzima imobilizada e o desempenho do suporte empregado podem ser influenciados por vários parâmetros como pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de co-fatores e do substrato com a remoção dos produtos. Entretanto, dos fatores citados, a maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é fornecida pela estratégia de imobilização empregada (CÁRDIAS et al., 1999) e pelo suporte, de forma que a seleção do mesmo pode tanto aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada como afetar adversamente não só o tempo de meia-vida, mas o desempenho global do sistema (GOMES et al., 2006).

Entre os suportes mais estudados e utilizados pode-se citar: polissacarídeos (agarose, celulose, amido, dextrana, quitosana), proteínas (colágeno, gelatina, albumina), polímeros sintéticos (poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas, vinil e polímeros aliis), minerais (bentonite, sílica) e materiais fabricados (vidro não-poroso, vidro de poro controlado), entre outros (CABRAL; KENNEDY, 1991). Cápsulas de gel de alginato de cálcio (TANRISEVEN; DOGAN, 2001), microcápsulas de quitosana (SISO et al., 1997), micro-esferas magnéticas de polivinilálcool (AKGÖL et al.,

2001), montmorillonita (SANJAY; SUGUNAN, 2005) e fenil-sefarose (BASHA; PALANIVELU, 2000) também têm sido citados na literatura como potenciais suportes para diversas classes de enzimas.

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

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

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

A espuma de poliuretano (PU) constitui outro tipo de suporte bem conhecido devido a sua capacidade de aprisionar ou de outra forma, imobilizar

materiais biológicos (FUKUI; SONOMOTO; TANAKA, 1987). Sua utilização se faz pela sua elevada resistência mecânica e resistência ao ataque de solventes orgânicos e micro-organismos (OH et al., 2000; ZHOU et al., 2009) e sua característica de ser bioquimicamente inerte (BANG et al., 2001; KLEIN; KLUGE, 1981; WANG ; RUCHEINSTEIN, 1993). PU faz espuma com células abertas, como resultado da condensação do policianatos (R-CNO) e polióis (R-OH). Após a polimerização, o dióxido de carbono ao escapar da matriz, deixa poros para trás. Normalmente, matrizes porosas de PU, não só aumentam a área de superfície, mas também minimizam a limitação de difusão do substrato e do produto. Um ambiente de difusão limitado é uma desvantagem comum dos polímeros correntemente utilizados para encapsulação, tais como acrilamida, alginato, carragenina (BANG; PAZIRANDEH, 1999; BANG et al., 2001). Para superar as dificuldades de limitação de difusão, uma variedade de PUs hidrofílicos têm sido identificados e testados para a imobilização de enzimas e células microbianas (FUKUSHIMA et al., 1978; FUSEE, 1987; O'REILLY; CRAWFORD, 1989). Hypol 2000 e 3000 também são usados com sucesso como matrizes de imobilização para as células microbianas na biodegradação de produtos químicos tóxicos (O'REILLY; CRAWFORD, 1989;). Fukushima et al. (1978) imobilizaram invertase utilizando pré-polímeros de uretano, tais como Hypol 2000. Celulase imobilizada em espuma feita a partir de Hypol 2002 foi aplicada na degradação de celulose (CHAKRABARTI; STOREY, 1988).

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. 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. 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 54% de atividade quando imobilizados em tubo de Tygon e amino etil celulose, respectivamente (PAULA et al., 2008).

Bajpai e Margaritis (1987) realizaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* por ligação metálica, com 72% de retenção da atividade enzimática original. Com a finalidade de promover a bioconversão da inulina de *Helianthus tuberosus*, Gaspari et al. (1999) estudaram a imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes suportes, como quitina, alginato de sódio, pectina, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada (SPC), o qual obteve a maior taxa de imobilização de 73 U/g utilizando quitina com glutaraldeído. Um sistema de imobilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando como suporte alginato de bário tratado com glutaraldeído foi avaliado por Barranco-Florido et al. (2001).

Outros trabalhos com sistemas de imobilização de inulinase são reportados na literatura. Yun et al. (2000) avaliaram vários suportes na imobilização da inulinase de *Pseudomonas* sp. e encontraram os melhores resultados de eficiência e estabilidade operacional utilizando como suporte o poliestireno. Após a imobilização da inulinase de *A. ficcum* em vidro poroso, por ligação covalente, utilizando reagentes de silanização e reticulação, Ettalibi e Baratti (2001) obtiveram alta estabilidade térmica e valores de 29% a 71% de proteínas aderidas ao suporte, conservando até 77,20% da atividade imobilizada. Kochhar et al. (1998), ao imobilizar a inulinase de *A. versicolor*, obtiveram 56% de retenção da atividade enzimática em quitina e 10% em caseína. Catana et al. (2005) avaliaram a influência da concentração do suporte alginato de sódio sobre o rendimento de imobilização de uma preparação de inulinase comercial de *A. niger* (Fructozyme L.) visando a hidrólise da sacarose e uma alta atividade foi encontrada na faixa de 50-60 °C. A estabilidade da enzima comercial Fructozyme L. imobilizada em resina Amberlite IRC 50 foi estudada por Catana et al. (2007). Gill et al. (2006b) imobilizaram a inulinase de *A. fumigatus* em resinas Dowex e Amberlite e

obtiveram 63% e 39% de retenção da atividade enzimática, respectivamente. Em seus experimentos, ainda obtiveram total retenção enzimática ao imobilizar a inulinase em quitina e em matrizes de afinidade QAE-Sephadex e DEAE-Sephacel e Concanavalina A ligada a esferas de sílica amino-ativadas.

Contudo, o processo de imobilização pode também adicionar um obstáculo na transferência de massa, uma vez que o contato dos substratos com os sítios ativos das enzimas fica mais limitado do que quando a enzima se encontra na sua forma livre, daí o interesse no emprego de fluidos pressurizados, visando o aumento das taxas de transferência de massa, devido sua maior difusividade.

## **2.2 FLUIDOS PRESSURIZADOS**

O número de estudos acerca da catálise enzimática em fluidos pressurizados tem crescido rapidamente nos últimos anos. Há muitas evidências na literatura sobre a adequação destes fluidos como meio para reações enzimáticas.

Hoje, vários medicamentos, aminoácidos, sacarídeos e polissacarídeos, vitaminas e ésteres são produzidos por biotransformação enzimática em escala industrial. Essencialmente, todas estas reações são realizadas utilizando água como meio de reação. Ocasionalmente solventes orgânicos são utilizados como meio reacional. Apesar das reações químicas em fluidos sub e supercríticos (SCFs) tornarem-se operações em grande escala no século 20, a utilização comercial em larga escala destes fluidos para biossíntese ainda está em desenvolvimento.

Enzimas como catalisadores biológicos exigem estreitas condições operacionais de processo. A elevação da pressão, temperatura, bem como valores extremos de pH, podem levar à desativação de uma enzima (HABULIN; KNEZ, 2007). Substratos, bem como alguns produtos finais, causam a inibição da enzima, bloqueando o centro ativo da mesma. Considera-se que a inibição pelo substrato pode ser facilmente contornada, mantendo a concentração do

substrato em baixo nível através da adição contínua, já a inibição pelo produto é um problema mais complicado. A remoção gradual do produto por meios físicos é difícil de usar em sistemas de separação convencional, mas pode ser feita de um modo relativamente fácil com o uso de gases densos como meio de reação em um processo contínuo. Em um gás denso moléculas de enzima são conhecidas por se tornarem mais rígidas (KAMAT et al., 1993). Esta rigidez pode ser uma vantagem no caso de desativação da proteína, ou seja, a molécula da enzima não está propensa à desnaturação tão rapidamente (KNEZ, 2009).

Neste contexto, os fluidos pressurizados possuem diversas vantagens sobre os solventes líquidos, como a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (DALLA ROSA, 2006).

Dentre outras vantagens do uso de fluido pressurizado como meio reacional destaca-se: aumento da seletividade de reação, conversões elevadas, solubilização de reagentes, facilidade de separação de produtos e reagentes, catalisador e subprodutos na mistura (SUBRAMANIAN; McHUGH, 1988).

Vários aspectos podem ser considerados para se compreender as contribuições que o uso de fluidos pressurizados pode trazer à biotecnologia, o que justifica a realização de pesquisas no sentido de dominar esse novo processo, como apresentado a seguir (OLIVEIRA, 1999):

- ✓ Os métodos convencionais para a produção de compostos, via enzimática, na maioria das vezes, leva à formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados e recuperados do produto. Quando este processo é realizado via fluido pressurizado, este problema é minimizado, uma vez que os solventes pressurizados, além de exibirem propriedades similares aos solventes orgânicos, ainda possuem a capacidade adicional de facilitar a separação dos produtos após a reação.
- ✓ O uso de fluidos pressurizados como solventes em reações enzimáticas permite, também, o controle das variáveis que conduzem a

reação, regeneração do catalisador, controle da taxa de reação e controle da distribuição do produto.

✓ A substituição de um solvente orgânico convencional, tal como o hexano, por um fluido pressurizado ou supercrítico, resultará em taxas de transferência de massa maiores devido à maior difusividade destes fluidos.

As propriedades do fluido variam com a densidade, que está em função da temperatura e da pressão na região supercrítica. Isto torna os fluidos supercríticos atrativos como meios de reações químicas dando um maior controle das taxas de reação, equilíbrio, seletividade e atividade catalítica através da manipulação da temperatura e da pressão. Os estudos revelaram que técnicas e conceitos aplicados rotineiramente no estudo de reações em solução podem ser aplicados para reações em condições de alta pressão (SAVAGE et al., 1995).

Os parâmetros críticos dos fluidos mais comumente utilizados em reações enzimáticas são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Propriedades críticas dos solventes.

Solvente	Massa molecular (g/mol)	Temperatura crítica (K)	Pressão crítica (MPa)	Densidade (kg/L)
CO <sub>2</sub>	44,01	304,1	7,38	469
Água	18,02	647,3	22,12	348
Metano	16,04	10,4	4,6	162
Etano	30,07	305,3	4,87	203
Propano	44,09	369,8	4,25	217
Butano	58,12	425,15	3,75	250
Metanol	32,04	512,6	8,09	272
Etanol	46,07	513,9	6,14	276
Acetona	58,08	508,1	4,70	278

Fonte: Wen et al. (2009).

Knez et al. (1998) observaram em uma esterificação utilizando como biocatalisador Lipozyme IM e diferentes gases pressurizados como solvente, em várias faixas de temperatura e pressão, que não houve perda de atividade da lipase em pressões de até 300 bar por tempos de até 350 min de reação. Neste mesmo estudo, os autores reportam que quanto menor o diâmetro das partículas da enzima (menor valor investigado foi de 250  $\mu\text{m}$ ) maior é o incremento da taxa inicial de reação para este sistema.

Oliveira et al. (2006a) investigaram a influência da temperatura (35-75  $^{\circ}\text{C}$ ), pressão (10-250 bar), tempo de exposição (1-6 horas) e a taxa de depressurização (2-50 bar/min para propano e n-butano e 10-200  $\text{kg}/\text{m}^3\cdot\text{min}$  para dióxido de carbono) na atividade de esterificação das enzimas Novozym 435 e Lipozyme IM. Os resultados mostraram que ambas as enzimas apresentaram uma perda significativa de atividade na presença de dióxido de carbono. Para os demais gases, a Lipozyme IM teve apenas uma pequena perda da atividade, enquanto que a Novozym 435 teve um ganho de atividade quando submetida ao propano e n-butano.

A atividade hidrolítica de três lipases (Amano PS, Amano AY30 e lipase de *Yarrowia lipolytica*) nas formas livre, ressuspensa e imobilizada foi avaliada por Franken et al. (2010). De uma forma geral, para as lipases livres e imobilizadas, foi observado um aumento na atividade residual na presença de propano pressurizado. No caso das lipases ressuspensas, foi demonstrado que a cinética enzimática é sensível ao tratamento neste fluido, conduzindo em alguns casos a ganhos inexpressivos e em outros a perdas significativas da atividade enzimática.

Quando da utilização dos solventes pressurizados, muitos autores concluíram que o dióxido de carbono é o solvente que acarreta maior perda de atividade enzimática, diferentemente do propano e n-butano que se mostram solventes potenciais para a utilização em reações enzimáticas a altas pressões (DALLA ROSA et al., 2008).

Dalla Rosa et al. (2008) realizaram estudo para a produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja em propano pressurizado, utilizando a lipase Novozym 435, como catalisador. As variáveis do processo, temperatura (35 –

65 °C), pressão (50 – 150 bar), concentração de enzima (1 - 20% m/m), razão molar óleo:etanol (1:3 - 1:15) e razão mássica solvente/substratos (1:1 - 4:1) permitiram a determinação das melhores condições experimentais para a produção de biodiesel. Os resultados demonstram que 50 bar e 65 °C levam a melhor condição de pressão e temperatura, respectivamente, como também o emprego de baixa razão solvente/substratos (2:1), conversões da ordem de 100% foram atingidas neste sistema reacional. Dentro da faixa experimental deste trabalho (50 - 150 bar) o propano encontra-se como líquido pressurizado, de forma que a pressão apresenta pouca influência sobre as propriedades do solvente e sobre a conversão da reação.

As inulinases têm grande importância para uma variedade de aplicações industriais. No entanto, a parcela maior dos trabalhos refere-se à lipases tratadas em CO<sub>2</sub> supercrítico, daí o grande interesse em ampliar o conhecimento acerca do comportamento de enzimas, investigando o uso de inulinases tratadas em outros solventes pressurizados, como o propano, e também o GLP, para o qual estudos não constam na literatura até o momento.

Existe uma infinidade de aplicações para gases pressurizados e, possivelmente, um maior conhecimento das características e do comportamento de enzimas nestes solventes, significaria aprimoramento destas aplicações.

É importante salientar que, de modo geral, o solvente pode afetar fortemente a atividade da enzima através de sua interação com o suporte, no caso de enzimas imobilizadas, ou mesmo com radicais da própria enzima. Neste contexto, como etapa anterior à utilização de enzimas como catalisadores de reações, de fundamental importância é a avaliação de seu comportamento nestes solventes alternativos aos orgânicos convencionais (FEIHRMANN, 2005; PRIMO et al., 2007).

## **2.3 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Proteínas são estruturas delicadas, mantidas por interações entre a cadeia protéica (determinada pela sequência de aminoácidos) e pelas interações com o solvente ao redor. Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o complexo balanço das interações intramoleculares e entre solvente-proteína, e podem, conseqüentemente, levar ao desdobramento e/ou desnaturaçãõ da cadeia de peptídeos (HENDRICKX et al., 1998).

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliados e otimizados (DALLA-VECHIA et al., 2004). Assim, para a realização de reações enzimáticas a altas pressões, é fundamental, primeiramente, conhecer as variáveis que podem afetar a catálise enzimática em fluidos pressurizados. Cada variável será abordada individualmente, mas é importante salientar que o efeito destas sobre a atividade e estabilidade enzimática, frequentemente ocorre de forma combinada.

### **2.3.1 Água**

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese (DALLA-VECHIA et al., 2004).

De acordo com Zaks e Klibanov (1986), uma das principais propriedades das enzimas suspensas em sistemas não aquosos é o aumento da estabilidade térmica da enzima relativamente ao meio aquoso. A água possui um papel

importante na inativação enzimática à alta temperatura. Acredita-se que a altas temperaturas, a água aumente a mobilidade das moléculas de proteína e isto aumente a taxa de desnaturação.

Solventes mais hidrofílicos apresentam uma tendência maior em retirar a água essencial da molécula de enzima. Este princípio também pode ser aplicado a sistemas envolvendo fluidos pressurizados. Geralmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento do conteúdo de água adicionado ao fluido supercrítico, até um determinado limite. Quando o conteúdo de água excede o nível ótimo em reações de transesterificação, as reações de hidrólise tornam-se predominantes e a taxa da reação desejada decresce. Pode-se, com base nas informações da literatura, concluir que o tipo de reação e o meio reacional são também importantes na determinação da dependência da atividade enzimática com o conteúdo de água (OLIVEIRA, 1999).

### **2.3.2 Solvente**

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente. Na literatura, não existe um consenso claro com relação à escolha do parâmetro para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. Porém, o parâmetro mais frequentemente utilizado é o  $\log P_{\text{oct}}$ , definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água (DALLA-VECHIA et al., 2004).

Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}} \leq 2$  são denominados hidrofílicos e não são considerados adequados para a biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}}$  superior a 4 são denominados hidrofóbicos

e não perturbam a camada de água, mantendo o biocatalisador no seu estado ativo. Parâmetros como constante dielétrica ( $\epsilon$ ), polarizabilidade, bem como o parâmetro de solubilidade de Hildebrand ( $\delta$ ) e o de solubilidade tridimensional – uma derivação do parâmetro de Hildebrand – têm sido propostos para avaliar a influência do solvente nas reações catalisadas por enzimas (DALLA-VECHIA et al., 2004).

