

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR**  
***Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Professor Doutor Jorge Luis Ninow

Co-orientadora: Doutora Sandra Aparecida Furlan

**ANDRÉA LIMA DOS SANTOS SCHNEIDER**

Florianópolis - SC

1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR**  
*Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Professor Doutor Jorge Luis Ninow

Co-orientadora: Doutora Sandra Aparecida Furlan

ANDRÉA LIMA DOS SANTOS SCHNEIDER

Florianópolis - SC

1996

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos laboratórios do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CBD) em Joinville, SC.

Termo de Aprovação

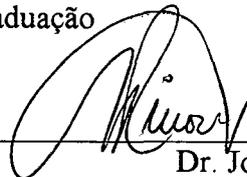
ESTUDO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR

*Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907

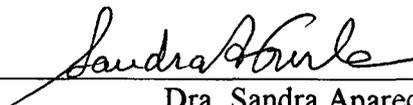
por

Andréa Lima dos Santos Schneider

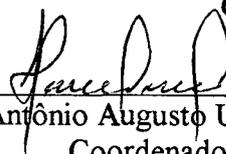
Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação



Dr. Jorge Luiz Ninow  
Orientador

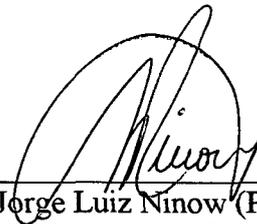


Dra. Sandra Aparecida Furlan  
Co-orientadora



r/ Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza  
Coordenador do CPGENQ

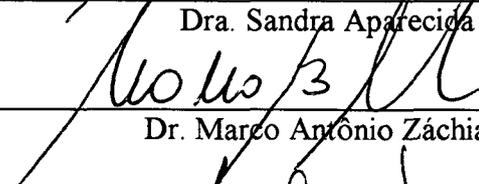
**Banca Examinadora:**



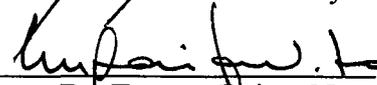
Dr. Jorge Luiz Ninow (Presidente)



Dra. Sandra Aparecida Furlan



Dr. Marco Antônio Záchia Ayub



Dr. Ernesto Raizer Neto

Florianópolis, 31 de maio de 1996

Ao Giancarlo,

... O amor não muda conforme o dia e a hora,  
Mas chega inalterado até o fim dos tempos.  
Se me provarem que isto está errado,  
Então nunca escrevi nem ninguém jamais amou.

William Shakespeare, 1564-1616

Amo-te profundamente, até onde Minha alma alcança.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Jorge Ninow pela orientação e amizade demonstrada ao longo destes anos de trabalho.

À Dra. Sandra Furlan, agradeço pela orientação, paciência, amizade, dedicação e apoio prestados nestes anos de convivência, e especialmente, durante a realização deste trabalho e redação da dissertação.

Aos professores, Dr. Marco Ayub e Dr. Ernesto Raizer por aceitarem revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta dissertação.

Aos amigos, Sandra, Roselene, Regina, Gisele, Luciana, Dieter, Daniele, Mariane, que estiveram totalmente dispostos a ajudar em qualquer momento e cuja presença tornou o dia a dia mais agradável e divertido.

Aos amigos e pesquisadores, Patrick, Marília e Maurício, meu reconhecimento pelos preciosos conselhos e disponibilidade em esclarecer as dúvidas.

Aos colegas pesquisadores, Gilmar, Marcelo, Elisabeth, Adriane e José Paulo, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas, Carlos Augusto, Rômulo, Ricardo, pela ajuda nos muitos momentos que precisei.

Aos demais pesquisadores, colegas e funcionários do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico e da Universidade Federal de Santa Catarina, muito obrigada pela atenção sempre presente nos momentos necessários.

Aos meus familiares, pais e sogros que sempre tiveram uma palavra de estímulo e incentivo, o meu muito obrigada.

Aos colegas do curso de Mestrado, Débora, Ciumara, Daniela, Dariva, Sílvia e Daniel pela amizade, pelos grupos de estudo e pelos momentos de descontração, valeu a força.

À Diretoria do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico, especialmente a pessoa do Dr. Rainer Jonas, por permitir o desenvolvimento da parte experimental nas dependências do CDB, agradeço sinceramente.

Meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de estudos.



II.3.1.5 Velocidade máxima de reação ( $V_{\max}$ ) e constante de Michaelis Menten ( $K_m$ )	21
II.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE INULINASE	23
II.4.1 Bactérias	24
II.4.2 Fungos filamentosos	24
II.4.3 Leveduras	24
II.5 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO CELULAR E A ATIVIDADE ENZIMÁTICA	29
II.5.1 Temperatura de cultivo	29
II.5.2 pH do meio de cultivo	31
II.5.3 Composição do meio de cultivo	32
II.5.4 Concentração inicial de substrato	36
II.5.5 Suprimento de oxigênio	37
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
III.1 MICRORGANISMO	39
III.1.1 Manutenção da cultura	39
III.1.2 Preparo do inóculo	39
III.2 MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	40
III.2.1 Ensaio realizados em frascos agitados	40
III.2.1.1 Preparo do extrato de chicória	43
III.2.1.2 Preparo do extrato de farelo de arroz	44
III.2.2 Ensaio realizados em fermentador	44
III.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	47
III 3.1 Esquema de tratamento de amostra	47
III.3.2 Determinação da concentração celular	48
III.3.3 Obtenção da enzima ligada à parede celular	49
III 3.4 Determinação da atividade enzimática	50
III 3.5 Teste enzimático para determinação de glicose e frutose	51

III.3.5.1 Princípio do método	51
III.3.5.2 Dosagem de glicose e frutose	52
III 3.6 Determinação das características da exo-inulinase	55
III.3.7 Hidrólise da inulina	57
III 3.8 Determinação da concentração de etanol	57
III 3.9 Medida da concentração de oxigênio dissolvido	59
III 3.9.1 Princípio de funcionamento do eletrodo	60
III 3.9.2 Procedimento de calibração do eletrodo	60
III 3.10 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_L a$ )	61
III.4 METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS	63
III.4.1 Concentração de glicose e frutose	63
III.4.2 Atividade enzimática	64
III.4.3 Concentração de inulina	65
III.4.4 Fatores de conversão	65
III.4.5 Produtividade	66
III.4.6 Atividade enzimática específica	67
III.4.7 Velocidades instantâneas e específicas	67
III.4.8 Velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) e Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )	68
<b>IV RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	69
IV.1 Determinação das características da exo-inulinase produzida por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	69
IV.1.1 Estabilidade com o tempo	69
IV.1.2 Estabilidade com a temperatura	70
IV.1.3 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática (Temperatura ótima)	71

IV.1.4 Efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH ótimo) e estabilidade com o pH	73
IV.1.5 Determinação de $V_{max}$ e $K_m$	74
IV.2. Estudo da influência do meio e das condições de no crescimento celular e na atividade enzimática	77
IV.2.1 Influência da temperatura	77
IV.2.2 Influência do pH	83
IV.2.3 Influência da concentração inicial de substrato	85
IV.2.4 Estudo da fonte de nitrogênio	89
IV.2.5 Efeito da concentração de extrato de levedura	96
IV.2.6 Utilização do extrato de chicória como fonte de carbono para produção de inulinase	99
IV.2.7 Influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_La$ )	103
<b>V CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE A - Curvas de Calibração</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE B - Figuras</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