É muito difícil a priori prever a estabilidade e a atividade de uma enzima em qualquer fluido pressurizado. Um parâmetro adicional que influencia a estabilidade a longo prazo das enzimas nestes fluidos é o efeito da despressurização. Métodos de imobilização (físico ou químico) também influenciam a estabilidade da enzima e sua atividade. Estima-se que enzimas imobilizadas são mais estáveis em meio pressurizado e mantêm a sua atividade enzimática.

Embora o uso de solventes orgânicos em síntese enzimática possa apresentar algumas vantagens em determinados processos, há de se considerar o risco ambiental envolvido em tais processos. Considerando que uma das vantagens da utilização de enzimas em síntese orgânica é o baixo impacto ambiental deste processo, a utilização de solventes orgânicos pode então representar a perda ou minimização desta vantagem.

A substituição de um solvente orgânico, tal como o n-hexano, por um fluido pressurizado em reações enzimáticas, resultará em maiores taxas de transferência de massa devido às propriedades de transporte favorável. Um benefício adicional do emprego de fluido supercrítico na catálise enzimática é a presença de um meio adequado à recuperação dos produtos e reagentes (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000 e 2001).

Numerosos estudos mostraram que muitas reações podem ser conduzidas em dióxido de carbono líquido ou supercrítico e em fluidos pressurizados, como propano e n-butano (KNEZ; HABULIN, 2002; OLIVEIRA et al., 2000 e 2001; DALLA ROSA et al., 2008) devido suas propriedades de transporte favoráveis a transferência de massa.

Entretanto, há um inconveniente com relação à polaridade do CO<sub>2</sub>, pois suas características hidrofílicas podem afetar negativamente a atividade da enzima (OLIVEIRA et al., 2006a).

Para Habulin e Knez (2001), que utilizaram as lipases *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* e *porcine pancreas* em CO<sub>2</sub> supercrítico e propano a 300 bar e 40 °C por 24 horas, a atividade das enzimas em propano foi maior do que em CO<sub>2</sub> supercrítico, possivelmente devido às diferentes partições de água no solvente.

Oliveira et al. (2006b) avaliaram a atividade de esterificação de lipases imobilizadas (Lipozyme IM, Novozym 435 e lipase de *Yarrowia lipolytica*) em fluidos pressurizados: dióxido de carbono (70 – 275 bar), propano (30 – 250 bar) e n-butano (10 – 250 bar). No processamento em CO<sub>2</sub> as três lipases perderam atividade em todas as condições experimentais avaliadas. Para o processamento com propano, as lipases Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* apresentaram perda na atividade, enquanto que a Novozym 435 apresentou um aumento na atividade em todas as condições experimentais estudadas. O processamento em n-butano apresentou os mesmos resultados apontados no processamento com propano.

As enzimas mais largamente investigadas em fluidos pressurizados são as lipases, com relação a outras enzimas, existem poucos trabalhos na literatura investigando as mesmas em fluidos pressurizados. Há, por exemplo, trabalhos com subtilisina Carlsberg (FONTES et al., 1998; FONTES et al., 2003),  $\alpha$ -amilase, celulase e protease ácida (YAO et al., 2004), lipoxigenase e peroxidase (TEDJO et al., 2000) e polifenol oxidases (CHEN et al., 1992). Em especial, o trabalho de Fricks et al. (2006) com peroxidase de rabanete obteve uma atividade residual em torno de 215% após tratamento com dióxido de carbono a 70,5 bar e 30 °C por uma hora.

A atividade enzimática depende do tipo de fluido utilizado, provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-meio pressurizado que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima, as quais podem inibir ou inativar a

enzima por quebra das ligações de hidrogênio e iônicas. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (HABULIN; KNEZ, 2001).

O propano pressurizado, de caráter hidrofóbico, pode, assim, ser apropriado como um meio de reação para bioconversões catalisadas por enzimas, uma vez que o propano próximo ao seu ponto crítico tem uma constante dielétrica comparável a do CO<sub>2</sub> (KNEZ; HABULIN, 2002), e as pressões de transição de fase com o propano, geralmente encontradas em sistemas formados por compostos de massa molecular alta (triglicerídeos, por exemplo), são muito mais baixas do que aquelas encontradas em sistemas com CO<sub>2</sub> (LANZA et al., 2005; NDIAYE et al., 2006a; 2006b). Também, sendo estudado em recentes pesquisas nesta área, o uso do GLP (Gás Liquefeito de Petróleo) como solvente, pode ser uma rota promissora industrialmente e economicamente.

As formas como os solventes afetam a atividade enzimática e a enantiosseletividade ainda não é bem compreendida e as hipóteses apresentadas para explicar esse fenômeno apresentam discrepâncias entre si (COSTA et al., 1999). Pode-se observar nos trabalhos que exploram esse tema a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos aos sistemas estudados, evitando-se generalizações. Assim, devido ao fato de as enzimas responderem diferentemente às modificações na superfície, os efeitos obtidos no uso de propano e GLP pressurizados como solvente em um sistema enzimático não podem ser aplicados a outros sistemas enzimáticos.

### 2.3.3 Temperatura

A maioria das enzimas possui atividade específica, capaz de catalisar apenas uma determinada reação e de fazê-la só em um tipo de meio ou substrato. Algumas enzimas são mais versáteis. Entretanto, todas as enzimas operam dentro de um limite estreito de temperatura e pH (COX, 1987). Grande parte das enzimas apresenta sua atividade ótima em uma faixa de 30 a 40 °C, sendo que acima de 45 °C pode ocorrer o início da desnaturação (FENNEMA, 1993).

Com o aumento da temperatura pode ocorrer desnaturação da proteína enzimática, que consiste na perda irreversível da conformação nativa, modificando a estrutura terciária e quaternária da proteína globular. Desta forma, a enzima passa de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. As enzimas possuem uma temperatura de resistência máxima à desnaturação. Entretanto, na desnaturação das enzimas pelo calor a relação tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico são de fundamental importância. Os efeitos que se observam nas enzimas apresentam papel relevante, uma pequena modificação da conformação do centro ativo pode conduzir à perda da atividade catalítica (SCRIBAN, 1985; BELITZ; CROSCHE, 1997).

Uma das principais propriedades das enzimas suspensas em sistemas não aquosos é o aumento da estabilidade térmica da enzima relativamente ao meio aquoso. Em altas temperaturas, a água aumenta a mobilidade das moléculas de proteína e isto pode aumentar a taxa de desnaturação (ZAKS; KLIBANOV, 1986). Desta forma, é natural que a enzima exiba maior termoestabilidade em meio não aquoso.

### 2.3.4 Pressão

Ao contrário dos tratamentos térmicos, onde tanto ligações covalentes como não covalentes são afetadas, no processamento à alta pressão em

temperatura ambiente as ligações covalentes são pouco afetadas e, conseqüentemente, a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento (CHEFTEL, 1995). Entretanto, ligações químicas relativamente fracas (pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou mesmo algumas ligações iônicas) podem ser rompidas (HENDRICKX et al., 1998). Pode-se, pelo tratamento a alta pressão, distorcer a estrutura secundária e terciária do polipeptídeo, o que resultaria numa conformação da enzima diferente da nativa, mas que mantivesse ou aumentasse a atividade catalítica, sem que ocorra a desnaturação da proteína. Em geral, pressões acima de 3000 bar à temperatura ambiente causam desnaturação protéica irreversível, enquanto pressões menores resultam em mudanças reversíveis na estrutura da proteína (CHEFTEL, 1995).

Os efeitos da alta pressão sobre enzimas podem ser divididos em duas classes. Na primeira, pressões hidrostáticas relativamente baixas (< 1000 bar) têm mostrado ativação de algumas enzimas (ASAKA et al., 1994; ANESE et al., 1995; CANO et al., 1997; GIEBAUF; GAMSE, 2000; FRICKS et al., 2006). Pressões muito maiores (> 1000 bar), geralmente induzem à inativação enzimática (WEEMAES et al., 1998), porém há também casos de aumento da atividade (GARCIA-PALAZON et al., 2004).

Os fluidos pressurizados têm sido largamente explorados na indústria e na ciência como solventes e meios de reações.

Prado et al. (2012) avaliaram o uso de dióxido de carbono e a enzima Lypozyme TL IM para maximizar a hidrólise enzimática das gorduras do leite obtendo maiores valores para ácido linolênico conjugado (ALG) e ácidos graxos livres (AGL). Para as condições estudadas, os melhores valores para AGL (86,79%) foram obtidos com 25 MPa, razão molar 1:5 (mol/mol) gordura/água a 55 °C e para ALG (6,81 mg/g de gordura) com 30 MPa, razão molar 1:30 (mol/mol) gordura/água e 55 °C.

Manera et al. (2011) estudaram o efeito de diferentes fluidos pressurizados na atividade e estabilidade de  $\beta$ -galactosidases e concluíram que as grandezas de pressão (ou densidade reduzida), taxa de

despressurização e tempo de exposição influenciaram positivamente na atividade enzimática.

Resultados relatados por Kuhn et al. (2010) em relação ao comportamento de lipases não comerciais à alta pressão mostraram que dependendo da extensão das condições utilizadas e forma da enzima é possível se obter excelentes incrementos na atividade enzimática.

Pode-se inferir que dependendo da magnitude da pressão aplicada, a extensão das mudanças na estrutura em proteínas globulares pode ser diferente de uma enzima para outra. Neste sentido, pode também não ocorrer mudanças significativas na estrutura da enzima mesmo a altas pressões.

As propriedades físicas do SCFs, como difusividades do gás e densidade dos líquidos podem ser controladas, alterando a pressão. Há também a possibilidade de alterar a seletividade e a atividade de uma enzima, apenas mudando a pressão. Para executar reações enzimáticas em alta pressão, o comportamento da enzima em fluidos pressurizados é muito importante, pois certas enzimas mostram uma considerável aparente ativação sob pressão, enquanto outras apresentam desativação em uma pressão crescente.

## **2.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Na revisão bibliográfica apresentada no decorrer deste capítulo, procurou-se relatar a aplicação de inulinases e de fluidos pressurizados, as características do biocatalisador e do solvente, e as variáveis que podem afetar o comportamento da atividade das enzimas quando submetidas a altas pressões.

Propano e GLP, solventes com propriedades e capacidade de dissolver compostos hidrofóbicos, são apontados como gases potenciais para o pré-tratamento enzimático, bem como um meio reacional interessante para as reações catalisadas por inulinases.

Muitos fatores podem afetar a atividade das enzimas, assim, de fundamental importância é a sua avaliação prévia no fluido pressurizado a ser empregado.

Inulinases são enzimas catalisadoras no processo de síntese de frutooligossacarídeos, o desenvolvimento de estudos acerca do aperfeiçoamento e/ou inovação de técnicas para produzir FOS é um alvo de pesquisa de grande importância. O encontro de metodologias, viáveis e menos complexas, está relacionado ao uso de um biocatalisador com alta atividade e boa estabilidade.

Neste contexto, observou-se que poucos relatos são encontrados na literatura a respeito da atividade de inulinases submetidas a sistemas pressurizados em meio enzima-solvente, e que é de primordial importância o conhecimento prévio das condições adequadas a serem aplicadas nos processos de biotransformação. Deste modo, pode-se verificar a relevância no desenvolvimento de estudos na busca de processos e meios apropriados, visando maior conhecimento das condições ótimas de produção e de métodos de obtenção mais viáveis.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo será apresentada uma descrição dos materiais e métodos utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como os procedimentos laboratoriais necessários à consecução da fase experimental desenvolvida.

#### **3.1 MATERIAIS**

##### **3.1.1 Reagentes**

O solvente utilizado foi propano de procedência White Martins S.A. (com 99,5 % pureza, fase líquida), cujas propriedades críticas, segundo Reid et al. (1987), são: pressão crítica = 42,49 bar, temperatura crítica = 96,6 °C e densidade crítica = 0,22 g/cm<sup>3</sup>. Também foi utilizado Gás Liquefeito de Petróleo (GLP), em sua composição são encontrados vários componentes, entre eles estão as mercaptanas com cerca de 140 µg/L de enxofre, sendo seus compostos majoritários o propano (50,3%), n-butano (28,4%), iso-butano (13,70%), etano (4,8%), e demais compostos minoritários (n-pentano, 0,086%, metano, 0,077%, iso-pentano, 0,356%) (PETROBRAS-CENPES, 2010).

Como suportes para a imobilização da inulinase foram utilizados montmorillonita natural poço A, fornecida por Colorminas Colorifício e Mineração S/A, e polioli e isocianato para a formulação de poliuretano fornecidos por Mannes Ltda.

Para determinação da atividade enzimática foi utilizada solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 com 2% (m/v) de sacarose, DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e tartarato de sódio e potássio (15,1 g/L). Para a produção de FOS foi usado como substrato a inulina, a sacarose, o solvente acetato de etila, solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8; 5,4 e 6,0.

### 3.1.2 Enzimas

O micro-organismo utilizado para a obtenção da enzima não-comercial 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., 2010). O extrato contendo inulinase extracelular de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi obtido pelo cultivo dessas espécies utilizando torta do bagaço de cana como substrato. A composição do meio foi otimizada em um trabalho anterior de Mazutti et al. (2010) contendo: 2 kg de bagaço de cana suplementado com 15 % (m/m) de melaço de cana pré-tratado, 30 % (m/m) de água de maceração de milho (AMM), e 20 % (m/m) de farelo de soja. O teor de umidade foi ajustado para 65 % e após autoclavado a 121 °C por 20 minutos. A fermentação foi iniciada com a inoculação de um volume otimizado correspondente a uma massa de células de 14 g. Todos os experimentos foram realizados por 24 horas. Após a fermentação, a enzima foi extraída do bagaço de cana, adicionando tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 4,8 em uma relação sólido/líquido 1:10, após incubação a 50 °C e 150 rpm por 30 minutos.

A inulinase comercial, forma livre, foi obtida a partir do micro-organismo *Aspergillus niger* (Fructozyme, mistura de exo-inulinase (EC 3.2.1.80) e endo-inulinase (EC 3.2.1.7)) adquirida da Sigma-Aldrich.

## 3.2 EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA

### 3.2.1 Processos de imobilização

As enzimas utilizadas foram imobilizadas em dois diferentes processos, a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi imobilizada em suporte montmorillonita natural poço A (Processo de imobilização A) e a inulinase de *Aspergillus niger* foi imobilizada em espuma de poliuretano (Processo de imobilização B), conforme a Figura 2.

**Figura 2:** Representação esquemática de imobilização de inulinasas.

➤ Inulinase não comercial;

*Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 (A)

➤ Inulinase comercial;

*Aspergillus niger* (A e B)

Imobilização A:

- solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,8;
- suporte - argila montmorillonita Poço A.

Imobilização B:

- Espuma de poliuretano (PU).

- Imobilização A: suporte argila montmorillonita natural poço A.

O processo de imobilização foi realizado conforme a melhor condição encontrada no trabalho de Coghetto (2011): 2 g do suporte - argila montmorillonita Poço A, com adição de 60 mL de uma solução contendo o extrato enzimático e tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, em uma diluição extrato enzimático/tampão 3:10. Esta solução foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 4 °C (banho de gelo), por um tempo reacional de 10 minutos. Após o término do processo de adsorção, a solução foi filtrada a vácuo, permanecendo posteriormente 48 horas em dessecador.

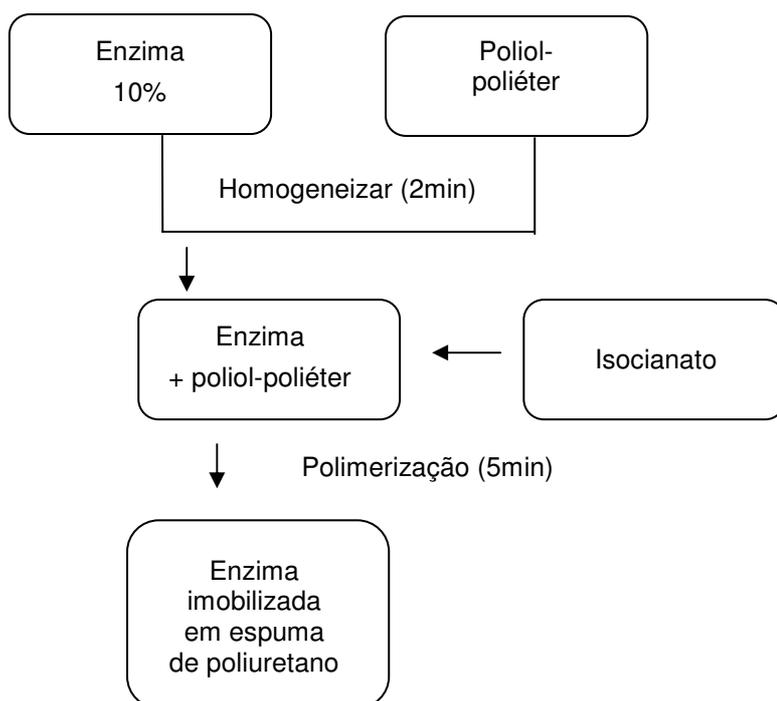
- Imobilização B: suporte espuma de poliuretano.

A síntese de poliuretano foi realizada segundo Silva et al. (2013a). A relação de polioliol:isocianato foi de 1:1 (v/v). A reação de polimerização foi realizada em copo plástico de 300 mL. Os monômeros (5 mL) foram transferidos para o copo com a ajuda de uma seringa graduada de plástico descartável. Após a adição dos monômeros, o sistema foi homogeneizado com um bastão de vidro, durante cerca de 2 minutos, deixando a reação ocorrer.

Mais tarde, na fase de polimerização (5 minutos), o poliuretano foi deixado em repouso durante 24 h para a solidificação completa da espuma.

O passo de imobilização foi realizado com um volume de extrato glicólico contendo 10% (1 mL) de enzima correspondente ao volume adicionado dos monômeros. Para a imobilização, o extrato glicólico enzimático foi adicionado ao monômero de poliálcool-poliéter, e, mais tarde, para o passo de homogeneização adicionou-se o isocianato, de modo a iniciar a reação de polimerização do poliuretano. A Figura 3 apresenta uma representação esquemática de imobilização de inulinases seguindo o procedimento acima descrito.

**Figura 3:** Representação esquemática de imobilização de inulinases com espuma de poliuretano.



Depois do passo de polimerização, o poliuretano contendo a enzima foi removido do frasco, fracionado em pedaços pequenos, devidamente identificado e armazenado em geladeira.

### 3.2.2 Determinação da atividade enzimática das inulinases

A atividade enzimática das enzimas imobilizadas foi determinada adicionando-se 0,5 g de enzima imobilizada em 4,5 mL de uma solução tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 4,8 com 2 % (m/v) de sacarose. Após diluída, a solução foi mantida a 50 °C, por 10 min. A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), onde 0,5 mL da amostra anterior foram diluídos em 0,5 mL de DNS e mantidos por 5 min em água em ponto de ebulição. Cessado o tempo reacional, foram adicionados na amostra 8 mL de tartarato de sódio e potássio em banho de gelo. Para cada amostra foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. As amostras foram lidas em triplicata, em espectrofotômetro (marca Agilent 8453) a 540 nm.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ mol de sacarose por minuto nas condições mencionadas (sacarose como substrato). Os resultados foram expressos em termos de atividade de enzima por grama de sólidos secos (U/g).

As atividades das enzimas foram determinadas no início e ao final do tratamento em fluidos pressurizados, objetivando o acompanhamento da alteração da sua atividade quando submetida ao propano e GLP pressurizados.

A atividade residual foi calculada através da equação abaixo:

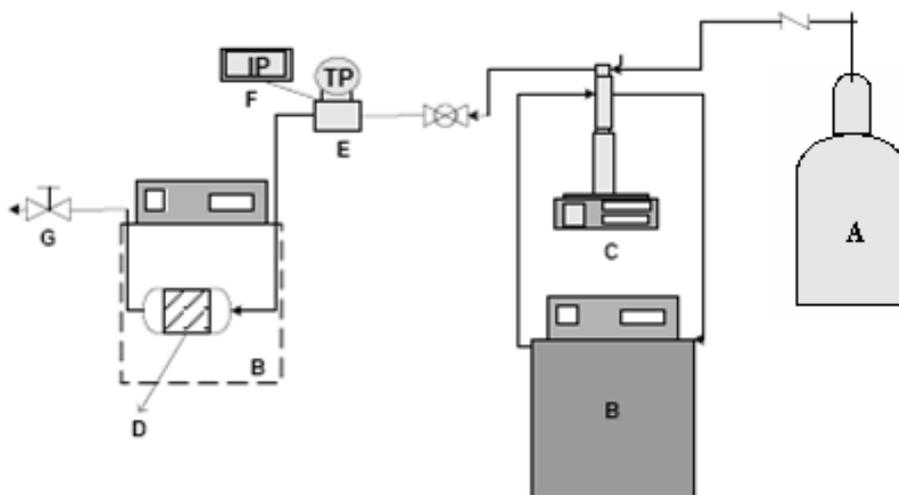
$$\text{Atividade Residual (\%)} = \frac{\text{Atividade (U/g) após a pressurização}}{\text{Atividade (U/g) antes da pressurização}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.2.3 Tratamento das enzimas em propano e GLP pressurizados

Os experimentos envolvendo as inulinases imobilizadas foram realizados em uma unidade de escala laboratorial semelhante à empregada por Kuhn et al. (2010), que consiste basicamente de um reservatório de solvente,

dois banhos termostáticos, uma bomba de seringa (ISCO 260D), uma cuba de aço inoxidável com um volume interno de 3 mL, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um programador portátil (Smar, HT201) com uma precisão de  $\pm 0,4$  bar. O diagrama esquemático do equipamento é apresentado na Figura 4. O equipamento foi construído para conduzir os experimentos até 350 bar e 80 °C (FRICKS et al., 2006; FRANKEN et al., 2010). Todas as linhas de montagem experimental empregaram tubulações “OD 1/16” de aço inoxidável (HIP) e entre a bomba e o reservatório de solvente uma “check valve” (HIP 15-41AF1-T 316SS) foi colocada para evitar o refluxo do solvente pressurizado.

**Figura 4** - Diagrama esquemático do aparato utilizado no tratamento das enzimas nos fluidos pressurizados. A– reservatório de solvente; B– banho termostaticado; C– bomba de seringa; D– reator/célula de aço; E– indicador de pressão; F– transdutor de pressão; G– válvula micrométrica.

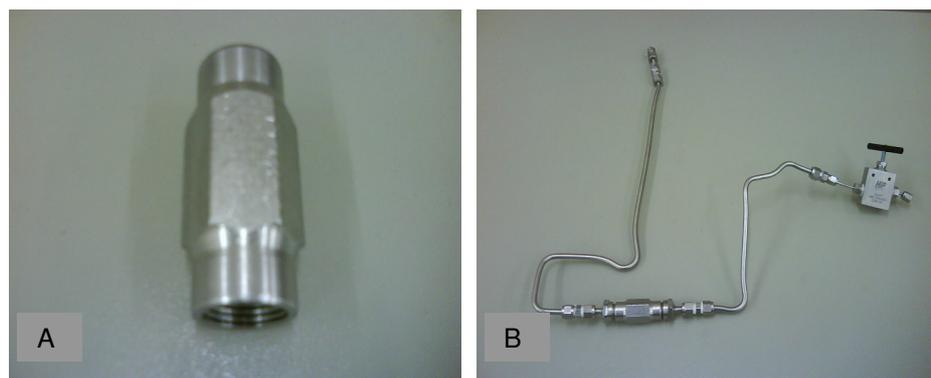


Duas outras válvulas micrométricas (HIP 15-11AF2 316SS) completaram o aparato experimental, uma localizada após a bomba de seringa, na entrada da célula de alta pressão, para permitir o carregamento de solvente e a outra logo após a célula para realizar a descarga do solvente. A célula de alta pressão encontrava-se submersa em banho de água e apoiada por um dispositivo simples, enquanto que as válvulas micrométricas ficavam localizadas fora do banho.

O procedimento experimental adotado para o tratamento das enzimas nos fluidos pressurizados consistia, em primeiro lugar, no ajuste do banho termostático a 40 °C, temperatura estabelecida no presente trabalho para todas as corridas experimentais. Então, a enzima (0,6 g), na forma imobilizada, foi alimentada ao interior da célula. Após este procedimento, o sistema foi submetido à pressurização sob diferentes tempos de exposição, de acordo com condições pré-estabelecidas na sequência de um projeto experimental, mantendo uma taxa de pressurização constante (10 bar/min). O sistema foi, finalmente, despressurizado em diferentes taxas pré-estabelecidas, de acordo com o projeto experimental, programado por um deslocamento do pistão da seringa da bomba e da válvula micrométrica utilizada em pressões mais baixas, perto da pressão de saturação do solvente. A atividade enzimática foi determinada antes (atividade inicial) e depois (atividade final) do procedimento de tratamento com fluidos sob pressão, conforme descrito anteriormente.

Uma vista geral da unidade e da célula utilizada nos experimentos pode ser verificada nas Figuras 5 e 6.

**Figura 5** – Detalhes da célula de aço inoxidável com volume interno de 3 mL (A); Célula de aço acoplada a válvula micrométrica (B).



**Figura 6** – Vista do sistema mergulhado no banho termostatizado (A); Unidade experimental utilizada no tratamento das enzimas (B).



### 3.2.4 Condições experimentais

Com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis do processo sobre a atividade enzimática da inulinase imobilizada após o tratamento com fluido pressurizado, um planejamento fatorial com 2 níveis e 3 variáveis foi adotado, conforme a Tabela 2.

**Tabela 2** – Condições experimentais avaliadas no planejamento experimental realizado para as inulinases comercial e não comercial imobilizadas.

Experimento	P (bar)	t (h)	R (bar/min)
1	30(-1)	1(-1)	20(-1)
2	30(-1)	1(-1)	100(+1)
3	30(-1)	6(+1)	20(-1)
4	30(-1)	6(+1)	100(+1)
5	270(+1)	1(-1)	20(-1)
6	270(+1)	1(-1)	100(+1)
7	270(+1)	6(+1)	20(-1)
8	270(+1)	6(+1)	100(+1)
9	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)
10	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)
11	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)

O planejamento experimental foi concebido para observar, ao mesmo tempo, as variáveis comumente usadas para reações catalisadas por enzimas em fluidos pressurizados, a faixa ótima de atividade da enzima e os limites de operação do equipamento (OLIVEIRA et al., 2006ab.; FRICKS et al., 2006). As variáveis avaliadas para inulinase imobilizada foram: pressão (30-270 bar), taxa de despressurização (20-100 bar/min) e tempo de exposição (1-6 h). A execução do planejamento experimental foi realizada de forma aleatória, incluindo uma condição de ponto central realizada em triplicata, para avaliação do erro experimental. A análise foi realizada utilizando o software Statistica ® 8 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, EUA).

### **3.2.5 Estabilidade da atividade enzimática da inulinase em baixas temperaturas após o tratamento a alta pressão**

A avaliação da estabilidade das inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e *Aspergillus niger*, imobilizadas em montmorillonita, após tratamento nos fluidos pressurizados foi realizada mantendo-se as enzimas em freezer (-10 °C) e em geladeira (4 °C). As amostras de enzimas imobilizadas foram retiradas em determinados intervalos de tempo, e foi medida a atividade enzimática.

Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, para ambos os fluidos, propano e GLP, a atividade monitorada foi realizada utilizando as enzimas do experimento 1, já para a inulinase de *Aspergillus niger* a atividade monitorada foi realizada utilizando as enzimas do experimento 3. Os resultados foram comparados com as enzimas sem tratamento em fluidos pressurizados.

### **3.2.6 Caracterização estrutural do catalisador**

Amostras do catalisador obtido da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foram analisadas em relação à sua estrutura através da

adsorção de nitrogênio a 77 K (Autosorb-1 equipamento, Quatachome, 2200e série).

A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi analisada antes e depois do tratamento em GLP pressurizado, sendo que o tratamento foi realizado nas condições referentes ao ponto central.

Antes da análise, as amostras foram tratadas sob vácuo a 373 K para a secagem completa e, em seguida, submetidos a N<sub>2</sub> líquido. A área específica média superficial foi determinada pelo método BET, enquanto o diâmetro médio de poros e volume de poros foi obtido utilizando a técnica de BJH (Barret, Joyner, Halenda).

### 3.2.7 Síntese de frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos foram produzidos seguindo a metodologia descrita por Risso et al. (2004), com algumas modificações. A síntese enzimática foi realizada em sistema aquoso e orgânico, utilizando as inulinases imobilizadas e tratadas em fluidos pressurizados, como catalisadores. Foi utilizada, para o tratamento das inulinases imobilizadas em montmorillonita, a condição de número 1 do planejamento experimental, tanto para propano e GLP, uma vez que resultados semelhantes foram obtidos em termos de atividade residual em todas as condições testadas, e esta condição refere-se ao uso de pressão e taxa de despressurização mais baixas e menor tempo de exposição. Já para a inulinase imobilizada em PU, a condição de tratamento utilizada foi a de ponto central.

O procedimento experimental consistiu na adição, em Erlenmeyers, do substrato (sacarose ou inulina) a 55% e enzima a 5%. No sistema aquoso, o meio de reação foi composto por tampão acetato de sódio, pH 4,8. No sistema orgânico, os solventes utilizados foram tampão acetato de sódio e acetato de butila (75:25). Os experimentos foram realizados em shaker a uma velocidade constante (100 rpm), na temperatura de 50 °C durante 24 horas. Os rendimentos em FOS foram determinados utilizando as inulinases tratadas em

fluidos pressurizados e também as não tratadas, a fim de permitir uma comparação direta dos resultados obtidos.

### 3.2.8 Estudo cinético para a otimização da síntese de frutooligossacarídeos

Visando melhorar o rendimento em frutooligossacarídeos foi realizado um estudo cinético da reação de produção de FOS utilizando a inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita, pré-tratada em GLP pressurizado em sistema aquoso, nos tempos de 0 a 24 h. Nesta etapa variou-se algumas das condições experimentais conforme demonstrado na Tabela 3, e alíquotas para a quantificação em FOS foram retiradas a cada 2 h. A temperatura foi mantida constante em 50 °C.

**Tabela 3** - Condições experimentais empregadas na produção de FOS, utilizando inulinases de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita e pré-tratada em GLP pressurizado como catalisador em meio aquoso.

Experimento	Sacarose (%)	pH do tampão acetato de sódio	Enzima (%)
A	50	4,8	5
B	60	4,8	5
C	70	4,8	5
D	60	5,4	5
E	60	6,0	5
F	60	4,8	1
G	60	4,8	10

### 3.2.9 Metodologia analítica para a quantificação de FOS

A quantificação de FOS foi realizada conforme metodologia desenvolvida por Richetti (2013), em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (série 1100 Agilent), utilizando coluna Luna NH<sub>2</sub> (250 x 4.6 mm, 5 μ - Phenomenex - USA), volume de injeção de 5 μL, fluxo de 1 mL/min, fase

móvel de água/acetonitrila (70:30), e detector de índice de refração. As temperaturas da coluna e do detector foram de 20 e 25 °C, respectivamente. As curvas de calibração foram construídas utilizando os padrões químicos e os resultados foram calculados em termos de conversão de produto, utilizando metodologia anteriormente desenvolvida em nosso grupo de pesquisa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo visa apresentar os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, relacionados à avaliação da atividade e estabilidade enzimática de inulinasas imobilizadas após processamento em propano e GLP pressurizados, bem como da síntese de frutooligossacarídeos utilizando estas enzimas como catalisadores.

### 4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM PROPANO E GLP PRESSURIZADOS SOBRE A ATIVIDADE DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 IMOBILIZADA EM MONTMORILLONITA

Resultados obtidos para a atividade residual da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizada em montmorillonita após tratamento em fluidos pressurizados são apresentados na Tabela 4. Em um primeiro momento, pode-se notar que um expressivo aumento na atividade da enzima foi alcançado após o tratamento, em todas as condições experimentais testadas. No entanto, o maior aumento (atividade residual de 218,7%) foi observado na condição experimental 3, utilizando uma pressão de 30 bar durante 6 h a uma taxa de despressurização de 20 bar/min, quando a enzima foi submetida ao tratamento com GLP.

**Tabela 4** – Atividade residual (%) da inulinase não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 imobilizada em montmorilonita após tratamento em fluidos pressurizados.

Exp	P (bar)	t (horas)	R (bar/min)	Atividade Residual (%)*	
				Propano (%)*	GLP (%)*
1	-1 (30)	-1 (1)	-1 (20)	176,4	183,9
2	-1 (30)	-1 (1)	1 (100)	181,3	172,5
3	-1 (30)	1 (6)	-1 (20)	154,1	218,7
4	-1 (30)	1 (6)	1 (100)	172,1	189,1
5	1 (270)	-1 (1)	-1 (20)	175,8	200,5
6	1 (270)	-1 (1)	1 (100)	133,3	151,7
7	1 (270)	1 (6)	-1 (20)	200,8	101,6
8	1 (270)	1 (6)	1 (100)	143,8	202,1
9	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	145,3	210,2
10	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	146,1	213,5
11	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	142,4	204,6

P=pressão, t=tempo de exposição e R=taxa de despressurização.

\* Atividade Residual definida conforme Equação 1, pág. 58.

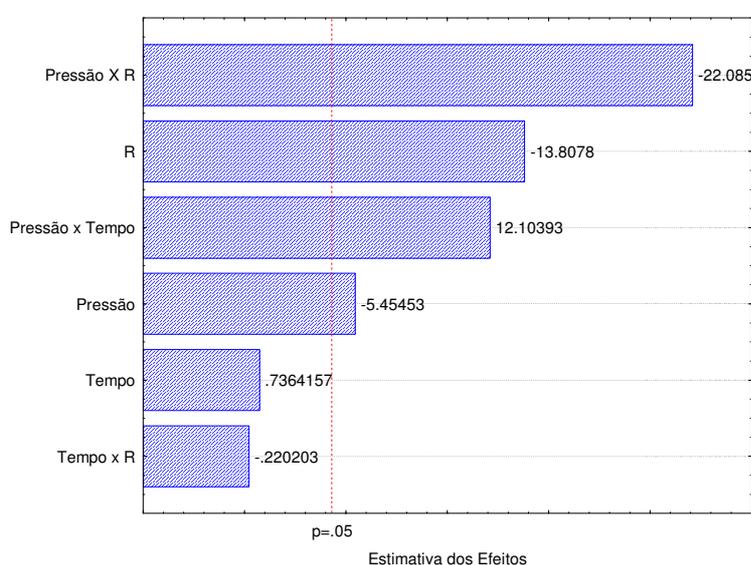
Atividade inicial de 140 U/g.