II.1-	Formas tautoméricas da D-frutose em solução.	5
II.2-	Representação esquemática do processo de obtenção do xarope de frutose.	9
II.3-	Fórmula estrutural da molécula de inulina.	12
II.4-	Estrutura esquemática da parede celular de leveduras e modo de retenção de glicoproteínas, de acordo com (A) Lampen e (B) Kidby & Davies.	27
III.1 (a)-	Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 em fase de crescimento exponencial.	41
III.1 (b)-	Células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 em fase estacionária de crescimento.	41
III.2-	Sistema de fermentação em frascos agitados.	43
III.3-	Sistema de fermentação em biorreator.	46
III.4-	Dispositivo experimental de fermentação.	47
III.5-	Representação esquemática do procedimento de amostragem.	48
III.6-	Curva típica obtida no teste de determinação de glicose e frutose no Sistema “Microtiter Reader”.	54
III.7-	Cromatograma típico da análise de etanol por cromatografia em fase gasosa.	59
IV.1-	Estabilidade da enzima extracelular (AES) e periplasmática (AEP), em função do tempo de estocagem.	69
IV.2-	Atividade residual das enzimas extracelular (AES) e periplasmática (AEP) após incubação por 1 h, em diferentes temperaturas, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0.	71
IV.3-	Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas extracelular (AES) e periplasmática (AEP).	72
IV.4-	Efeito do pH sobre a atividade das enzimas extracelular (AES) e periplasmática (AEP).	73
IV.5-	Atividade residual da enzima extracelular (AES) após incubação por 24 h, a 30°C, em diferentes valores de pH.	74

<b>IV.6-</b>	Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) pelo método descrito por Lineweaver-Burk.	76
<b>IV.7 (a)-</b>	Concentração celular (X) e atividade enzimática total (AET), em função da temperatura, após 10 h de cultivo.	78
<b>IV.7 (b)-</b>	Concentração celular (X) e atividade enzimática total (AET), em função da temperatura, após 48 h de cultivo.	79
<b>IV.8-</b>	Produtividade em enzima ( $P_{AE}$ ), em função do tempo para diferentes condições de temperatura.	80
<b>IV.9-</b>	Atividade enzimática periplasmática (AEP), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.	81
<b>IV.10-</b>	Atividade enzimática extracelular (AES), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.	81
<b>IV.11-</b>	Concentração de substrato (S), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.	82
<b>IV.12-</b>	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, em meio com e sem controle de pH.	83
<b>IV.13-</b>	Concentração celular (X), em função do tempo, em meio com e sem controle de pH.	84
<b>IV.14-</b>	Evolução do pH, em função do tempo, em meio com e sem controle de pH.	84
<b>IV.15-</b>	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações iniciais de substrato.	85
<b>IV.16-</b>	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações iniciais de substrato.	86
<b>IV.17-</b>	Concentrações de etanol (E), de células (X) e atividade enzimática total (AET) para diferentes concentrações iniciais de substrato.	88
<b>IV.18-</b>	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de bacto peptona (BP).	90
<b>IV.19-</b>	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de bacto peptona (BP).	90
<b>IV.20-</b>	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de sulfato de amônio (SA).	92

IV.21-	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de uréia (U).	92
IV.22-	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de sulfato de amônio (SA).	93
IV.23-	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de uréia (U).	93
IV.24-	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo: MF1, MF2, MF3, MF4, MF5, CT.	95
IV.25-	Atividade enzimática extracelular (AES), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo: MF1, MF2, MF3, MF4, MF5, CT.	95
IV.26-	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de extrato de levedura (YE).	98
IV.27-	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, diferentes concentrações de extrato de levedura (YE).	98
IV.28-	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo: MC1, MC2, MC3, MC4, CT.	100
IV.29-	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo: MC1, MC2, MC3, MC4, CT.	100
IV.30-	Concentração de inulina (I), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo: MC1, MC2, MC3, MC4, CT.	101
IV.31-	Valores de $K_L a$ obtidos para diferentes condições de aeração, em vários estados de agitação.	104
IV.32(a)	Crescimento celular (X), atividade enzimática total (AET) e consumo de substrato (I), em função do tempo, para $K_L a$ igual a $21 \text{ h}^{-1}$ .	110
IV.32(b)	Concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e etanol (E), em função do tempo, para $K_L a$ igual a $21 \text{ h}^{-1}$ .	110
IV.32 (c)	Evolução do crescimento celular (X), e da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento, para $K_L a$ igual a $21 \text{ h}^{-1}$ .	111
IV.32(d)	Correlação linear entre $\mu$ e $\mu_p$ , obtida entre 5,5 e 9,5 horas de cultivo, para $K_L a$ igual a $21 \text{ h}^{-1}$ .	111

<b>IV.33 (a)</b>	Crescimento celular (X), atividade enzimática total (AET) e consumo de substrato (I), em função do tempo, para $K_{La}$ igual a $36 \text{ h}^{-1}$ .	112
<b>IV.33(b)</b>	Concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e etanol (E), em função do tempo, para $K_{La}$ igual a $36 \text{ h}^{-1}$ .	112
<b>IV.33 (c)</b>	Evolução do crescimento celular (X), e da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento, para $K_{La}$ igual a $36 \text{ h}^{-1}$ .	113
<b>IV.33(d)</b>	Correlação linear entre $\mu$ e $\mu_p$ , obtida entre 5,5 e 9,5 horas de cultivo, para $K_{La}$ igual a $36 \text{ h}^{-1}$ .	113
<b>IV.34 (a)</b>	Crescimento celular (X), atividade enzimática total (AET) e consumo de substrato (I), em função do tempo, para $K_{La}$ igual a $89 \text{ h}^{-1}$ .	114
<b>IV.34(b)</b>	Concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e etanol (E), em função do tempo, para $K_{La}$ igual a $89 \text{ h}^{-1}$ .	114
<b>IV.34 (c)</b>	Evolução do crescimento celular (X), e da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento, para $K_{La}$ igual a $89 \text{ h}^{-1}$ .	115
<b>IV.34(d)</b>	Correlação linear entre $\mu$ e $\mu_p$ , obtida entre 5,5 e 9,5 horas de cultivo, para $K_{La}$ igual a $89 \text{ h}^{-1}$ .	115
<b>A.1 -</b>	Curva de correlação entre concentração celular (X) a absorvância (abs) obtida a partir de suspensões de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 cultivadas em meio YEPI: $X = (\text{abs} - 0,054)/1,324$ , $r = 0,9998$	122
<b>A.2 -</b>	Exemplo de uma curva de calibração obtida no teste de determinação de glicose e frutose em Sistema "Microtiter Reader": $[\text{Frutose}] = (\text{abs} - 0,042)/1,538$ , $r = 0,9997$	123
<b>A.3 -</b>	Exemplo de curva de calibração para etanol (E) obtida por cromatografia gasosa.	124
<b>B.1 -</b>	Concentração de frutose (F), em função do tempo, para diferentes concentrações de inulina.	126
<b>B.2 -</b>	Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.	126
<b>B.3 -</b>	Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.	127