#### 4.1.1 Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 tratada em propano pressurizado

A atividade inicial desta enzima foi de 140 U/g. O ganho de atividade da enzima para o sistema tratado com propano foi na faixa de 133,3 a 200,8%. O maior ganho de atividade ocorreu no experimento 7, relacionado às condições de limite superior de pressão e tempo de exposição e menor taxa de despressurização.

Para avaliar os principais efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade da enzima, os dados apresentados na Tabela 4 foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). A Figura 7 apresenta os efeitos dessas variáveis sobre a atividade final da enzima submetida a propano pressurizado.

**Figura 7** - Diagrama de Pareto para a inulinase não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 imobilizada em montmorillonita no sistema propano pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática obtida.



Com relação à atividade da inulinase submetida a propano pressurizado, como mostra a Figura 7, é possível observar que a variável com maior efeito significativo ( $p < 0,05$ ) foi a interação entre a pressão e a taxa de despressurização, com efeito negativo, também com efeito significativo negativo, a pressão e a taxa de descompressão, indicando que menores níveis destas, levam a um aumento na atividade enzimática da inulinase. A interação entre pressão e tempo teve efeito significativo positivo, e as demais variáveis não foram significativas no intervalo estudado.

Pode-se verificar que em experimentos onde foram usadas taxas de despressurização lentas, um aumento na atividade enzimática residual também

ocorreu, sendo este comportamento confirmado pela análise estatística dos dados experimentais.

Trabalhos apresentados na literatura mostram que os solventes com baixa constante dielétrica, como o gás propano, poderiam manter ou mesmo aumentar a atividade enzimática e estabilidade (KNEZ; HABULIN, 2002; OLIVEIRA et al., 2006a; OLIVEIRA et al., 2006b; FRICKS et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). Uma vez que as propriedades dos solventes afetam a interação com enzimas específicas, diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo da enzima estudada (KASCHE; SCHLOTHAUER; BRUNNER, 1988; FRICKS et al., 2006). Para o caso em estudo, pode-se observar que o uso de propano pressurizado como solvente, para todas as condições experimentais investigadas, levou a um aumento na atividade da enzima. Como o propano apresenta solubilidade relativamente baixa em água, pode-se especular que ele poderia estar atuando como um fluido de pistão, aumentando a pressão sobre a enzima (ANDRADE et al., 2008).

Quanto ao efeito da pressão hidrostática na estabilidade da enzima, a literatura apontou que os valores de pressão em torno dos utilizados neste trabalho causam um pequeno efeito sobre a atividade da enzima (CASTILHO et al., 2000).

De acordo com Knez (2004), a despressurização é um dos fatores que mais afeta a atividade enzimática. O fluido pressurizado entra em contato com a estrutura terciária da enzima de forma lenta. Quando o sistema é despressurizado rapidamente há uma rápida expansão do fluido, causando uma maior pressão na enzima do que no sistema, o que pode provocar uma mudança conformacional devido à sobrepressão, causando um desdobraimento na estrutura da enzima, aumentando ou diminuindo sua atividade e seletividade.

Desnaturação da proteína induzida pela pressão tem sido importante tópico de pesquisa nos últimos anos e, a partir de alguns exemplos já existentes, a desnaturação parece ser um processo reversível, diferente da desnaturação causada pela temperatura (JACKSON; ELLER, 2006).

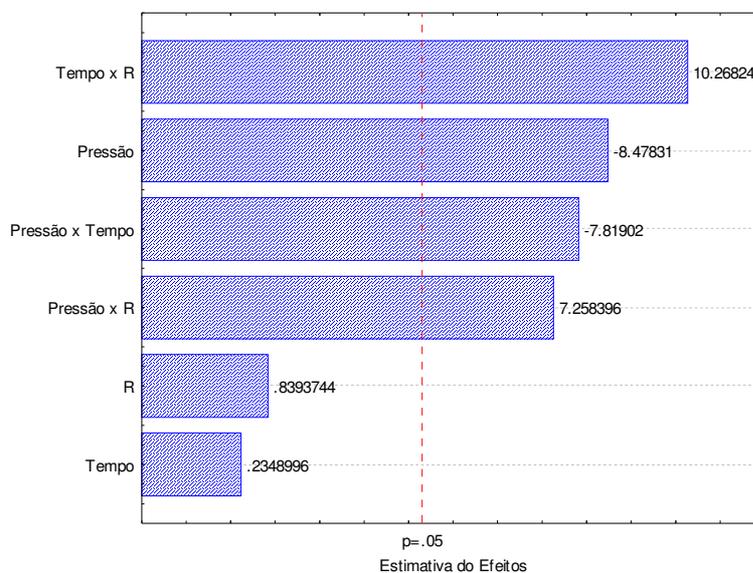
#### 4.1.2 Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 tratada em GLP pressurizado

Resultados obtidos para a atividade enzimática de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em sistema com GLP são apresentados na Tabela 4. A comparação direta destes resultados com aqueles obtidos após o tratamento com propano permite concluir que as atividades residuais no sistema com GLP foram ligeiramente superiores às obtidas no sistema com propano pressurizado.

Os valores de atividade residual encontrados para o tratamento da enzima em GLP são promissores, tendo em vista que o gás em questão não é puro, a sua maior fração é propano (50%), seguida de butano (28%). Tal fato também justifica os valores próximos encontrados de atividade enzimática residual quando a enzima foi tratada com o gás propano e com o GLP.

A atividade inicial desta enzima, conforme mencionado anteriormente, é de 140 U/g. Para este solvente, o ganho de atividade enzimática foi na faixa de 101,6 a 218,7%. Depois de avaliar a atividade residual para cada condição experimental, os dados foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Analisando a Figura 8 pode-se observar que para a enzima tratada com GLP, as variáveis estudadas mais importantes foram, a interação entre o tempo e a taxa de despressurização, com efeito significativo positivo, e a pressão, com efeito significativo negativo, na sequência a interação entre as variáveis pressão e tempo, com efeito significativo negativo, e pressão e taxa de descompressão, com efeito significativo positivo.

**Figura 8-** Diagrama de Pareto para a inulinase não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 immobilizada em montmorillonita no sistema GLP pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática obtida.



O tratamento permite observar que com o uso do GLP, a pressão foi um dos fatores que mais afetou a atividade enzimática residual. Segundo alguns autores, a pressão pode modificar o comportamento catalítico de enzimas, alterando a seletividade e modulação da enzima (JACKSON; ELLER, 2006).

O resultado apresentado confirma que a taxa de despressurização e suas interações também promovem alterações na estrutura enzimática celular e, conseqüentemente, perda ou aumento de sua atividade.

De acordo com Garcia-González et al. (2007), a taxa de despressurização não levaria a uma ruptura celular, porém, devido a exposição da enzima ao fluido pressurizado a ruptura celular é favorecida pela alteração da sua conformação.

#### 4.2 EFEITO DO PROPANO E GLP PRESSURIZADOS SOBRE A ATIVIDADE DE INULINASES DE *Aspergillus niger* IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA

A inulinase comercial de *Aspergillus niger* previamente imobilizada em montmorillonita foi submetida ao tratamento em fluidos pressurizados (propano e GLP). A atividade enzimática foi determinada logo após a imobilização e após o tratamento a alta pressão.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática residual de inulinases de *Aspergillus niger* imobilizadas.

**Tabela 5** – Atividade residual (%) da inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita após tratamento em fluidos pressurizados

Exp	P (bar)	t (horas)	R (bar/min)	Atividade residual (%)*	
				<i>Propano</i> (%)*	<i>GLP</i> (%)*
1	-1 (30)	-1 (1)	-1 (20)	96,8	143,9
2	-1 (30)	-1 (1)	1 (100)	146,2	100,1
3	-1 (30)	1 (6)	-1 (20)	142,1	145,0
4	-1 (30)	1 (6)	1 (100)	145,1	102,9
5	1 (270)	-1 (1)	-1 (20)	105,8	98,2
6	1 (270)	-1 (1)	1 (100)	148,5	113,5
7	1 (270)	1 (6)	-1 (20)	111,1	121,9
8	1 (270)	1 (6)	1 (100)	115,2	92,4
9	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	99,4	104,9
10	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	104,9	108,8
11	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	98,8	110,9

P=pressão, t=tempo de exposição e R=taxa de despressurização.

\* Atividade Residual definida conforme Equação 1, pág. 58.

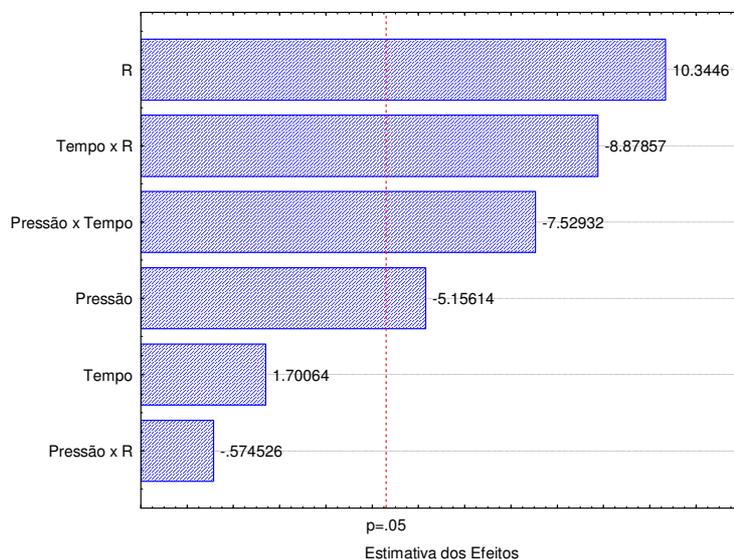
Atividade inicial de 238 U/g.

De acordo com estes resultados a enzima submetida aos fluidos pressurizados apresentou ganho de atividade na maioria das condições experimentais, resultado interessante, considerando as possíveis aplicações da enzima para a síntese de produtos alimentícios, como é o caso dos frutooligossacarídeos e da frutose, pela hidrólise da inulina.

#### **4.2.1 Inulinase de *Aspergillus niger* tratada em propano pressurizado**

A atividade inicial desta enzima foi de 238 U/g. Para este solvente, a atividade enzimática residual variou na faixa de 96,8 a 148,5%, portanto, obteve uma atividade residual um pouco menor que as obtidas para as inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. De acordo com a Tabela 5, o melhor valor de atividade enzimática residual encontrado para a enzima de *Aspergillus niger* foi de 148,5%, quando foi submetida a 270 bar, 1 h, com uma taxa de despressurização rápida de 100 bar/min. Este resultado é corroborado no tratamento dos dados (Figura 9), onde é verificado que a taxa de despressurização possui um efeito positivo, a um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), ou seja, quanto maior a taxa de despressurização maior será a atividade residual obtida.

**Figura 9-** Diagrama de Pareto para a inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita no sistema propano pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática obtida.



Também com efeito significativo, no entanto, negativo, aparecem as variáveis pressão e a interação entre a pressão e o tempo, bem como a interação tempo e taxa de despressurização.

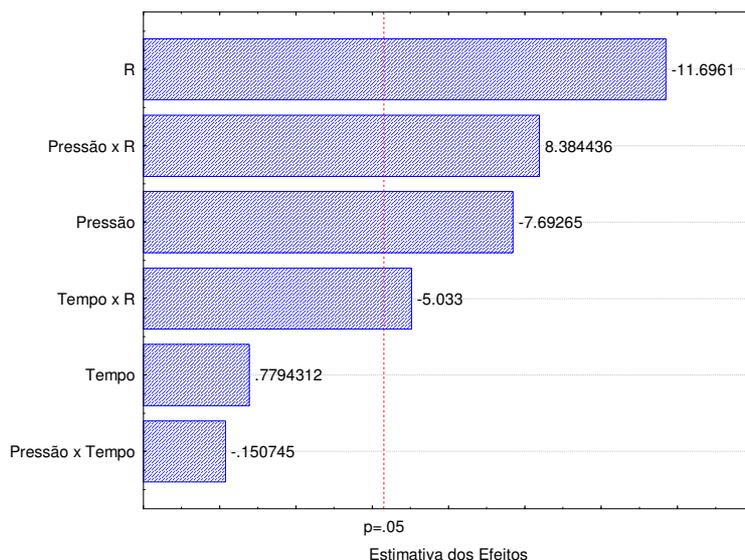
#### 4.2.2 Inulinase de *Aspergillus niger* tratada em GLP pressurizado

Resultados obtidos para a atividade enzimática de inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita em sistema com GLP são apresentados na Tabela 5. Observando os mesmos, é possível verificar que assim como ocorreu para a inulinase não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a condição que conduziu a maior atividade residual para a inulinase comercial de *Aspergillus niger*, após o tratamento com GLP pressurizado, foi a de número 3 (145%), sendo assim, utilizando os mesmos níveis de pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização.

Para avaliar os principais efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade da enzima, os dados da Tabela 5 foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). A Figura 10

apresenta os efeitos dessas variáveis sobre a atividade final da enzima submetida a GLP pressurizado.

**Figura 10-** Diagrama de Pareto para a inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita no sistema GLP pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática obtida.



Com relação à atividade da inulinase submetida a GLP pressurizado, como mostra a Figura 10, é possível observar que a variável com maior efeito significativo ( $p < 0,05$ ) foi a taxa de despressurização, com efeito negativo, podendo-se concluir novamente, como afirma Knez (2004), que a despressurização é um dos fatores que mais afeta a atividade enzimática das enzimas, uma vez que houve um incremento na atividade residual quando a despressurização foi conduzida em taxas mais lentas.

Do mesmo modo, foi significativo o efeito da pressão, sendo que quanto maior a pressão, menor foi a atividade residual obtida. Com efeitos significativos positivos, aparecem as interações das variáveis pressão e taxa de despressurização, bem como taxa de despressurização e tempo.

### 4.3 EFEITO DO GLP PRESSURIZADO SOBRE A ATIVIDADE DE INULINASES DE *Aspergillus niger* IMOBILIZADAS EM PU

Resultados obtidos para a atividade residual da inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em PU após tratamento em GLP pressurizado são apresentados na Tabela 6. Em um primeiro momento, pode-se notar que um expressivo aumento na atividade da enzima foi alcançado após o tratamento, em todas as condições experimentais testadas. No entanto, o maior aumento (atividade residual de 433,4%) foi observado na condição experimental referente ao ponto central, utilizando uma pressão de 150 bar durante 3,5 h a uma taxa de despressurização de 60 bar/min.

**Tabela 6** – Atividade residual (%) da inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em poliuretano após tratamento em GLP pressurizado.

Exp	P (bar)	t (horas)	R (bar/min)	Atividade residual (%) <sup>*</sup>
				GLP (%) <sup>*</sup>
1	-1 (30)	-1 (1)	-1 (20)	199,3
2	- 1 (30)	-1 (1)	1 (100)	142,9
3	-1 (30)	1 (6)	-1 (20)	131,2
4	-1 (30)	1 (6)	1 (100)	147,7
5	1 (270)	-1 (1)	-1 (20)	232,4
6	1 (270)	-1 (1)	1 (100)	265,8
7	1 (270)	1 (6)	-1 (20)	202,5
8	1 (270)	1 (6)	1 (100)	168,6
9	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	278,1
10	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	433,4
11	0 (150)	0 (3,5)	0 (60)	423,3

P=pressão, t=tempo de exposição e R=taxa de despressurização.

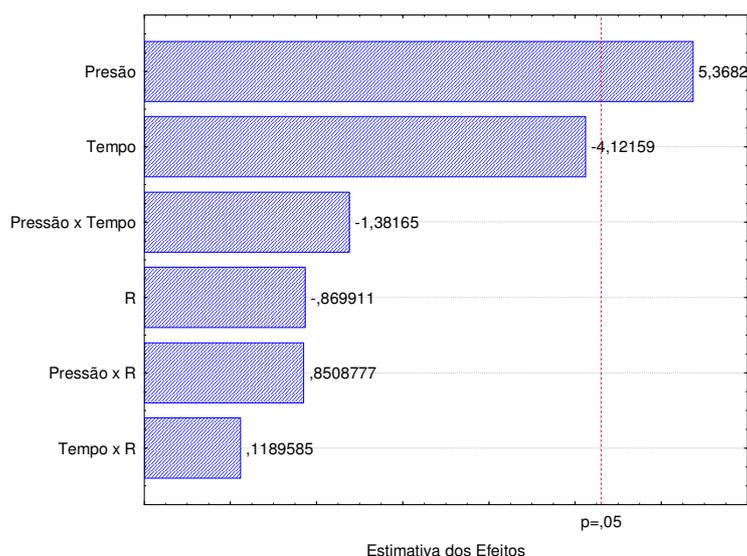
<sup>\*</sup> Atividade Residual definida conforme Equação 1, pág. 58.