<b>B.4-</b>	Determinação de $\mu_{\max}$ pelo método logarítmico, para $K_L$ igual a $21 \text{ h}^{-1}$ .	127
<b>B.5-</b>	Determinação de $\mu_{\max}$ pelo método logarítmico, para $K_L$ igual a $36 \text{ h}^{-1}$ .	128
<b>B.6-</b>	Determinação de $\mu_{\max}$ pelo método logarítmico, para $K_L$ igual a $89 \text{ h}^{-1}$ .	128
<b>B.7-</b>	Evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de enzima ( $\mu_p$ ), em função do tempo, para $K_L$ igual a $21 \text{ h}^{-1}$ .	129
<b>B.8-</b>	Evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de enzima ( $\mu_p$ ), em função do tempo, para $K_L$ igual a $36 \text{ h}^{-1}$ .	129
<b>B.9-</b>	Evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de enzima ( $\mu_p$ ), em função do tempo, para $K_L$ igual a $89 \text{ h}^{-1}$ .	130

## LISTA DE TABELAS

<b>II.1 -</b>	Percentual de glicose e frutose em vegetais.	4
<b>II.2 -</b>	Poder adoçante de diferentes açúcares.	6
<b>II.3 -</b>	Propriedades físicas e químicas do xarope de frutose (HFS).	8
<b>II.4 -</b>	Transformações químicas e microbianas da inulina e suas aplicações.	14
<b>II.5 -</b>	Valores de pH ótimo e faixas de estabilidade com o pH para inulinase de diferentes microrganismos.	22
<b>II.6 -</b>	Composição e conteúdo vitamínico do farelo de arroz.	35
<b>III.1-</b>	Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos em frascos agitados.	42
<b>III.2-</b>	Condições de aeração e agitação e os respectivos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_La$ ) obtidos em meio de cultivo YEP I, em fermentador Biostat MD B.Braun com cuba de 2L.	45
<b>III.3-</b>	Procedimento de determinação de glicose e frutose.	54
<b>IV.1-</b>	Resultados gerais das fermentações realizadas sob diferentes temperaturas.	77
<b>IV.2-</b>	Resultados gerais das fermentações utilizando diferentes concentrações iniciais de substrato.	86
<b>IV.3-</b>	Resultados gerais das fermentações utilizando diferentes concentrações de extrato de levedura.	96
<b>IV.4-</b>	Resultados gerais obtidos no cultivo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> sob diferentes condições de suprimento de oxigênio.	105
<b>A.1 -</b>	Valores de absorvância de suspensões de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 cultivadas em meio contendo YEP I (espectrofotômetro LKB, 600 nm).	122
<b>A.2 -</b>	Valores de absorvância de soluções padrão de frutose (espectrofotômetro "Microtiter Reader", 340 nm).	123
<b>A.3 -</b>	Concentração das soluções padrão de etanol (E) e suas respectivas áreas para construção da curva de calibração em cromatografia em fase gasosa.	124

## NOMENCLATURA

abs	absorbância
AE	atividade enzimática (U/mL)
AE <sub>0</sub>	atividade enzimática inicial (U/mL)
AE <sub>esp</sub>	atividade enzimática específica (U / g célula)
AE <sub>max</sub>	atividade enzimática máxima (U/mL)
AEP	atividade enzimática retida na parede celular ou periplasmática (U/mL)
AES	atividade enzimática contida no sobrenadante ou extracelular (U/mL)
AET	atividade enzimática total (U/mL)
ATCC	American Type Culture Collection (EUA)
BP	Bacto peptone (bacto peptona)
C	concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L)
C*	concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda)
cp	centipoise
CT	controle
Da	Dalton
dC/dt	variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo
DCU	Unidade de Controle do Fermentador
DE	dextrose equivalent

E	etanol (g/L)
EC	extrato de chicória
F	frutose (g/L)
FA	farelo de arroz
FDA	Food and Drug Administration (EUA)
HFCS	High Fructose Corn Syrup
HFS	High Fructose Syrup
HMF	hidroximetilfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	inulina
$K_m$	constante de Michaelis-Menten (mM)
m.s.	matéria seca
$P_{AE}$	produtividade em enzima ( $U.L^{-1}.h^{-1}$ )
PD	Prodex
$P_{esp}$	produtividade específica ( $U.g^{-1}.h^{-1}$ )
$pO_2$	pressão parcial de oxigênio (%)
$P_X$	produtividade em células ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ )
RBU	reference basis units (utilizada pelas indústrias de bebidas para designar COR)
rpm	rotações por minuto
S	concentração de substrato no tempo t (g/L)
$S_0$	concentração inicial de substrato (g/L)
SA	sulfato de amônio
$S_f$	concentração final de substrato (g/L)
t	tempo (h)
U	unidade de inulinase expresso em $1\mu\text{mol}$ de frutose por minuto de reação

UHFGS	Ultra High Fructose Glucose Syrup
Ur	uréia
$V_{\max}$	velocidade máxima de reação ( $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
X	concentração celular ( $\text{g/L}$ )
$X'$	concentração celular correspondente à AE max ( $\text{g/L}$ )
$X_0$	concentração inicial de células ( $\text{g/L}$ )
$X_{\max}$	concentração celular máxima ( $\text{g/L}$ )
YE	Yeast Extract (extrato de levedura)
YNB	Yeast Nitrogen Base
$Y_{P/S}$	fator de conversão de substrato em produto (U de inulinase / g de produto)
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em células (g de células / g de substrato)
$\lambda$	comprimento de onda (nm)
$\alpha, \beta$	percentagens da concentração de saturação em oxigênio no meio
$\mu$	velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\max}$	velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_p$	velocidade específica de formação de produto ( $\text{g.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$\mu_s$	velocidade específica de consumo de substrato ( $\text{g.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

## RESUMO

Tendo em vista que a hidrólise enzimática da inulina pela atuação das exo-inulinas pode produzir um xarope com elevado teor de frutose (até 95%), diversos grupos de pesquisas vêm se dedicando a investigar microrganismos capazes de produzir exo-inulinas e otimizar o processo de produção da enzima.

Baseado nisto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes meios e condições de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 para produção de exo-inulinase. Temperatura, pH, suprimento de oxigênio, composição do meio de cultivo e concentração inicial de substrato foram os parâmetros estudados. Além disto, algumas características da enzima foram também determinadas.

A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 apresentou comportamento estável por pelo menos 4 meses de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A enzima extracelular mostrou-se estável até  $55^{\circ}\text{C}$ , enquanto que a enzima periplasmática apresentou menor estabilidade térmica (até  $45^{\circ}\text{C}$ ). Por outro lado, a temperatura e o pH ótimos de atuação de ambas as enzimas foram semelhantes entre si e equivalentes a  $55^{\circ}\text{C}$  e pH 5,0, respectivamente. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$ , obtidos para a enzima extracelular, foram da ordem de 7,8 mM e  $1,93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente.

*Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi cultivado sob diferentes condições de temperatura (28, 32, 37 e  $45^{\circ}\text{C}$ ), sendo que a faixa compreendida entre 32 e  $37^{\circ}\text{C}$  foi a mais adequada para a síntese de inulinase, onde obteve-se valores de atividade enzimática iguais a 9,65 e 9,40 U/mL, respectivamente. Evolução espontânea do pH a partir do pH natural do meio, assim como pH controlado em 4,5 foram também investigados. O controle do pH proporcionou maior produção de enzima.

Diferentes concentrações iniciais de inulina foram testadas (10, 20, 40 e 60 g/L) e os valores máximos de atividade enzimática volumétrica (9 e 10 U/mL) e específica (1.125 e 1.212 U/mL) foram obtidos para as concentrações de 10 e 20 g/L. Um aumento da concentração de substrato favoreceu a produção de etanol nas condições de fermentação utilizadas.