Atividade inicial de 52 U/g.

A atividade inicial desta enzima foi de 52 U/g. Para este solvente, a atividade enzimática residual variou na faixa de 131,2 a 433,4%, portanto, obteve uma atividade residual maior que as obtidas para as inulinases imobilizadas em montmorillonita.

Para avaliar os principais efeitos das variáveis manipuladas sobre a atividade da enzima, os dados da Tabela 6 foram tratados estatisticamente, considerando um nível de significância de 95 % ( $p < 0,05$ ). Os efeitos destas variáveis são apresentados na Figura 11.

**Figura 11-** Diagrama de Pareto para a inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em PU no sistema GLP pressurizado, em função das variáveis independentes estudadas e da atividade enzimática obtida.



Observou-se, neste sistema, que apenas a variável pressão apresentou efeito significativo na atividade enzimática da inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em PU, sendo este um efeito significativo positivo.

As respostas de atividade enzimática encontradas nos experimentos de ponto central foram bastante satisfatórias, assim, cabe ressaltar que muitas condições experimentais referentes às inulinases de *Aspergillus niger*, imobilizadas em ambos os suportes, como também das inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 foram realizadas em duplicata, para a garantia da confiabilidade dos resultados.

A comparação dos resultados para *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita e em espuma de poliuretano permite concluir que comportamentos diferentes podem ser obtidos em função do suporte utilizado. Especificamente para esta inulinase, pode-se observar que a imobilização em PU apresenta um comportamento particular, apresentando maior atividade residual em muitas das condições experimentais. Uma hipótese possível para este fato pode estar associada ao enrijecimento da enzima causado pelo processo de imobilização em montmorillonita, tornando difíceis as alterações conformacionais da estrutura terciária da proteína.

Segundo Yu et al. (1993), a natureza do suporte usado para imobilizar uma enzima tem um importante papel na determinação da partição da água entre enzima, solvente e suporte e, conseqüentemente, na atividade da enzima.

Com relação ao processo experimental, as variáveis estudadas, em sua maioria, mostraram-se significativas no tratamento das enzimas a alta pressão. No entanto, não foi realizado para estas enzimas nenhum outro estudo envolvendo uma mudança nos níveis das variáveis, uma vez que, as características dos solventes utilizados (propano e GLP) não sofrem alterações com o aumento de pressão na temperatura estabelecida, a qual foi mantida constante devido seu acréscimo poder causar a desnaturação das inulinases.

Observando os valores de atividade residual obtidos nos tratamentos com os solventes pressurizados, verifica-se que os gases com constantes dielétricas inferiores favorecem a ativação interfacial das enzimas e, conseqüentemente, um aumento na atividade das mesmas (OLIVEIRA et al. 2006ab).

Em condições adequadas de pressão e temperatura, os gases têm densidade semelhante aos líquidos e, por conseguinte, boas propriedades de solubilidade, entretanto, a seletividade destes gases pode ser afetada significativamente pela alteração da pressão ou temperatura, o que não ocorre no caso de solventes líquidos. Por outro lado, o fato de apresentarem baixa viscosidade e altos valores de difusividade, que são propriedades de um gás, favorece o aumento do poder de penetração na matriz sólida. Estas

propriedades podem ser responsáveis pelas taxas de transferência de massa observadas quando gases pressurizados são usados como solvente (SAVAGE et al., 1995).

É importante mencionar que vários estudos disponíveis na literatura relacionados ao tema atual referem-se à utilização de CO<sub>2</sub> como solvente e na maioria dos casos, o uso deste solvente levou à perdas na atividade enzimática, principalmente devido às características hidrofílicas do CO<sub>2</sub>. Segundo muitos autores, CO<sub>2</sub> supercrítico poderia ser responsável pela retirada da água, composto essencial para a manutenção da atividade enzimática (OLIVEIRA et al., 2006 ab; FRICKS et al., 2006; PRIMO et al., 2007).

Observando resultados da literatura nota-se que as proteínas parecem ser mais estáveis em propano do que em CO<sub>2</sub>. Este fato pode ser explicado em termos da maior solubilidade do CO<sub>2</sub> em solução aquosa em comparação com propano. Uma série de proposições tem sido apresentada sobre o efeito do tratamento com CO<sub>2</sub> na atividade enzimática. No entanto, devido à recente aplicação de propano e, principalmente, GLP pressurizado como solvente, poucas informações sobre o efeito destes na atividade das enzimas estão disponíveis.

Os valores de atividade residual usando o tratamento com GLP podem ser considerados muito promissores, já que este solvente é constituído por uma mistura e é comercialmente usado como gás de cozinha e, portanto, tem um custo muito menor comparado ao propano, n-butano ou até mesmo ao dióxido de carbono.

Comparando os resultados obtidos, do comportamento da atividade enzimática frente aos fluidos pressurizados, com os de Oliveira et al. (2006b), que avaliaram a atividade das lipases Novozym 435, Lipozyme IM e de *Yarrowia lipolytica* submetidas à CO<sub>2</sub>, propano e butano pressurizados, pode-se observar a também concordância entre os mesmos, uma vez que este último igualmente reporta ganho de atividade enzimática da Novozym 435 quando esta é pressurizada no fluido propano, e perdas de atividade não significativas para as demais enzimas, neste mesmo fluido. Cabe salientar,

também do trabalho de Oliveira et al. (2006b), que assim como com o uso de propano, o butano também trouxe ganho de atividade para a enzima Novozym 435. Em contrapartida, o CO<sub>2</sub> acarretou perda de atividade para todas as enzimas em qualquer condição experimental.

Do mesmo modo, os resultados apresentados no trabalho de Silva et al. (2012 e 2013b) também relatam ganho de atividade enzimática para as inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 e *Aspergillus niger*, imobilizadas em alginato de sódio e carvão ativado, quando tratadas em propano e GLP, e perda de atividade quando submetidas a CO<sub>2</sub> supercrítico.

O trabalho apresentado por Habulin e Knez (2001), o qual estuda a atividade de algumas lipases na reação de esterificação de ácido butírico e etanol em CO<sub>2</sub> supercrítico e propano a 100 bar e 40 °C, mostra que maiores perdas de atividade foram verificadas em CO<sub>2</sub> e que aumento de atividade de esterificação das lipases foi observado nos testes com propano.

Andrade et al. (2008), ao investigar o efeito de CO<sub>2</sub> e propano pressurizados no tratamento de uma solução contendo D-hidantoinase (2 mg sólidos/mL), observaram um declínio contínuo na atividade da enzima em todas as condições experimentais avaliadas em CO<sub>2</sub> pressurizado. A atividade da enzima na solução residual apresentou valores de cerca de 60%, indicando que a enzima foi desnaturada durante o pré-tratamento com dióxido de carbono.

O aumento do potencial de hidrólise da sacarose pela inulinase, avaliado pela atividade enzimática, após o tratamento com gases pressurizados foi verificado, no entanto o mecanismo deste incremento não é claro. Kamat et al. (2000) sugerem que as enzimas expostas a fluidos em condições supercríticas podem sofrer uma mudança em sua estrutura molecular e conformacional e a interação da enzima com o solvente pode causar um aumento na atividade apresentada anteriormente pela enzima.

Assim, os resultados reportados na literatura e os apresentados neste trabalho indicam que as propriedades do solvente afetam sua interação com enzimas específicas e diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo da enzima estudada (KASCHE et al., 1988; FRICKS et al., 2006), também que

estes solventes, de baixa constante dielétrica e ativação interfacial, permitem melhor acesso ao sítio ativo da enzima (KNEZ et al., 1998).

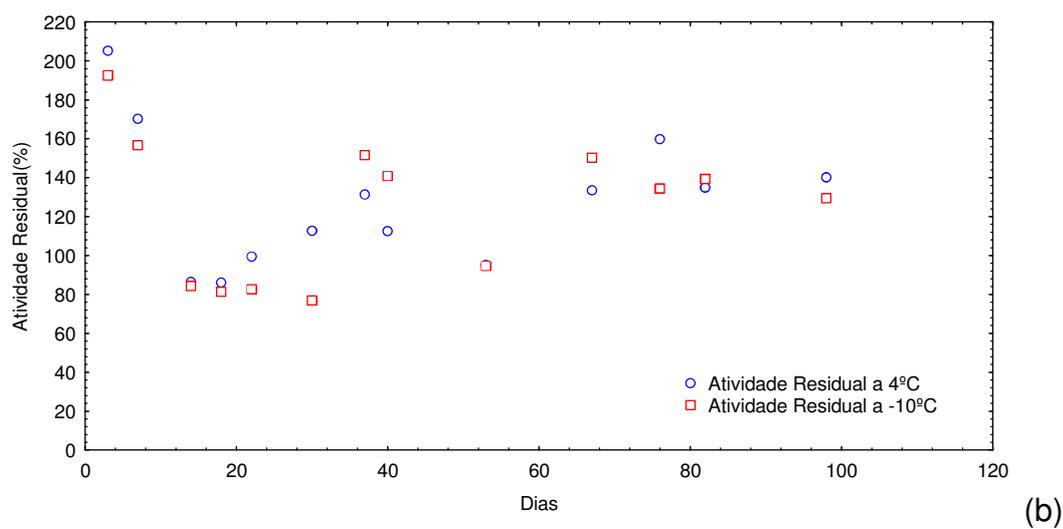
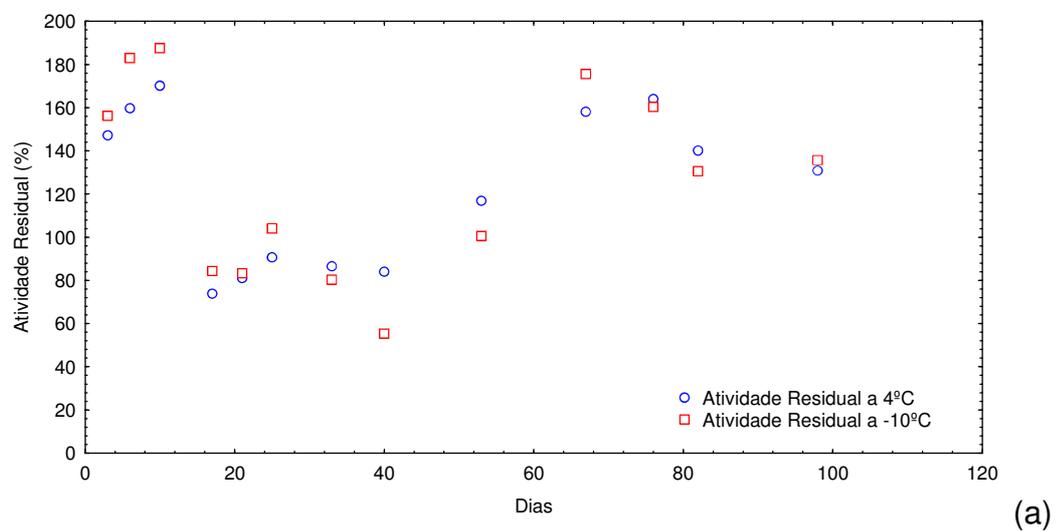
#### **4.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS INULINASES IMOBILIZADAS EM MONTMORILONITA EM BAIXAS TEMPERATURAS APÓS O TRATAMENTO EM FLUIDOS PRESSURIZADOS**

Após a etapa de tratamento em fluidos pressurizados, as enzimas imobilizadas em montmorillonita foram mantidas a -10 e 4 °C e suas estabilidades foram avaliadas em função do tempo. Para a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, para ambos os fluidos, propano e GLP, a atividade monitorada foi realizada utilizando as enzimas tratadas de acordo com as condições referentes ao experimento 1, já para a inulinase de *Aspergillus niger* a atividade monitorada foi realizada utilizando as enzimas do experimento 3. Os resultados foram comparados com as enzimas sem tratamento em fluido pressurizado.

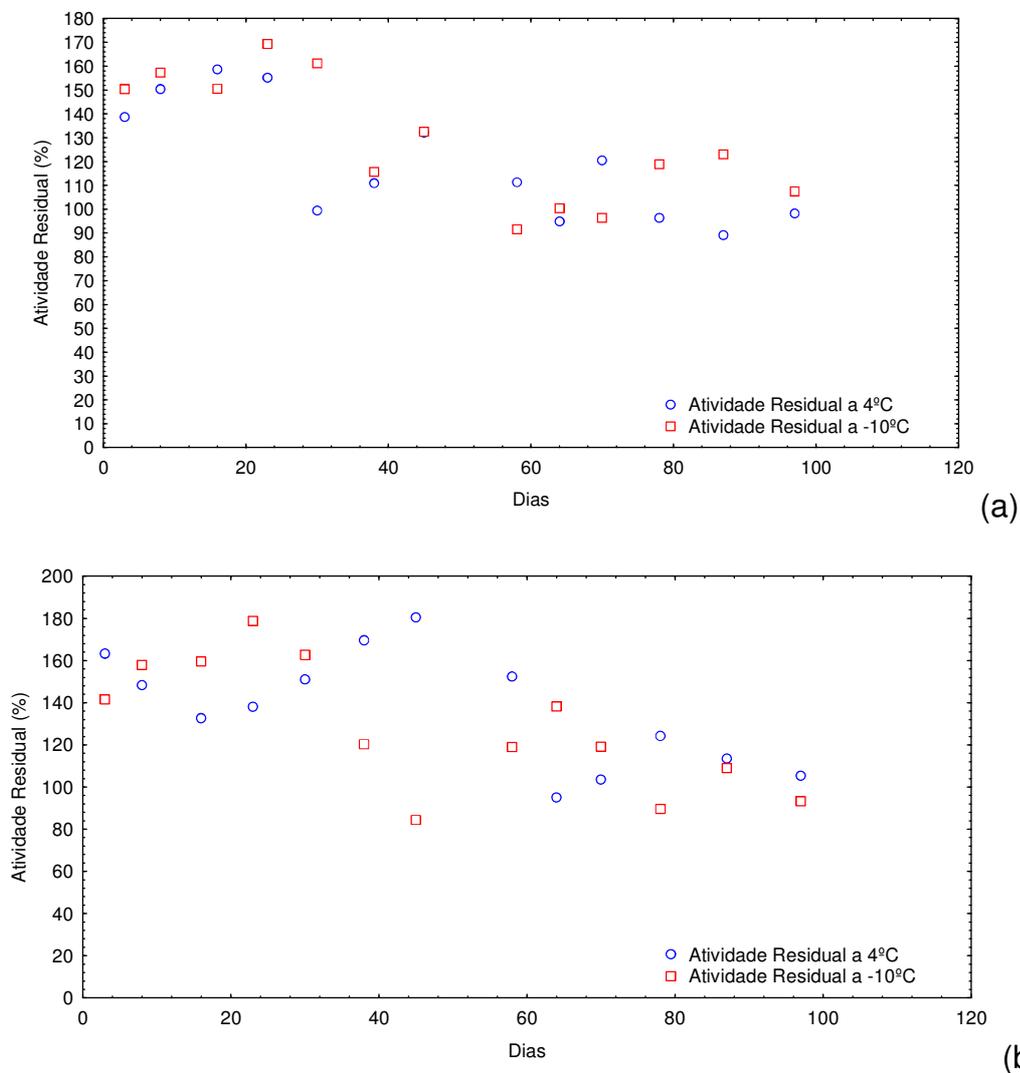
Esta avaliação demonstrou que a inulinase tratada com propano ou GLP manteve a sua atividade inicial após o tratamento a alta pressão até três meses, um resultado bastante interessante e relevante do ponto de vista acadêmico e industrial.

As Figuras 12 e 13 apresentam, respectivamente, a estabilidade da enzima de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e de *Aspergillus niger* submetidas ao tratamento com propano e GLP.

**Figura 12**– Estabilidade da inulinase não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y -7571 após ser submetida ao fluido pressurizado (a) propano; (b) GLP.



**Figura 13** – Estabilidade da inulinase comercial de *Aspergillus niger* após ser submetida ao fluido pressurizado (a) propano; (b) GLP.



Aqui vale ressaltar que, em geral, as atividades das enzimas tratadas em alta pressão se mantiveram superiores a 100%, e que nas semanas iniciais as enzimas atingem uma atividade residual maior que 150%. Tal resultado pode ser de grande relevância tecnológica, uma vez que é mostrado que o tratamento em fluidos pressurizados, principalmente com GLP, poderia ser empregado como uma etapa de preparação anterior, para aumentar a atividade da enzima para a síntese de frutooligossacarídeos (FOS) à pressão ambiente, uma vez que sua atividade pode ser mantida quase inalterada durante semanas.

No trabalho de Coghetto (2011) foi avaliada a estabilidade da enzima de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 sem prévio tratamento em fluido pressurizado. Os resultados mostraram que a atividade enzimática apresenta um comportamento variável, entretanto, mantendo sua atividade original até 80 dias de armazenamento.