Diferentes concentrações de bacto peptona (0 a 20 g/L) e extrato de levedura (0 a 10 g/L) foram avaliadas com a finalidade de verificar o efeito desses nutrientes na produção de inulinase. Os resultados revelaram que, apesar do aumento da concentração de bacto peptona

favorecer a síntese da enzima, este não é imprescindível para o crescimento celular. No entanto, a retirada do extrato de levedura do meio de cultivo não permitiu a formação de biomassa e, conseqüentemente, a síntese da enzima. A substituição do bacto peptona por uréia ou sulfato de amônio levou a uma queda no crescimento celular e na atividade enzimática. A mistura Prodex, autolizado de leveduras, e farelo de arroz, foi utilizada como meio alternativo, de baixo custo, para a produção de inulinase. O crescimento celular não foi afetado pela mudança do meio, mas a produção de enzima foi prejudicada, atingindo o valor de 2,2 U/mL em meio contendo 4% farelo de arroz, 1,2% de prodex e 1% de inulina. Estes resultados sugerem que a produção de inulinase por este microrganismo é associada à presença de determinados aminoácidos ou grupos de aminoácidos no meio de cultivo.

Sendo a inulina um substrato de alto custo para a produção comercial de inulinase, o comportamento de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi investigado em meio contendo extrato de chicória como fonte de carbono. Independentemente da adição de sais ao meio de cultivo, o valor da atividade enzimática total não ultrapassou 2,75 U/mL. Neste caso, a síntese da enzima foi prejudicada, provavelmente, devido à presença de substâncias fenólicas formadas durante o processo de extração.

Finalmente, avaliou-se a influência do suprimento de oxigênio no crescimento celular e na atividade inulinolítica. Valores de  $K_L a$  iguais a 21, 36 e 89  $h^{-1}$  foram testados e os resultados mostraram que o aumento do  $K_L a$  favorece a formação de biomassa (7,5, 11,0 e 13,0 g/L respectivamente) e de inulinase (6,5, 6,5 e 8,0 U/mL respectivamente).

## ABSTRACT

Complete hydrolysis of inulin by a single step inulinase reaction, yields a syrup up to 95% of fructose. Therefore, a number of research groups have been investigating the performance of microorganisms able to produce exo-inulinase and trying to optimize the inulinase production process.

In this context, the purpose of this work is to evaluate different culture media and fermentation conditions of the exo-inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.

The effect of temperature, pH, oxygen transfer rate, medium composition and initial inulin concentration was verified. Furthermore, some enzyme kinetics properties were determined.

The activity of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 was maintained stable over 4 months. The extracellular enzyme was stable at temperatures up to 55°C, while the periplasmic enzyme was less stable (up to 45°C). On the other hand, the effect of temperature and pH on the enzyme activity was similar for both enzymes, 55°C and pH 5,0 respectively. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for the extracellular enzyme were found as being 7,8 mM and 1,93 g.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

*Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 was cultivated at different temperature conditions (28, 32, 37 and 45°C). Temperatures between 32 and 37°C were the most suitable for inulinase synthesis. The pH of the medium controlled at 4,5 promoted higher inulinase activity when compared with no pH control.

The influence of initial inulin concentration (10, 20, 40 and 60 g/L) was tested. The highest enzyme activity values were obtained at concentrations below 20 g/L of inulin. Ethanol production increased with increasing initial inulin concentration under these fermentation conditions.

Different concentrations of bacto peptone and yeast extract were used in order to check their effect on inulinase production. As the concentration of bacto peptone increased, a slight increase in the enzyme synthesis and no changes in biomass concentration were observed. On the other hand, yeast extract was absolutely necessary for yeast growth and for enzyme production. When urea or ammonium sulphate were used as nitrogen source instead of bacto peptone, the enzyme activity and cell growth decreased. A mixture of Prodex and rice bran was used as an alternative medium for inulinase production. However, no effect was observed on biomass formation, while inulinase yield was negatively affected. These results suggest that inulinase production is associated to a group of aminoacids or to a specific aminoacid present in the medium.

Based on the high price of inulin, the behaviour of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 was investigated in a culture medium containing chicory extract as inulin source. In this case, the inulinase synthesis was reduced, probably due to phenolic substances formed during the extraction process.

Finally, the influence of the oxygen transfer rate on growth and enzyme activity was investigated.  $K_L a$  values from 21 to 89 h<sup>-1</sup> were tested and the results showed that an increase of  $K_L a$  is favorable to biomass and inulinase formation.

## I. INTRODUÇÃO

Há séculos, o açúcar mais comumente utilizado vem sendo a sacarose, extraída de cana-de-açúcar ou de beterraba. Todavia, devido aos problemas de cariogênese, arteriosclerose e diabetes, causados pela sacarose, inúmeros trabalhos começaram a ser realizados com o objetivo de se produzir açúcares alternativos. Esta busca dos pesquisadores por adoçantes mais saudáveis levou ao aparecimento do xarope de frutose e se constituiu em um marco na indústria de alimentos (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

O desenvolvimento do processo de obtenção do xarope de frutose teve ainda como incentivo econômico as flutuações no preço da cana-de-açúcar e a necessidade de se desenvolver um processo de utilização do amido de milho, matéria-prima abundante na América do Norte (WHITE, 1992). Atualmente, o milho é a matéria-prima mundialmente usada para produção de xarope de frutose, o qual é chamado “High Fructose Corn Syrup” (HFCS). Fontes alternativas de amido, tais como arroz, trigo e batata, são usadas em locais onde essas matérias-primas são mais abundantes e baratas que o milho. Neste caso, o xarope obtido é denominado simplesmente “High Fructose Syrup” (HFS) (WHITE, 1992).

Estes processos têm como base a hidrólise do amido, sendo a glicose o produto final da reação hidrolítica. Esta hidrólise ocorre sob a ação das enzimas termoestáveis  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. A glicose é convertida, pela ação da xilose isomerase, em uma mistura contendo 42% de frutose, 50% de glicose e 8% de outros açúcares. A frutose é, então, seletivamente separada por cromatografia de troca iônica. Este processo, no entanto, só se tornou possível nos anos 60/70 com os avanços das tecnologias de isomerização e separação por cromatografia (WHITE, 1992). Além do baixo rendimento do processo, o controle de pH, temperatura, sólidos e inibidores, assim como a adição de ativadores, se faz necessário em cada uma das etapas, para garantir a eficiência do processo, onerando, porém, os custos de produção (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

Dessa forma, esforços foram realizados no sentido de se obter um xarope com maior concentração de frutose, o que levou à produção do “Ultra High Fructose Glucose Syrup” (UHFGS). Isto foi possível através da reciclagem do xarope de glicose por um reator de xilose isomerase, onde aumenta-se o conteúdo de frutose, elevando-se porém, o conteúdo de oligossacarídeos (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Uma alternativa mais atraente para a produção de frutose ou UHFGS é a hidrólise da inulina pela ação das *exo-inulinases*. A inulina, polímero de frutose com uma unidade de glicose terminal, é encontrada em culturas como alcachofra de Jerusalém, chicória e dália, entre outras. Devido à presença de uma única molécula de glicose na cadeia, a hidrólise completa da inulina exige uma única etapa enzimática e rende um xarope com teor de frutose até 95% (KIM & RHEE, 1989).