De acordo com o estudo de Silva (2013c) para a enzima imobilizada, em alginato de sódio e carvão ativo, de *Aspergillus niger*, os valores mostram que em todas as temperaturas (-80, -10 e 4 °C) estudadas após 150 dias de análise ocorrem perdas de aproximadamente 20% da atividade inicial.

Em trabalho de Astolfi et al., (2011) ao investigarem a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 nas mesmas condições do trabalho de Silva (2013c), verificaram que em 225 dias a enzima duplicou sua atividade residual.

Silva et al. (2013a) estudaram a imobilização da inulinase de *Aspergillus niger* em espuma de poliuretano. A enzima imobilizada foi reutilizada durante 29 ciclos (59 dias) em solução de sacarose. Os resultados mostram que após 24 ciclos (1008 horas) a enzima manteve 49% de sua atividade inicial.

#### **4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA INULINASE NÃO COMERCIAL DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 ANTES E APÓS O TRATAMENTO EM FLUIDOS PRESSURIZADOS**

Foi realizada a caracterização estrutural da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 antes e depois do tratamento em GLP pressurizado, sendo escolhido como condição experimental o ponto central do planejamento experimental. Realizou-se a caracterização apenas desta enzima, devido a mesma apresentar resultados mais significativos de incremento da atividade enzimática especialmente em GLP.

Os resultados relativos ao volume de poro da enzima imobilizada antes e depois do tratamento foram de 0,012 mL/g e 0,095 mL/g, respectivamente, enquanto para a área superficial foram de 6,68 m<sup>2</sup>/g e 5,75 m<sup>2</sup>/g,

respectivamente, mostrando que não foram verificadas alterações estruturais consideráveis na enzima imobilizada após o tratamento a alta pressão. Assim, o aumento observado na atividade da inulinase pode estar relacionado a mudanças na conformação espacial da enzima (proteína).

Silva (2013c) analisou a estrutura das enzimas de *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, ambas imobilizadas em alginato de sódio e carvão ativado após tratamento em GLP pressurizado. Os resultados obtidos para volume de poro foram 0,051 e 0,018 mL/g para *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, respectivamente, e 26,52 e 9,2 m<sup>2</sup>/g para área superficial.

#### **4.6 SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO INULINASES DE *Aspergillus niger* IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS**

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados obtidos para a produção enzimática de frutooligossacarídeos utilizando a sacarose ou inulina como substrato, respectivamente. A comparação direta destes resultados com aqueles de Risso (2004) permite verificar que foram obtidos resultados bastante semelhantes.

**Tabela 7** – Produção de FOS a partir da inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita e pré-tratada em fluidos pressurizados, utilizando a sacarose como substrato.

Sistema	Pré-tratamento	Kestose (%)	Nistose (%)	Frutosilnistose (%)	Total FOS (%)
Orgânico	Propano	13,3	2,7	-	16,1
	GLP	9,4	3	-	12,4
	Não tratada	12,3	3,4	-	15,8
Aquoso	Propano	7,2	6,7	1	14,9
	GLP	11,6	6,7	-	18,3
	Não tratada	5,1	5,4	2,7	13,2

**Tabela 8** – Produção de FOS a partir da inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita e pré-tratada em fluidos pressurizados, utilizando a inulina como substrato.

Sistema	Pré-tratamento	Kestose (%)	Nistose (%)	Frutosilnistose (%)	Total FOS (%)
Orgânico	Propano	2,2	2,4	1,2	5,7
	GLP	2,7	3,5	1,2	7,5
	Não tratada	2,9	2,8	1,1	6,8
Aquoso	Propano	2,8	1,6	-	4,4
	GLP	2	9,3	-	11,3
	Não tratada	2,6	1,3	-	3,9

A partir da análise das Tabelas 7 e 8 pode-se observar que os rendimentos mais elevados em frutooligossacarídeos foram obtidos quando a sacarose foi utilizada como substrato, 12,4 a 18,3%; kestose (GF2) era o

produto em maior quantidade. O pré-tratamento das inulinases usando fluidos pressurizados, apesar de melhorar significativamente a atividade da enzima, proporcionou pequena diferença no rendimento final, comparado ao obtido pela inulinase sem tratamento, todavia, os melhores resultados foram encontrados para a inulinase tratada em GLP.

Com relação aos meios utilizados, orgânico e aquoso, a diferença em termos de conversão não foi significativa, desta forma, o meio aquoso foi preferível, uma vez que é difícil uma justificativa para a produção industrial de FOS utilizando meio orgânico, devido algumas desvantagens apresentadas por este tipo de solvente, como a etapa de separação envolvida após a reação.

Rendimentos mais baixos foram obtidos quando a inulina foi utilizada como substrato, um fato provavelmente relacionado com a especificidade da enzima e resistência à transferência de massa, uma vez que a inulina dissolvida em água forma um creme, semelhante ao obtido quando a água é misturada a um óleo (SILVA, 1996; KASCHE et al., 1988).

Com relação à síntese de frutooligossacarídeos utilizando inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 imobilizadas e pré-tratadas em fluidos pressurizados, estes resultados não constam no presente trabalho, pois os mesmos não alcançaram valores significativos.

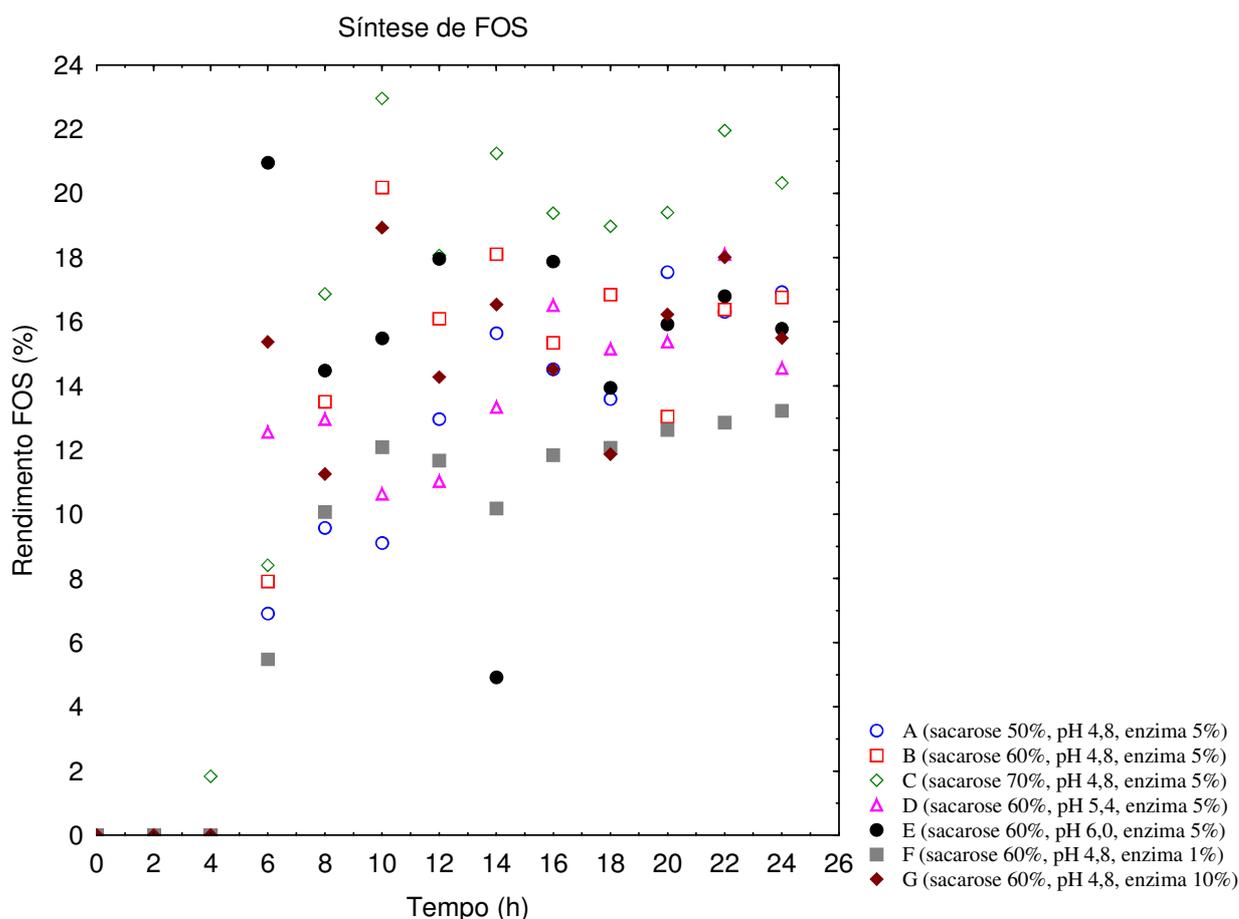
#### **4.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO INULINASES DE *Aspergillus niger* IMOBILIZADAS EM MONTMORILLONITA E PRÉ-TRATADAS EM GLP**

Com o intuito de aumentar a síntese de frutooligossacarídeos pela inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita e pré-tratada em GLP pressurizado, em sistema aquoso, foi realizado um estudo cinético envolvendo diferentes condições reacionais. Assim, nesta etapa, avaliou-se o efeito da concentração de sacarose (50, 60 e 70%), concentração de enzima

(1, 5 e 10%) e pH do tampão (4,8, 5,4 e 6,0), bem como o tempo reacional ideal para a produção de FOS.

A Figura 14 apresenta o gráfico com as respostas para a síntese de FOS. A partir desta figura, pode-se observar que foram obtidos diferentes rendimentos em função do tempo de reação, entretanto, as diferentes condições utilizadas não surtiram efeito significativo em termos de otimização do processo, ou seja, os resultados não proporcionaram um aumento e foram bastante semelhantes, independente das concentrações de sacarose e enzima empregadas, bem como pH do tampão.

**Figura 14** - Cinética para a síntese de FOS em meio aquoso a partir de *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita, pré-tratada em GLP.



Verifica-se que o maior rendimento em FOS, 22,96%, foi obtido com uma concentração de sacarose de 70%, enzima a 5% e pH do tampão em 4,8

(experimento C). Tal resultado foi 4% superior ao obtido anteriormente aos ensaios de otimização.

Resultado interessante refere-se ao tempo reacional, o qual demonstra conversões em frutooligossacarídeos em apenas 10 horas de reação, o que indica que o tempo para a síntese de FOS pode ser reduzido à metade.

O gráfico apresenta o total de FOS obtido, isto é, o somatório dos rendimentos em kestose (GF2), nistose (GF3) e frutossilnistose (GF4). Kestose é sempre o composto que aparece em maior concentração, seguido de nistose. Frutossilnistose (GF4) é encontrado em baixas concentrações apenas nos tempos de 7 a 10 horas, onde o rendimento total em FOS é maior.

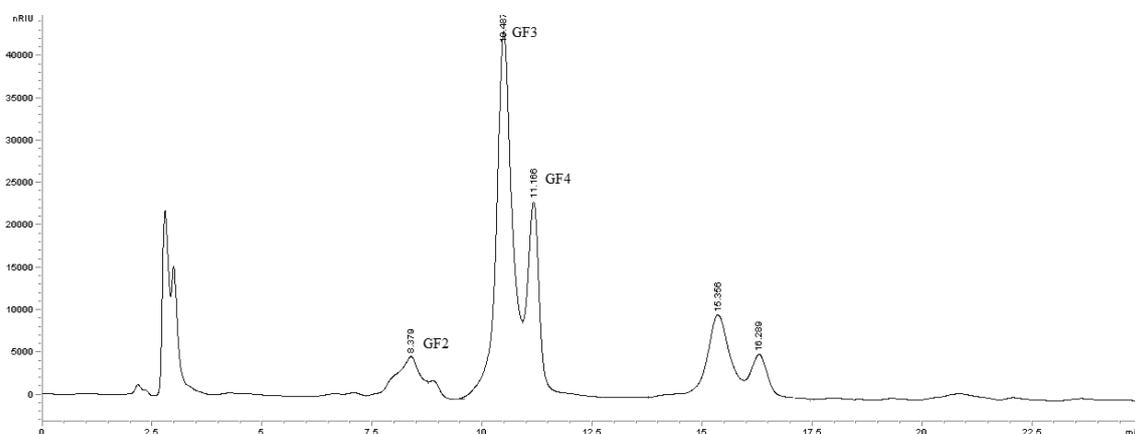
#### **4.8 SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO INULINASES DE *Aspergillus niger* IMOBILIZADAS EM POLIURETANO E PRÉ-TRATADAS EM GLP PRESSURIZADO**

A Figura 15 mostra um cromatograma referente ao melhor resultado obtido para a síntese de FOS, sendo esta realizada em meio aquoso (meio reacional aumentado em 3 vezes com relação a produção de FOS para *Aspergillus niger* imobilizada em montmorillonita) utilizando sacarose como substrato e inulinases de *Aspergillus niger* imobilizadas em espuma de poliuretano pré-tratadas em GLP. Para fins de comparação, a Figura 16 mostra o cromatograma contendo os picos de cada padrão químico (Kestose (GF2), Nistose (GF3) e frutossilnistose(GF4)) com seus respectivos tempos de retenção.

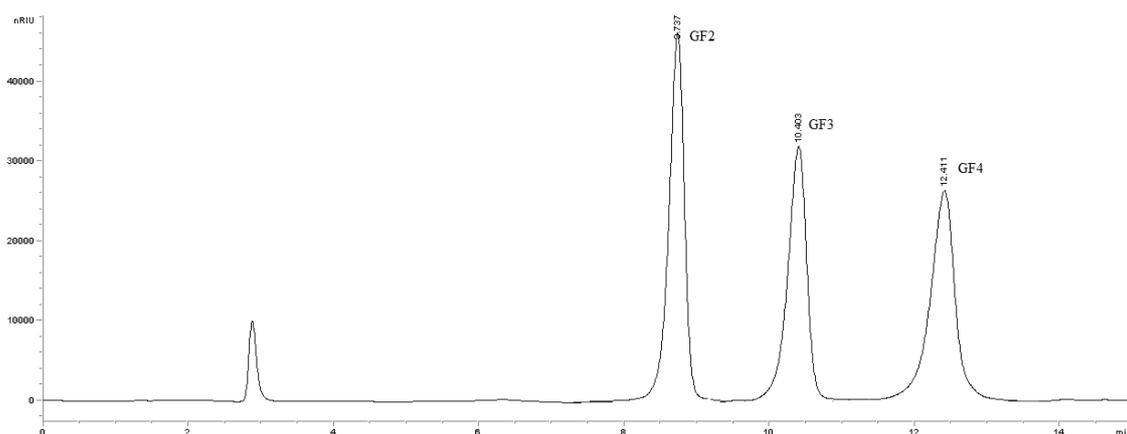
Pode-se observar pelos cromatogramas que houve formação de frutooligossacarídeos, a formação dos prebióticos foi quantificada de acordo com os seus picos cromatográficos correspondentes (kestose – tempo de retenção 8-9 min, nistose – tempo de retenção 10-11 min e frutossilnistose – tempo de retenção 12-13 min), conforme metodologia de Richetti (2013). Após 24 horas de reação a concentração de FOS total foi de 31,21%, como resultado

do esgotamento da sacarose e de formação de FOS com cadeia mais longa (GF3 e GF4) a partir de kestose (GF2).

**Figura 15** – Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da síntese de FOS realizada em meio aquoso, utilizando sacarose como substrato e inulinasas de *Aspergillus niger* imobilizadas em espuma de poliuretano pré-tratadas em GLP.



**Figura 16** – Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos padrões químicos (Kestose (GF2), Nistose (GF3) e Frutosilnistose(GF4)).



Os resultados obtidos na produção de FOS utilizando a inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em PU são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Produção de FOS a partir da inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em PU e pré-tratada em GLP pressurizado, utilizando a sacarose como substrato.

Sistema	Pré- tratamento	Kestose (%)	Nistose (%)	Frutosilnistose (%)	Total FOS (%)
	GLP	5,4	22,3	3,5	31,2
Aquoso	Não tratada	5,4	17,5	3,7	26,5

Para a síntese de FOS, utilizando a enzima de *Aspergillus niger*, os melhores resultados obtidos, foram encontrados quando a enzima foi imobilizada em espuma de poliuretano, 31,2% (GF2 – 5,4; GF3 – 22,3; GF4 – 3,5%).

As enzimas envolvidas na reação têm, além da atividade de transfrutossilacção, atividade hidrolítica, gerando glicose e frutose como subprodutos da reação (YUN, 1996a; NISHIZAWA, NAKAJIMA, NABETANI, 2001). Além disso, a glicose pode atuar como inibidor da enzima, afetando a eficiência da reação (DUAN; CHEN; SHEU; 1994), o que pode justificar os resultados apenas satisfatórios obtidos.

De acordo com Ignacio, Luis e Domingo (2004), quando, em um suporte, o tamanho dos poros da matriz é pequeno, tendo em mente as dimensões da enzima, a adsorção ocorre somente na superfície, como é o caso da terra de diatomáceas, argilas e outros materiais correlatos. No entanto, quando o suporte possui poros na mesma dimensão da proteína, é possível encontrar adesão no interior dos poros. Esta situação ocorre em materiais tais como o carvão ativado e a espuma de poliuretano.