As *exo-inulinases*, comumente chamadas apenas de *inulinases*, são enzimas responsáveis pela clivagem da molécula de inulina a partir da extremidade não redutora do polímero, liberando unidades de frutose. Estas enzimas podem ser produzidas por fungos, bactérias e leveduras, sendo que alguns fungos e bactérias produzem uma mistura de *endo* e *exo-inulinases*. Dessa forma, as leveduras têm sido os microrganismos mais estudados para a produção de *exo-inulinases*. Dentre as leveduras, aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces*, principalmente da espécie *Kluyveromyces marxianus*, têm despertado grande interesse industrial devido às suas características fisiológicas e acessibilidade genética (ROUWENHORST, 1990).

Com base nestas evidências, o principal objetivo deste trabalho é a definição das condições de cultivo adequadas para a produção de *exo-inulinase* por uma linhagem pré-selecionada da levedura *Kluyveromyces marxianus*. Para tanto, foi estudado em detalhes:

- ◇ influência da temperatura, pH, suprimento de oxigênio e concentração inicial de substrato;
- ◇ influência da concentração de nutrientes;
- ◇ características cinéticas da enzima.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II. 1 FRUTOSE E XAROPE DE FRUTOSE

A sacarose, obtida a partir de cana-de-açúcar ou de beterraba, é o mais importante dos açúcares, apresentando, porém, alguns aspectos negativos, tais como: é um açúcar cariogênico, contribui para a arteriosclerose, leva à obesidade se consumido em excesso e seu uso não é conveniente para diabéticos (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Dessa forma, a busca de açúcares alternativos tem sido constante nos últimos anos. Adoçantes sintéticos tais como, sacarina, aspartame e Acesulfame K, sem nenhum valor nutritivo, vêm sendo desenvolvidos, mas existe uma tendência para o consumo dos açúcares naturais. Além disso, estes compostos não são produzidos em quantidades suficientes para se avaliar sua aplicabilidade na dieta humana (VANDAMME & DERYCKE, 1983; WHITE, 1992).

Polióis como xilitol (BÄR, 1986) e sorbitol (DWIVEDI, 1986), têm substituído a sacarose em alguns produtos como balas, gomas de mascar e produtos para diabéticos, enquanto que o xarope de frutose encontrou sua principal aplicação na indústria de bebidas (WHITE, 1992).

Nos EUA, houve um crescimento notável no consumo de xarope de frutose (HFCS) nos últimos 15 anos, devido ao alto preço do açúcar no início dos anos 70. A indústria de bebidas, particularmente os refrigerantes, oferece ainda um crescimento potencial (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985; WHITE, 1992). Além disso, a frutose tem demonstrado ser o mais adoçante de todos os açúcares encontrados na natureza (VANDAMME & DERYCKE, 1983; SCHIWECK, 1988; RUMESSEM, 1992; HANOVER, 1992), suscitando o interesse de inúmeros grupos de pesquisa.

## II. 1.1 Propriedades da frutose

Por definição, frutose é uma ceto-hexose, cuja fórmula molecular é  $C_6H_{12}O_6$  e o peso molecular é igual a 180,16 Da. É conhecida também por levulose ou açúcar das frutas, sendo um constituinte freqüente dos oligossacarídeos (inulina ou frutanos) e comum em muitas plantas (RUMESSEM, 1992). A Tabela II.1 mostra os percentuais de glicose e frutose encontrados em alguns produtos naturais.

**TABELA II.1** Percentual de frutose e glicose em vegetais.

	Glicose (%)	Frutose (%)
Maçã	1,1-1,7	6,0-6,1
Banana	5,8	3,8
Amora preta	2,5-3,3	2,2-2,9
Uva	6,8-8,8	7,2-7,8
Pêra	1,0-2,4	6,7-7,0
Cereja (doce)	4,7-6,5	7,2-7,4
Tomate	1,1	1,3
Cenoura	0,25	0,46
Alface	0,85	0,85

*Fonte* : HANOVER, 1992.

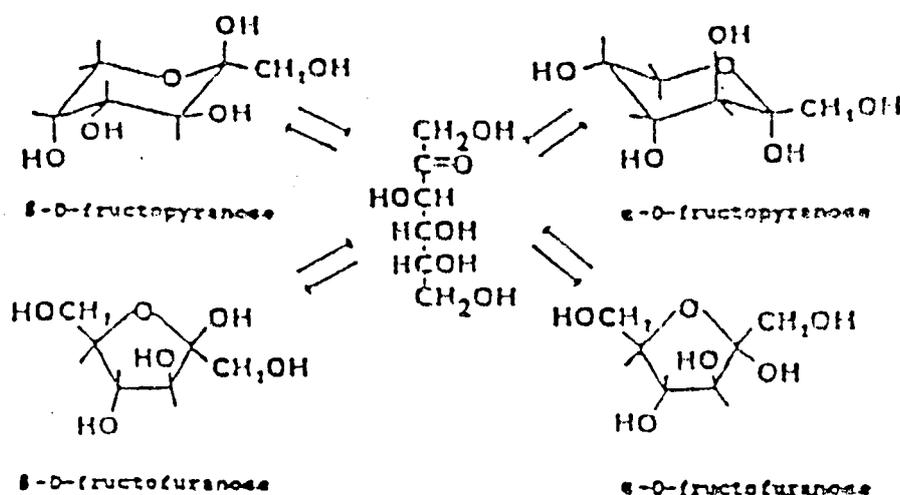
A Figura II.1 mostra as várias formas da D-frutose. Cinco formas isoméricas são conhecidas, incluindo a cadeia aberta. A forma cristalina da frutose é denominada  $\beta$ -D-frutopiranoose. Quando em solução, ela sofre mutarrotação originando outros três tautômeros :  $\alpha$ -D-frutopiranoose,  $\beta$ -D-frutofuranose e  $\alpha$ -D-frutofuranose. O equilíbrio entre estas estruturas é função apenas da temperatura. Sendo que a forma cristalina (pirano) é mais doce que a forma furano e que o aumento de temperatura leva à diminuição do teor de frutofuranose, a utilização da frutose em refrigerantes é de especial interesse (VANDAMME & DERYCKE, 1983; SCHIWECK, 1988; HANOVER, 1992).

A Tabela II.2 apresenta o poder adoçante de diversos açúcares comparados com o da sacarose, onde pode-se observar que a frutose é 1,5 a 2 vezes mais doce que a sacarose e 2 a 3 vezes mais doce que a glicose (VANDAMME & DERYCKE, 1983; HANOVER, 1992).

Além do mais, a frutose apresenta várias vantagens sobre os açúcares convencionais para o consumo humano.

O seu alto poder adoçante leva à produção de alimentos e bebidas com menor teor calórico (produtos dietéticos), indicados no controle de peso em obesos (SCHIWECK, 1988). É menos cariogênica que a sacarose, pode mascarar o sabor amargo deixado pela sacarina e pode, ainda, ser utilizada por diabéticos (VANDAMME & DERYCKE, 1983; SCHIWECK, 1988; HANOVER, 1992). A frutose é mais solúvel e higroscópica que a sacarose e, conseqüentemente, mais difícil de cristalizar (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

A frutose é usada ainda na nutrição de atletas. Devido à baixa elevação pós prandial do nível de açúcar no sangue após a ingestão da frutose, ou de alimentos contendo frutose, o nível de açúcar no sangue permanece praticamente constante, assegurando um suprimento ótimo de energia ao organismo, especialmente em casos da prática de esportes (SCHIWECK, 1988).