Este fato, referente ao diferente modo de aprisionamento da inulinase pelo suporte pode estar relacionado aos diferentes rendimentos obtidos quando o suporte montmorillonita foi substituído pela espuma de poliuretano, sendo estes últimos resultados mais promissores, o que demonstra a grande correlação entre o suporte utilizado e os substratos da reação.

Silva et al. (2013d) alcançaram rendimentos de até 65% em FOS utilizando inulinase de *Aspergillus niger* imobilizada em alginato de sódio e carvão ativado.

Células de *Bifidobacterium bifidum* foram também utilizadas para a síntese de galactooligossacarídeos a partir da lactose, com uma conversão de 35% e atividade ótima a 40 °C e pH 6,8-7,0 (TZORTZIS et al., 2005). Leveduras *Rhodotorula* produzem invertase extracelular,  $\beta$ -glucosidase e levanases, atividade em celobiose e lactose, resultando em gluco- e galactooligossacarídeos, com rendimentos de 36 a 38%. O pH ótimo e a temperatura para as enzimas de *Rhodotorula minuta* foram 4,0-6,0 e 70 °C, respectivamente (RUBIO et al., 2002; ONISHI et al., 1996).

Nguyena et al. (2011) utilizaram quitina para imobilizar células de *Aspergillus niger* e atingiram conversões em FOS de 35 - 65%, utilizando inulina como substrato, os valores de pH estavam entre 4,5-5,0 para a enzima livre e 5,5-6,0 para a enzima imobilizada.

No que se refere ao sistema aquoso para a síntese de FOS a partir da sacarose, utilizando a inulinase livre ATCC 16045 como catalisador, Santos e Maugeri (2007) encontraram rendimentos em FOS de aproximadamente 10% m/m em reator agitado. Yoshikawa et al. (2008) produziram FOS a partir de sacarose utilizando a enzima bruta de  $\beta$ -frutofuranosidases a partir de *Aureobasidium ullulans* DSM 2404 e obtiveram um rendimento máximo de 62%. Quando inulina foi utilizada como substrato, o rendimento máximo obtido em inulooligossacarídeos foi de 72 % (m/m) com endoinulinases livres a partir de *Pseudomonas* sp. (Yun et al., 1997). Mutanda et al. (2008) investigaram a produção descontínua de inulooligossacarídeos a partir da inulina extraída da chicória com uma endoinulinase comercial (Novozyme ® 960), isolada de *A.*

*niger* e obtiveram um rendimento máximo de 54% após 72 h de reação com 5% de inulina, temperatura de 45 °C, e 5 Ug<sup>-1</sup> de substrato.

Comparando os rendimentos obtidos neste trabalho com alguns resultados apresentados na literatura, pode-se concluir da variabilidade de respostas encontradas. O foco principal deste estudo foi verificar a potencialidade de usar uma inulinase imobilizada como catalisador e também verificar o efeito do pré-tratamento com fluidos pressurizados para aumentar a atividade da enzima. A inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada (com e sem tratamento em fluidos pressurizados) conduziu a rendimentos de 20 a 30%, demonstrando o potencial da técnica apresentada.

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho, conforme apresentado, investigou o comportamento da atividade e estabilidade de inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e *Aspergillus niger*, imobilizadas em diferentes suportes, com posterior aplicação na síntese de FOS em meio com solvente aquoso e orgânico.

Sabe-se, por meio de dados reportados da literatura, que as propriedades do solvente afetam sua interação com enzimas específicas e diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo do biocatalisador em estudo, também que estes solventes, de baixa constante dielétrica e ativação interfacial, mantêm e/ou aumentam a atividade e estabilidade enzimática.

O presente estudo permitiu uma avaliação do comportamento de inulinases comerciais e não comerciais submetidas ao tratamento com propano e GLP pressurizados, assim como das variáveis que afetam o processo. Avaliando a perspectiva da utilização destes gases como solventes para reações enzimáticas de interesse, os mesmos se mostraram apropriados, devido aos bons níveis de atividade residual obtidos, e no caso do GLP, também pelo baixo custo.

Devido à carência de resultados na literatura sobre o comportamento de inulinases tratadas em fluidos pressurizados, pode-se dizer da relevância do presente trabalho para efeitos de desenvolvimento de novas aplicações e/ou processos para estes catalisadores em reações de interesse da indústria de alimentos.

No caso específico dos resultados apresentados aqui, pode-se verificar que o emprego de propano e GLP pressurizados como solventes, em todas as condições avaliadas, conduziu a um aumento da atividade residual da inulinase estudada.

Com isto, para a concretização deste trabalho, foi realizada a aplicação das enzimas na forma imobilizada na síntese de FOS.

Já há alguns anos, os frutooligossacarídeos e micro-organismos com alto potencial de transfrutossilacção têm sido alvos de pesquisas. Os

frutooligossacarídeos, por suas propriedades funcionais, têm encontrado grande nicho de mercado e crescente aplicação industrial, no entanto, atualmente no mercado estão disponíveis poucas marcas deste composto, sendo a técnica de produção dominada pelo Japão. A obtenção tanto dos frutooligossacarídeos como dos suportes e reagentes comumente empregados dificulta o consumo e reprodução das metodologias aplicadas em outros países. Muitas técnicas apresentam uma série de inconvenientes, como por exemplo, etapas muito complexas a serem realizadas em larga escala, demasiado uso de energia e o baixo rendimento.

Devido à frequentes preocupações com o meio ambiente e custo de projetos, processos químicos convencionais têm sido cada vez mais abandonados e processos biotecnológicos têm sido rapidamente valorizados e indicados como seus substitutos.

O sucesso da aplicação de uma enzima imobilizada para produção de frutooligossacarídeos depende da viabilidade da mesma, o que implica em uma atividade elevada e boa estabilidade, bem como de cada componente do sistema. Dessa forma, faz-se necessário a investigação de técnicas viáveis que envolvam processos simplificados e reagentes de baixo custo. O uso de um suporte que apresente um longo tempo de manipulação, tanto durante como antes e após a imobilização, também é um fator de extrema importância.

Neste contexto, após conhecer o comportamento das inulinases frente ao tratamento em fluidos pressurizados, definindo as melhores condições operacionais, as enzimas foram utilizadas na produção de frutooligossacarídeos. Maiores rendimentos foram obtidos em meio aquoso com a enzima imobilizada em espuma de poliuretano e tratada em GLP pressurizado.

Considerando a importância e implicações dos resultados obtidos no presente trabalho, estudos adicionais estão em andamento em nosso laboratório para melhorar a produção de FOS a partir de inulinases.

Frutos do desenvolvimento deste trabalho, os artigos intitulados “Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite” e “Synthesis of

fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG”, foram publicados nos periódicos Process Biochemistry e Applied Biochemistry and Biotechnology, respectivamente. O artigo intitulado "Aspergillus niger inulinase immobilized in polyurethane foam and pre-treated in pressurized LPG: a potential catalyst for enzymatic synthesis of fructooligosaccharides" está submetido. Os artigos completos são apresentados no Apêndice 1, 2 e 3 deste documento.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

- Realizar a otimização da síntese de FOS utilizando inulinases imobilizadas em PU, em meio orgânico e aquoso, variando o pH do tampão e aumentando as concentrações de sacarose e enzima.
- Avaliar o reciclo.
- Realizar ensaios em fluxo contínuo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUDZADEH, M.R.; JIAWEN, Z.; BIN, W. **Modeling of protein adsorption to DEAE Sepharose FF: Comparison of data with model simulation.** Korean Journal of Chemical Engineering, v. 23, p. 124–130, 2006.

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

ANDRADE, J.M.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; SOARES, C.M.; DARIVA, C. **Effect of treatment with compressed CO<sub>2</sub> and propane on D-hydantoinase activity.** Journal of Supercritical Fluids, v. 46, p. 342-350, 2008.

ANDRIOLI, K. **Produção de açúcar do Centro-Sul do Brasil deve crescer 9%.** Revista Globo Rural (11/09/2012). Disponível em < <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI318501-18531,00-PRODUCAO+DE+ACUCAR+DO+CENTROSUL+DO+BRASIL+DEVE+CRESCER.html> > Acesso em 02/11/2012.

ANESE, M.; NICOLI, M.C.; DALL'AGLIO, G; LERICI, C. **Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities.** Journal of Food Biochemistry, v. 18, p. 285- 293, 1995.

ASAKA, M.; AOYAMA, Y.; NAKANISHI, R.; HAYASHI, R. **Purification of a latent form of polyphenoloxidase from La France Pear Fruit and its pressure-activation.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 58, p. 1486-1489, 1994.

ASTOLFI V.; JORIS J.; VERLINDO R.; OLIVEIRA J.V.; MAUGERI F.; MAZUTTI M.A.; OLIVEIRA D.; TREICHEL H. **Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 58: 39, 2011.

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

BALLESTEROS A.; PLOU F.J.; ALCALDE M.; FERRER M.; GARCÍA-ARELLANO H.; REYES-DUARTE D.; GHAZI I. **Enzymatic synthesis of sugar esters and oligosaccharides from renewable resources.** In: Patel R.N. (Ed.). Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnological Industries. p. 463-488. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2007.

BANG, S.S.; GALINAT, J.K.; RAMAKRISHNAN, V. **Calcite precipitation by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*.** Enzyme and Microbial Technology. V. 28, p. 404–409, 2001.

BANG, S.S.; PAZIRANDEH, M. **Physical properties and heavy metal uptake of encapsulated *Escherichia coli* expressing a metal binding gene (NCP).** Journal of Microencapsulation, v. 16, p. 489–49, 1999.

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

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

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**, 2º ed. Zaragoza: Acribia, p. 1087, 1997.

BORNET, F.R. **Undigestible sugars in food products**. American Journal of Clinical Nutrition, Paris, v.59, n.3, Suppl, p.763S-769S, 1994.

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

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

CANO, M.P.; HERMANDEZ, A.; ANCOS, B. **High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products**. Journal of Food Science, v. 62, p. 85-88, 1997.

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

CARDIAS, H.C.T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H.C.; GUIBAN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. **Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous sílica**. Brazilian Journal of Chemical Engineering. v. 16, p. 141-148, 1999.

CARDOSO, C.L.; DE MORAES, M.C.; CASS, Q.B.; **Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas**. Química Nova, v. 32, p. 175-187, 2009.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, J.R.; FREIRE, D.M.G. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium***

**restrictum** in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 239-247, 2000.

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

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

CHAKRABARTI, A.C.; STOREY, K.B. **Immobilization of cellulase using polyurethane foam**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 19, p. 189-207, 1988.

CHEFTEL, J.C. **Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation**. *Food Science and Technology International*, v. 1, p. 75-90, 1995.

CHEN, J.S.; BALABAN, M.O.; WEI, C.; MARSHALL, M.R.; HSU, W.Y. **Interaction of polyphenol oxidase by high-pressures carbon dioxide**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 2345-2349, 1992.

CHEN, T.X.; XIE., Z.J. **Purification and characterization of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06**. *Food Chemistry*, v. 115, p. 1206-1212, 2009.

CHIEN, C; LEE, W.; LIN, T. **Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 252-257, 2001.

COGHETTO, C.C. **Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em suporte inorgânico.** Dissertação de Mestrado. Universidade Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2011.

CONTADO, J.L. **Produção e caracterização da beta-frutofuranosidase de linhagem mutante de *Aspergillus niger* e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** Tese de doutorado. Ciência de Alimentos / Unicamp – 1998.

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

COSTA, M.A.; PERALTA, R.M. **Production of lipase by soil fung and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*).** Journal of Basic Microbiology, v. 39, p.11-15, 1999.

COX, P.M. **Ultracongelacion de alimentos: Guía de la teoría y práctica.** Zaragoza: Acribia, p. 459, 1987.

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELINI, M.Z.; BELOTE, J.G.; VIEIRA, C.R. **Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate.** Bioresource Technology 65, p. 139-143, 1998.

CUPPARI L. **Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto.** Escola Paulista de Medicina. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2005.

DALLA ROSA, C. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleos de soja utilizando lipase em propano.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2006.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM M.; NINOW J.; OLIVEIRA D.; TREICHEL H.; OLIVEIRA J. **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from**

**soybean oil in compressed propane.** Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 49–53, 2008.

DALLA-VECCHIA, R. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004.

DIXON, M.; WEBB, E.C.; **Enzymes**, Academic Press: New York, 1979.

DUAN, K.J.; CHEN, J.S.; SHEU, D.C. **Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose.** Enzyme and Microbial Technology, v. 16, p. 334-339, 1994.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C., **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.

FEIHRMANN, A.F. **Avaliação da atividade enzimática de lipase imobilizadas em fluidos pressurizadas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2005.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**, Zaragoza: Acribia, 1095p, 1993.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; CABRERA, Z.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports.** Enzyme and Microbial Technology, v. 41, p. 565-569, 2007.

FERNANDEZ, R.C.; OTTONI, C.A.; SABINO, E.; SAITO, R.M.; CARTER, J.M.; MAGOSSO, L.R.; ALVES, M.A.; ANDRADE, M.F.; GUILARTE, B.; MAIORANO, A.E. **Screening of beta-fructofuranosidase-producing microorganisms and**

**effect of pH and temperature on enzymatic rate.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 75, p. 87–93, 2007.

FONTES, N.; NOGUEIRO, E.; ELVAS, A.M.; CORRÊA, T.; SAMPAIO, T.; BARREIROS, S. **Effect of pressure on the catalytic activity of subtilisin Carsberg suspended in compressed gases.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1383, p. 165-174, 1998.

FONTES, N.; HALLING, P.J.; BARREIROS, S.; **Control of enzyme ionization state in supercritical ethane by sodium/proton solid-state acid-base buffers.** Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 938-941, 2003.

FRANKEN, L.P.G.; N.S. MARCON; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M.G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. **Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity.** Food and Bioprocess Technology, v. 3, p. 511–520, 2010.

FREITAS, L.; PEREZ, V.H.; SANTOS, J.C.; DE CASTRO, H.F.; J. BRAZ. **Enzymatic Synthesis of Glyceride Esters in Solvent-Free System: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Functional Activating Agent of the Support.** Chemical Society, v. 18, p. 1360-1366, 2007.

FRICKS, A.T.; SOUZA, D.P.B.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C.; GIRARDI, J.S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. **Evaluation os radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide.** Journal os Supercritical Fluids, v. 38, p. 347-353, 2006.

FUKUI, S.; SONOMOTO, K.; TANAKA, A. **Entrapment of biocatalysts with photo-cross- linkable resin prepolymers and urethane resin prepolymers.** Methods in Enzymology, v. 135, p. 230-252, 1987.

FUKUSHIMA, S.; NAGAI, T.; FUJITA, S.; TANAKA, A.; FUKUI, S. **Hydrophilic urethane prepolymers: convenient materials for enzyme entrapment.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 20, p. 1465–1469, 1978.

FUSEE, M.C. **Industrial production of l-aspartic acid using polyurethane-immobilized cells containing aspartase.** *Methods in Enzymology*, v. 136, p. 466–469, 1987.

FUREGON, L.; PERUFFO, A.D.P.; CURIONI, A. **Immobilization of rice limit dextrinase on  $\gamma$ -albumina beads and its possible use in starch processing.** *Process Biochemistry*, v. 32, p. 113, 1996.

GARCIA-GONZALEZ, L.; GEERAERD, A.H.; SPILIMBERGO, S., ELST K.; VAN GINNEKEN, L.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J.F.; DEVLIEGHERE, F. **High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 117, p. 1-28, 2007.

GARCIA-PALAZON, A.; SUTHANTHANGJAI, W.; KADJA, P.; ZABETAKIS, I. **The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry and strawberry.** *Food Chemistry*, v. p. 88, 7-10, 2004.

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

GIBSON, G.R.; WANG, X. **Regulatory effects of bifidobacterid on the growth of other colonic bacteria.** *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, n. 4, p. 412-420, 1994.

GIBSON G.R. **Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin.** Journal of Nutrition, v.7, p. 1438-4, 1999.

GIEBAUF, A.; GAMSE, T. **A simple process for increasing the specific activity of porcine pancreatic lipase by supercritical carbon dioxide treatment.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 9, p. 57-64, 2000.

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

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

GOMES, F.M.; PAULA, A.V.; SILVA, G.S.; CASTRO, H.F. **Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildimidazol.** Química Nova. v. 29, p. 710-718, 2006.

GUISAN, J. M. Em **Immobilization of Enzymes and Cells**; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, cap. 1, 2006.

HABULIN, G.; KNEZ, K. **Supercritical Fluids as Solvents for Enzymatic Reactions.** Acta Chimica Slovenica, V. 54, P. 667–677, 2007.

HABULIN, G.; KNEZ, K. **Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 76, p. 1260–1265, 2001.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E.; **Understanding enzyme immobilisation.** Chemical Society, Rev., v. 38, p. 453, 2009.

HANG, Y.D. e WOODAMS, E. E. **Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase.** *Biotechnology Letters*, v. 17, p. 295–298, 1995.

HANG Y.D. e WOODAMS E.E. **Optimization of Enzymatic Production of Fructo-oligosaccharides from Sucrose.** *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* , v. 29, p. 578–580, 1996.

HAYASHI, S.; YOSHIYAMA, T.; FUJII, N. E SHINOHARA, S. **Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*.** *Biotechnology Letters*, v. 22, n. 18, p. 1465-1469, 2000.

HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN den BROECK, I; WEEMAES, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review).** *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, p. 97-203, 1998.

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

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. e SUMI, N. **A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611.** *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 52, p. 1181–1187, 1988.

HIRAYAMA, M.; SUMI, N. e HIDAKA, H. **Purification and properties of a fructo-oligosaccharide-producing B-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611.** *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, p. 667–673, 1989.

IGNACIO DE ORY, LUIS E ROMERO, DOMINGO CANTERO. **Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and**

**polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*.** Process Biochemistry, v. 39, p. 547–555, 2004.

ILLANES, A.; BARBERIS, S. **Catálisis enzimática en fase orgánica.** In: Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso ed. Biotecnología de enzimas. Valparaíso, Chile, p. 227-254, 1994.

JACKSON, M. A. E ELLER, F.J. **Isolation of long-chain aliphatic alcohols from beeswax using lipase-catalyzed methanolysis in supercritical carbon dioxide.** Journal of Supercritical Fluids, v. 37, p. 173-177, 2006.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. **Production of biodiesel using immobilized lipase a critical review.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 28, p. 253, 2008.

JUNG, K.H.; YUN, J.W.; KANG, K.R.; LIM, J.Y; LEE, J.H. **Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose.** Enzyme and Microbial Technology, v. 11, p. 491-494, 1989.

KAMAT, S.; BECKMAN, E.J.; RUSSELL, A.J. **Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluoroform.** Journal of the American Chemical Society, v. 115, p. 8845-8851, 1993.

KAMAT, S.; BECKMAN, E.J.; RUSSEL, A.J. **Enzyme activity in supercritical fluids.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 15, p. 41-40, 2000.

KASCHE, V.; SCHLOTHAUER, R.; BRUNNER, G. **Enzyme denaturation in supercritical CO<sub>2</sub>: stabilization effects of S-S Bonds during depressurization step.** Biotechnology Letters, v. 10, p. 569-574, 1988.

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

KIM, C.H.; RHEE, S.K. **Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase, Immobilized on Chitin.** Biotechnology Letters, v. 11, p. 201-206, 1989.

KIM, D.H.; CHOI, Y.J.; SONG, S.K.; YUN, J.W. **Production of Inulo-oligosaccharides Using Endo-inulinase from a *Pseudomonas sp.*,** Biotechnology Letters, v. 19, p. 369-371, 1997.

KIM, B.W.; KWON, H.J.; PARK, H.Y.; NAM, S.W.; PARK, J.P. E YUN, J.W. **Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6.** Bioprocess Engineering, v. 23, n. 1, p. 11-16, 2000.

KLEIN, J.; KLUGE, M. **Immobilization of microbial cells in polyurethane matrices.** Biotechnology Letters. v. 3, p. 65–70, 1981

KNEZ, Z. **High pressure process technology- Quo vadis?.** Chemical Engineering Research and Design, v. 82, p. 1541-1548, 2004.

KNEZ, Z. **Enzymatic reactions in dense gases.** Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 357-372, 2009.

KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases.** Journal of Supercritical Fluids, v. 14, p. 17-29, 1998.

KNEZ, Z. E HABULIN, M. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: A short review.** Journal of Supercritical Fluids, v. 23, p. 29-42, 2002.

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

KUMAR, R.; MADRAS, S.; MADAK, J. **Enzimatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide**. Industrial Engineering and Chemical Research, v. 43, p. 1568-1573, 2004.

KUHN G.; MARANGONI M.; FREIRE D.M.G.; SOARES V.F.; GODOY M.G.; CASTRO A.M.; DI LUCCIO M.; TREICHEL H.; MAZUTTI M.A.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J.V. **Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 85, p. 839-844, 2010.

LANZA M.; NDIAYE P.M.; TAVARES F.W.; OLIVEIRA D.; DARIVA C.; OLIVEIRA J.V. **Phase behavior of castor oil in compressed propane and n-butane**. Journal of Supercritical Fluids, v. 34, p. 215-221, 2005.

LEHNINGER, A.L. **Mitochondria and calcium ion transport**. Biochemical Journal, v.119(2), p. 129-138, 1970.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ªed., São Paulo. Editora Sarvier, 2002.

LERESCHE, J.E.; MEYER, H.P. **Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and a biotechnologist**. Organic Process Research & Development., v. 10, p. 572-580, 2006.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. v. 3, 1ª ed, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 594, 2001.

LIN, T-J.; LEE Y-C. **High- content fructooligosaccharides production using two immobilized microorganisms in na internal-loop airlift bioreactor**. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, v. 39, p. 211-217, 2008.

MADLOVA, A.; ANTOSOVA, M.; BARATHOVA, M. POLAKOVIC, M.; STEFUCA, V. BALES, V. **Screening of microorganisms for transfructosylating activity and optimization of biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides.** Chemical Papers 53 (6) p. 366–369, 1999.

MAKINO, Y. **Seleção de linhagens de kluveromyces produtoras de inulinas visando a produção de fructooligosacarídeos: caracterização da enzima e otimização das etapas de produção e purificação.** Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

MANERA, A.P.; KUHN, G.; POLLONI, A.; MARANGONI, M.; ZABOT, G.; KALIL, S.J.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, F. **Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of  $\beta$ -galactosidase.** Food Chemistry, v. 125, p. 1235-1240, 2011.

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

MARX, S.; WINKLER, S.; HARTMEIER, W. **Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria.** FEMS Microbiology Letters, v. 182, p. 163-169, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE-FERNANDEZ, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. **Screening of yeast strains for transfructosylating activity.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49, p. 43–49, 2007.

MAZUTTI, M.A.; ZABOT, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; RODRIGUES, M.I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, FILHO F. **Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in packed-bed bioreactor.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 85, p.109-114, 2010.

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

MITSOUKA, T. **Bifidobacteria and Their Role in Human Health.** Journal industrial microbiology, v. 6, p. 263-268, 1990.

MODLER, H.W. **Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications.** International Dairy Journal, Kamptville, v. 4, p. 383-407, 1994.

MUTANDA, T.; WILHELMI, B.S.; WHITELEY, C.G. **Response surface methodology: synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger*.** Enzyme and Microbial Technology, 43, p. 362-368, 2008.

NDIAYE, P. M.; LANZA, M.; TAVARES, F.W.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Phase behavior of olive and soybean oils in compressed propane and n-butane.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, p. 405-415, 2006a.

NDIAYE, P.M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F. W.; OLIVEIRA, J.V. **Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures.** Journal of Supercritical Fluids, v. 37, p. 29-37, 2006b.

NGUYENA, Q.D.; JUDIT, M.R.; BALINT, C.; AGOSTON, H. **Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase.** *Process Biochemistry*, 46, p. 298-303, 2011.

OGINO, H.; ISHIKAWA, H. **Enzymes which are stable in the presence of organic solvents.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, p. 109-116, 2001.

NISHIZAWA, K.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H. **Kinetic study on transfructosylation by beta-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for fructooligosaccharide production.** *Food Science and Technology Research*, v. 7, p. 39–44, 2001.

OH, Y.S.; MAENG, J.; KIM, S.J. **Use of microorganism-immobilized polyurethane foam to absorb and degrade oil on water surface.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, p. 418–423, 2000.

OLIVEIRA, D. **Estudo Comparativo da Produção Enzimática de Ésteres a partir de Óleos Vegetais em Solvente Orgânico e CO<sub>2</sub> Supercrítico.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

OLIVEIRA, J.V. E OLIVEIRA, D. **Kinetics of the enzymatic alcoholysis palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>.** *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 39, p. 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA, G.L. E MANTOVANI, M.S. **Transformações biológicas: contribuições e perspectivas.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OLIVEIRA, D. E OLIVEIRA, J.V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 141-148, 2001.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids, v. 38, p. 373–382, 2006a.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; DARIVA, C.; CUNHA, A. G.; BEVILAQUA, J.V.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V.; FREIRE, D.M.G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 39, p. 117-123, 2006b.

ONDERKOVA, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIC, M. **Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier**. Chemical Papers, v. 61, p. 359-363, 2007.

ONISHI, N.; TANAKA, T. **Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing beta-glycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO87**. J. Ferm. Bioeng., 82, p. 439-43, 1996.

O'REILLY, K.T.; CRAWFORD, R.L. **Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells**. Applied and Environmental Microbiology, v. 55, p. 2113–2118, 1989.

PARK, Y.K.; ALMEIDA, M.M. **Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger***. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 7, p. 331-334, 1991.

PASSOS, L.M.L E PARK, Y.K. **Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos**. Ciência Rural, v. 33, n.2, p. 385-390, 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.

PIMENTEL C.V.M.B.; FRANCKI V.M.; GOLLUCKE A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

PLAYNE, M.J.; CRITTENDEN, R. **Commercially Available Oligosaccharides**, In: Bulletin of the IDF, v. 313, p. 10-22., 1996.

PRADO, G.H.C.; KHAN, M.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. **Enzymatic hydrolysis of conjugated linoleic acid-enriched anhydrous milk fat in supercritical carbon dioxide**. Journal Supercritical Fluids, v. 66, p. 198, 2012.

PRIMO, M.S.; CENI, G.C.; MARCON, N.S.; ANTUNES, O.A.C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves**. Journal of Supercritical Fluids, v. 43, p. 283–290, 2007.

POWELL, L.W.; In: **Microbial Enzyme and Biotechnology**, London, Elsevier Science Publishers, 1990.

QUIROGA, E.; CAMÍ, G.; MARCHESE, J.; BARBERIS, S. **Organic solvents effect on the secondary structure of araujiain hl, in different media**. Biochemical Engineering Journal, v. 35, p. 198–202, 2007.

REID, R.C.; PRAUSNITZ, J.M. e POLING, B.E. **The Properties of Gases and Liquids**. McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 1987.

RICHETTI, A. **Proposição de metodologias para imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em alginato de sódio e carvão**

**ativado e para quantificação de frutooligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência.** Tese de Doutorado. Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Uri, Erechim, 2013.

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

ROCHA, W.S., GROSSO, C.R.F. **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose.** *Sitientibus*, Feira de Santana, v. 35, p. 125-148, 2006.

RODRIGUES, M.S.M. **Produção de lipases e sua aplicação na eliminação de resinas em lignocelulósicos.** Tese de Doutorado. Departamento de Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

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

RUBIO, M.C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A.R. **Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*.** *Phytochemistry*, v. 61, p. 605-609, 2002.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. **Influence of media components and reaction parameters on the production of fructosyl transferase and fructooligosaccharides.** *Sciences des Aliments*, v. 22, n. 3, p. 277-287, 2002.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. **Production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* CFR**

**202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77.** Process Biochemistry, v. 39, p. 755–760, 2004.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. **Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosacharides.** Trends in Food Science & Technology, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

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

SANTOS, A.M.P. **Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *kluyveromyces bulgaricus*.** Dissertação de mestrado, FEA, UNICAMP, 1998.

SANTOS, A.M.P.; MAUGERI, F. **Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*.** Food Technology and Biotechnology, 45 (2), p. 181–186, 2007.

SAVAGE, P.E.; GOPALAN, S.; MIZAN, T.I.; MARTINO, C.J.; BROCK, E.E. **Reactions at Supercritical Conditions: Applications and Fundamentals.** AIChE Journal, v. 41, p. 1723-1778, 1995.

SCRIBAN, E. **Biotecnologia.** Editora Malone: São Paulo. p. 498, 1985.

SILVA, R.F. **Use of inulin as a natural texture modifier.** Cereal Foods World, St. Paul 1996, 41, p. 792-795, 1996.

SILVA, C.E.V. **Produção enzimática de fructooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melado de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2008.

SILVA, M.F.; GOLUNSKI, S.M.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H. **Pressurized Propane: An Alternative Technique to Increase Inulinase Activity**. *Industrial Biotechnology* (New Rochelle), v. 8, p. 293-299, 2012.

SILVA, M.F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R.M.; HENRICK, P.; KUHN, G.O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H. **Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam**. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 54-59, 2013a.

SILVA, M.F.; GOLUNSKI, S.M.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A; PERGHER, S.B.C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H. **Liquefied petroleum gas as solvent medium for the treatment of immobilized inulinases**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 88, p. 280-286, 2013b.

SILVA, M.F. **Caracterização parcial e avaliação da atividade de inulinasas em fluidos pressurizados e aplicação na síntese de frutooligossacarídeos**. Tese de Doutorado. Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Uri, Erechim, 2013c.

SILVA, M.F; RIGO, D; MOSSI, V.; GOLUNSKI, S.; DE KUHN, G.O.; DI LUCCIO, M.; DALLAGO, R.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. **Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous organic medium**. *Food Chemistry*, v. 138, p. 148-153, 2013d.

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

SOMIARI, I.R.; BIELECKI, S. **Oligosaccharide synthesis by invertase in organic media containing SDS.** *Biotechnology Letters*, v. 20, n 3, p. 287-290, 1998.

SPIEGEL, J.E. **Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients.** *Food Technology*, Boston, v. 48, p. 85-89, 1994.

SUBRAMANIAM, B.; McHUGH, M. **Reactions in supercritical fluids – a review.** *Ing. Engineering Chemistry Process Design and Development*, v. 25, p. 1-12, 1988.

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

TEDJO, W.; ESHTIAGHI, M.N.; KNORR, D. **Impact of Supercritical Carbon Dioxide and High Pressure on Lipoxygenase and Peroxidase Activity.** *Journal of Food Science*, v. 65, p. 1284-1287, 2000.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A.K.; GIBSON, G.R. **Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 4117.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, p. 412-416, 2005.

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

VANKOVA, K.; ONDERKOVA, Z.; ANTOSOVA, M.; POLKOVIC, M. **Design and economics of industrial production of fructooligosaccharides.** *Chemical Papers* v. 62, p. 375–381, 2008.

VILLENEUVE P., MUDERHWA J.M., GRAILLE J., HAAS M.M. **Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 9, p. 113-148, 2000.

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

YAO, S.; GUAN, Y.; HE, W.; QI, X.; ZHU, Z. **Activities of Several Enzymes in Ethanol + Water at Elevated Pressure of Carbon Dioxide,** Journal of Chemical Engineering Data, v. 49, p. 1333-1339, 2004.

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

YOSHIKAWA, J.; AMACHI, S.; SHINOYAMA, H.; FUJII, T. **Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of  $\beta$ -fructanofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*.** Biotechnol Letters, v. 30, p. 535-539, 2008.

YU, Z.; RIZVI, S.H. e ZOLLWEG, J.A. **Enzymatic esterification of fatty acid mixtures from milk fat and anhydrous milk fat with canola oil in supercritical carbon dioxide.** Biotechnology Progress, v. 8, p. 421p, 1993.

YUN, J.W. **Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application.** Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p. 107–117, 1996a.

YUN, J.W.; SONG, S.K. **Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, p. 18–21, 1996b.

YUN, J.W.; KIM, D.H.; YOON, H.B.; SONG, S.K. **Effect of inulin concentration on the production of inulo-oligosaccharides by soluble and immobilized endoinulinase.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, p. 365-368, 1997.

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

WANG, X.; RUCHENSTEIN, E. **Preparation of porous polyurethane particles and their use of enzyme immobilization.** *Biotechnology Progress*, v. 9, p. 661–665, 1993.

WEN, D.; JIANG, H.; ZHANG, K. **Supercritical fluids technology for clean biofuel production.** *Progress in Natural Science*, v. 19, p. 273-284, 2009.

WEEMAES, C.; LUDI KHUYZE, L.; BROECK, I; VAN DEN e HENDRICKX, M. **High Pressure Inactivation of Polyphenoloxidases.** *Journal of Food Science*, v. 63(5), p. 873-877, 1998.

ZANIN, G.M. e MORAES, F.F. **Enzimas imobilizadas.** In: *Enzimas como agents biotecnológicos*, Said, S. e Pietro, R.C.L.R., Ed. Legis Summa, 2004.

ZAKS, S.E.; KLIBANOV, A.M. **Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?** *Biochemistry*, p. 5432, 1986.

ZHOU, L.C.; LI, Y.F.; BAI, X.; ZHAO, G.H. **Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove CU(II) from aqueous solution.** Journal of Hazardous Materials, v. 167, p. 1106–1113, 2009.

## **Apêndice A – Artigo publicado 1**

Título: Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite.

Periódico: Process Biochemistry.

## **Apêndice B – Artigo publicado 2**

Título: Synthesis of fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* commercial inulinase immobilized in montmorillonite pretreated in pressurized propane and LPG.

Periódico: Applied Biochemistry and Biotechnology.

### **Apêndice C – Artigo publicado 3**

Título: Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam.

Periódico: Food and Bioproducts Processing

## **Apêndice D – Artigo submetido**

Título: *Aspergillus niger* inulinase immobilized in polyurethane foam and pre-treated in pressurized LGP: a potential catalyst for enzymatic synthesis of fructooligosaccharides.

Submetido.