**FIGURA II.1** Formas tautoméricas da D-frutose em solução.

**TABELA II.2** Poder adoçante de diferentes açúcares.

Açúcar	Poder adoçante*
Frutose	120-180
Sacarose	100
Xarope de frutose (55% de frutose)	99
Xarope de frutose (42% de frutose)	92
Dextrose	60-70
Sorbitol	60
Xilose	70
Xilitol	90
Lactose	16-30
Xarope 63 DE	45
Xarope 42 DE	30

\* Valores referentes à sacarose (100%). *Fonte* : HANOVER, 1992.

A hidrogenação catalítica da frutose produz manitol como principal produto. Este poliálcool é um adoçante valioso pois não é higroscópico nem cariogênico e apresenta baixo teor de caloria (FUCHS, 1989). A partir de frutose, pode-se também obter alquil-frutósídeos de cadeia longa. Estes, além de serem biodegradáveis, podem ser utilizados como agentes surfactantes não tóxicos (Laloux, 1992).

A frutose participa de um fenômeno conhecido como sinergismo, complementando o poder adoçante de outros açúcares em formulações. Quando isto acontece, o sabor doce percebido da mistura dos adoçantes é maior do que o sabor obtido individualmente. Isto permite uma ampla aplicabilidade da frutose cristalina em produtos como: cereais, bebidas carbonatadas ou não, produtos de panificação, iogurtes, achocolatados, confeitarias, gelatinas, etc (HANOVER, 1992).

### **II.1.2 Metabolismo da frutose**

A frutose consumida via oral é absorvida por difusão no intestino delgado em velocidade menor que a sacarose ou a glicose, porém mais rapidamente que os polióis sorbitol, xilitol e manitol (SCHIWECK, 1988).

A frutose é primeiramente metabolizada no fígado e as etapas iniciais são independentes da insulina. No fígado, uma frutoquinase específica converte frutose em frutose-1-fosfato que é, então, clivada em duas trioses. Estas são utilizadas por diferentes vias metabólicas dependentes da insulina. Em pessoas saudáveis, a maior parte da frutose (depois da conversão à glicose) é estocada no fígado e nas células musculares na forma de glicogênio. Isto explica porque a ingestão de frutose é seguida por um ligeiro aumento do nível de glicose no sangue e da secreção de insulina. Devido à absorção lenta, transporte direto para o fígado e rápida metabolização, a frutose é adequada como carboidrato para diabéticos (SCHIWECK, 1988).

### **II.1.3 Produção, propriedades e aplicações do xarope de frutose**

O xarope de frutose assumiu uma posição proeminente na dieta humana como nenhum outro açúcar desde a substituição do mel de abelha pela sacarose (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985; WHITE, 1992).

A matéria-prima mais utilizada mundialmente para produção de xarope de frutose é o milho. O xarope de frutose derivado especificamente do amido de milho é chamado de HFCS (High Fructose Corn Syrup), enquanto que o xarope proveniente de outras fontes é denominado HFS (High Fructose Syrup) (WHITE, 1992).

Inicialmente, o processo de obtenção do xarope de frutose envolvia a utilização de ácidos minerais para hidrolisar o amido, gerando um produto de baixa qualidade e sabor estranho. Em 1940, Dale e Langlois obtiveram uma patente pelo desenvolvimento de um processo de hidrólise ácida-enzimática, o que significou grandes melhoras na conversão de amido em xarope (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985; WHITE, 1992). A descoberta, isolamento e aplicação de várias enzimas carboidrases no processo de hidrólise, resultaram no desenvolvimento de novos xaropes derivados do amido. Estas enzimas, principalmente  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, usadas isoladamente, em seqüência ou em combinações, permitiram a produção de uma gama de composições de

xaropes com diferentes propriedades, conforme mostra a Tabela II.3 (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985; WHITE, 1992).

**TABELA II.3** Propriedades Físicas e Químicas do xarope de frutose (HFS).

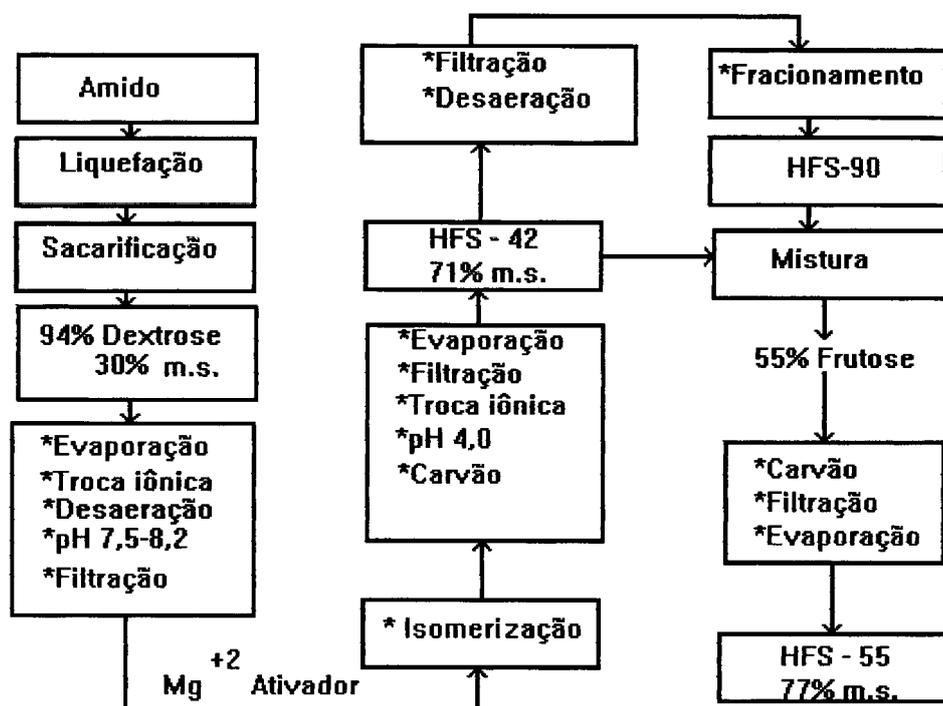
Composição e Propriedades	HFS (% frutose)				
	42	55	80	90	95
Dextrose (%)	53	41	18	9	4
Frutose (%)	42	55	80	90	95
Oligossacarídeos(%)	5	4	2	1	1
Sólidos (%)	71	77	77	77	77
Umidade (%)	29	23	23	23	23
pH	4,0	4,0	3,5	3,5	3,5
Cinzas (%)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Cor RBU max	25	25	35	35	25
Poder adoçante *	92	99		106	
Densidade 20°C (Kg/L)	1,346	1,384	1,384	1,407	1,385
Sólidos, (Kg/L)	0,955	1,065	1,065	1,125	1,067
Viscosidade 27°C, (cP)	160	800	600		575

\* Referente a sacarose (100%) a 10% m.s. e temperatura ambiente.

*Fonte:* WHITE, 1992.

A Figura II.2 apresenta o fluxograma do processo de obtenção do xarope de frutose a partir de amido. O amido é hidrolisado à glicose em um processo multi-estágio, envolvendo as enzimas termoestáveis  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase (etapa de sacarificação) e, então, convertido pela ação da enzima imobilizada D-(+)-xilose isomerase em uma mistura contendo 42% de frutose, 50% de glicose e 8% de outros açúcares (VANDAMME & DERYCKE, 1983; COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985). Com o intuito de obter produtos com níveis mais elevados de frutose, é necessário concentrar seletivamente a frutose. Técnicas comuns de separação (utilização de carvão

ativo ou óxido de ferro) não são aplicáveis neste caso, uma vez que estas não diferenciam os dois isômeros de mesmo peso molecular (glicose e frutose) (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).



**FIGURA II.2** Representação esquemática do processo de obtenção do xarope de frutose a partir do amido.

No entanto, a frutose forma preferencialmente um complexo com cátions, como o  $\text{Ca}^{++}$ . Este fato foi explorado comercialmente para desenvolver processos e combinar esta propriedade da frutose com tecnologias de separação, como por exemplo, a separação por troca iônica (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985). Uma vez definido o processo de separação, a frutose passou a ser seletivamente separada por cromatografia de troca iônica, resultando em xaropes com até 90% de frutose, tendo como resíduo um xarope de glicose com uma pequena fração de frutose e outros oligossacarídeos (VANDAMME & DERYCKE, 1983). Reciclando-se o xarope de glicose através do reator de xilose isomerase, o teor em frutose é aumentado, mas também o conteúdo de oligossacarídeos (VANDAMME & DERYCKE, 1983). Este xarope com alto teor de frutose é conhecido como

UHFGS (Ultra High Fructose Glucose Syrup). O processo de mistura dos xaropes contendo 42% e 90% em frutose é realizado para obtenção de produtos com outros teores de frutose e dextrose. As etapas do processo são ligadas por uma série de operações unitárias, necessárias para manter a integridade das enzimas, resinas de troca iônica e produtos (WHITE, 1992).

O xarope contendo 42% de frutose predominou comercialmente desde a sua introdução no mercado em 1967 até 1982. Sua maior aplicação ocorria no setor alimentício, em produtos que fazem uso de um adoçante líquido. No período compreendido entre 1980 e 1983, houve um crescimento acentuado do uso de xaropes mais concentrados (55% de frutose). O desenvolvimento desta segunda geração de xaropes com níveis de frutose mais elevados estendeu suas possibilidades de aplicação em muitos produtos. Isto ocorreu, particularmente, com a substituição da sacarose pelo HFCS com 55% de frutose em refrigerantes. A partir daí, muitos fabricantes passaram a produzir xaropes com teor de frutose elevado (80 a 95% de frutose). O xarope contendo 90% de frutose encontrou uma ampla aplicação na indústria alimentícia, especialmente como adoçante para produtos de baixo teor calórico e de elevado poder adoçante, tais como geléias e gelatinas (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985), estimulado ainda por suas propriedades funcionais, que permitiram a sua aplicação em vários setores industriais. Dentre estas propriedades estão o alto poder adoçante, viscosidade, higroscopicidade, fermentabilidade, desenvolvimento de cor e aromas e propriedades coligativas (WHITE, 1992).

A aplicação do xarope de frutose abrange ainda, uma ampla faixa de produtos e setores industriais, tais como os descritos a seguir (WHITE, 1992):

- \* bebidas alcoólicas e destiladas
- \* bebidas não alcoólicas
- \* ração animal
- \* cereais
- \* bolos, biscoitos, pães e outros produtos de panificação

\* fármacos, produtos fermentados, “shampoos”, solventes orgânicos, xaropes medicinais, etc.

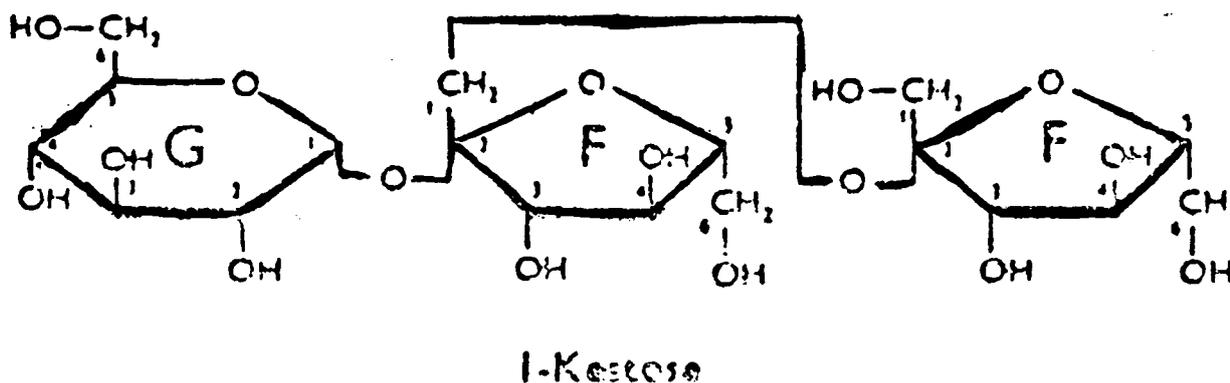
Com este amplo espectro de aplicações, acredita-se que o açúcar convencional continue a ser substituído pelo xarope de frutose, particularmente no setor de alimentos processados. Torna-se, então, necessário baratear os custos de produção, o que pode ser obtido através da redução do número de operações unitárias envolvidas no processo. Para tanto, uma alternativa atraente para a produção de xarope de frutose é a hidrólise química ou enzimática da inulina (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

## II.2 INULINA

### II.2.1 Propriedades

A inulina é um polímero de origem vegetal que serve como carboidrato de reserva de várias plantas, particularmente de exemplares das famílias *Compositae* e *Gramineae*. Dentre estes, destacam-se a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.), a chicória (*Cichorium intybus* L.), a dália (*Dahlia pinnata* cav.) e o dente de leão (*Taraxacum officinale*) (VANDAMME & DERYCKE, 1983; RUMESSEM, 1992). Além destas plantas, pode-se citar ainda o agave (*Agave azul tequilana*), que apresenta aplicação industrial. Embora as inulinas sejam principalmente de origem vegetal, existem frutanos do tipo inulina de origem fúngica e bacteriana (FUCHS *et al.*, 1985).

A inulina é formada de resíduos de D-frutose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -2,1, com um resíduo terminal de glicose, o qual está ligado à frutose por uma ligação glicosídica  $\alpha$ -1,2 (RUMESSEM, 1992). A fórmula estrutural da inulina se encontra representada na Figura II.3.



**FIGURA II.3** Fórmula estrutural da molécula de inulina.

Teoricamente, a inulina deve conter no mínimo 30 unidades de açúcar, podendo chegar até 50 unidades (RUMESSEM, 1992), enquanto que nas levanas (polímeros de frutose unidos por ligações  $\beta$ -2,6), o grau de polimerização pode exceder a 100. O comprimento médio da cadeia de inulina varia em função da planta e da estação do ano. Segundo BACON & LOXLEY, citados por VANDAMME & DERYCKE (1983), durante a estocagem dos tubérculos de alcachofra de Jerusalém ou das raízes de chicória ou dente de leão, ocorre uma queda no grau de polimerização da inulina. O mesmo fenômeno foi observado por WHISTLER & SMART (1953) após estocagem de tubérculos de alcachofra de Jerusalém. Além disto, os autores verificaram que os tubérculos contém cerca de 65% de inulina no verão, mas esta concentração começa a decrescer quando as folhas caem no outono, atingindo o valor de 55% no inverno. GUPTA *et al.* (1989), relataram que a concentração de frutose livre aumenta consideravelmente nas raízes de chicória colhidas no estágio de maturação, diminuindo o teor de inulina. Por outro lado, os autores afirmam que as raízes colhidas na época do pré-florescimento, apresentam uma composição em inulina mais elevada. Este fenômeno é, provavelmente, resultado da ação da atividade inulinolítica da própria planta.

Devido a esta grande variação no comprimento da cadeia, o peso molecular da inulina varia geralmente entre 3.500 e 5.500 Da (VANDAMME & DERYCKE, 1983), podendo alcançar 6.000 Da (ZITTAN, 1981; FUCHS *et al.*, 1985). Por outro lado, as inulinas produzidas por microrganismos têm maior peso molecular ( $\sim 2 \cdot 10^7$  Da) (FUCHS *et al.*, 1985).

A inulina pura é praticamente insolúvel em água fria, mas pode ser facilmente dissolvida em água quente. A hidrólise da inulina pode ser feita em meio ácido (pH 1-2), após 2 horas de incubação à temperatura de 80 a 100°C, levando, no entanto, à formação de difrutosedianidrido, sub-produto indesejado, e coloração, que reduzem a qualidade do produto e o rendimento em frutose (ZITTAN, 1981).

## II.2.2 Utilização industrial

Apesar da presença da inulina em numerosas mono e dicotiledôneas, poucas espécies contêm uma quantidade de frutanos que permite a utilização de uma técnica rentável de extração. Isto explica, em grande parte, porque os frutanos não são utilizados como matéria-prima em nível comparável ao amido. A inulina deve ser considerada, não apenas uma fonte potencial de frutose cristalina ou de xarope com alto teor de frutose, mas também um insumo em setores não-alimentícios (FUCHS, 1989; LALOUX, 1992).

No México, 20.000 ha de agave, em média, são cultivados para produção de tequila uma bebida alcoólica obtida pela destilação do suco de agave fermentado. A inulina do suco é fermentada a etanol pelos microrganismos presentes naturalmente na planta, provavelmente leveduras do gênero *Kluyveromyces* (LALOUX, 1992).

A Tabela II.4 apresenta as três classes de transformação da molécula de inulina: transformação sem hidrólise prévia (II.2.2.1), com hidrólise parcial (II.2.2.2) e com hidrólise total (II.2.2.3).

**TABELA II.4** Transformações químicas e microbianas da inulina e suas aplicações.

	Transformação	Produto/Aplicação
II.2.2.1 sem hidrólise	a. sem modificação	utilização médica ou alimentar
	b. conjugação	utilização médica
	c. ciclização	cicloinulo-oligossacarídeos
	d. derivatização	policarboxilatos
	e. hidrogenação	glicerol
II.2.2.2 com hidrólise parcial	hidrólise limitada	fruto-oligossacarídeos
II.2.2.3 com hidrólise total	a. fermentação microbiana	etanol e outros
	b. desidratação	hidroximetilfurfural
	c. desidratação/reidratação	ácido levulínico
	d. sem modificação	xarope de frutose

*Fonte:* FUCHS, 1989.

### **II.2.2.1 Transformações da inulina sem hidrólise prévia**

a. A inulina de alto peso molecular não pode ser metabolizada pelos animais sem hidrólise prévia, uma vez que estes não dispõem da enzima inulinase no organismo. Por mais de meio século, a inulina vem sendo utilizada em testes para diagnosticar a função renal. Atualmente, é utilizada, principalmente, no controle de qualidade de membranas dialisadas em rins artificiais. A inulina começa também a ser utilizada como fibra, sendo incorporada em alimentos como chocolate e praliné ou em cosméticos (FUCHS, 1989).

b. Drogas à base de inulina têm sido utilizadas na cura de doenças urogenitais (FUCHS, 1989).

c. KAWAMURA & UCHIAYAMA. (1989) relataram a formação de cicloinulo-oligossacarídeos a partir de inulina, através de uma reação intramolecular de transfrutossilação por uma enzima extracelular de *Bacillus circulans*. Todavia, até o momento, não há menção do potencial de aplicação dos ciclo-oligossacarídeos.

d. Comparativamente ao amido, a inulina é sujeita a várias modificações e derivações. Sendo assim, a oxidação da inulina forma um policarboxilato apresentando a propriedade de complexar o cálcio, íon que poderá ser substituído pelo fosfato na química de produção dos detergentes (LALOUX, 1992).

e. Em 1967, Van Ling mostrou que a hidrogenação da inulina produzia glicerol, 1,2-propanodiol e glicol, que têm aplicação na indústria química (FUCHS, 1989).

### **II.2.2.2 Transformações da inulina por hidrólise parcial**

Fruto-oligossacarídeos com grau de polimerização até 5 têm sido comercializados sob o nome de Neosugar. Estes fruto-oligossacarídeos sintéticos contém 2 a 4 resíduos de frutose ligados a uma molécula de glicose e são atualmente produzidos a partir da sacarose, através de uma reação de transfrutossilação, utilizando a enzima fúngica frutossiltransferase (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991). Todavia, segundo os autores, estes açúcares podem ser obtidos com maior grau de pureza a partir da inulina, pela ação de endo-inulinases. Este adoçante não é metabolizado, mas é seletivamente utilizado por bifidobactérias no intestino grosso. Estudos clínicos têm mostrado que a administração de fruto-oligossacarídeos contribui para a microflora intestinal, causando alívio da constipação, melhorando a composição lipídica do sangue e suprimindo a produção de substâncias putrefativas no intestino, tanto de animais como do homem (HIDAKA *et al.*, 1986).

### II.2.2.3 Transformações da inulina por hidrólise total

a. Devido à degradação da inulina por numerosos microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), diferentes tipos de fermentação microbiana são conhecidos. Muitas das espécies de leveduras, não apenas hidrolisam inulina a frutose como também são capazes de fermentar o monômero a etanol (GUIRAUD *et al.*, 1981; DUVNJAK *et al.*, 1981). Por isso, nos últimos anos, o interesse pela produção de etanol a partir de inulina, usando estas espécies, aumentou consideravelmente (ECHEVERRIGARAY & TAVARES, 1985; BOURGI *et al.*, 1986). Segundo FUCHS (1989), com base nos dados de produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* e dados de produção de alcachofra de Jerusalém e chicória, um potencial de produção de mais de 6.000 litros de etanol por hectare cultivado por ano é possível. Isto significa que se a produção de etanol se tornar economicamente viável, estas culturas contendo inulina competirão com a maioria das culturas utilizadas industrialmente.

Ácido glicônico e sorbitol foram simultaneamente produzidos a partir de glicose e inulina (alcachofra de Jerusalém) usando glicose-frutose oxidorreductase de *Zymomonas mobilis* e inulinase (KIM & KIM, 1992). Estes produtos encontram aplicação na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica.

b. Um dos produtos mais versáteis de conversão da frutose é o 5- hidroximetilfurfural (HMF), que se forma pela desidratação da inulina sob aquecimento ou da frutose em meio ácido. O HMF é um composto chave da química dos furanos e apresenta, assim como seus derivados, um potencial interessante na indústria de detergentes e de cristal líquido (FUCHS, 1989).

c. Por subsequente reidratação do HMF, forma-se ácido levulínico, que também pode ser transformado, entre outros compostos, em poliésteres e poliamidas (FUCHS, 1989).

d. Devido à presença de uma única molécula de glicose na cadeia de inulina, a hidrólise completa produz um xarope com até 95% de frutose (KIM & RHEE, 1989). Este fato poderá permitir a fabricação do xarope de frutose a partir de inulina, em concorrência com a produção de xarope com alto teor de frutose (UHFGS) a partir do amido. Conforme descrito anteriormente, a hidrólise química da inulina a frutose apresenta certas desvantagens, como o aparecimento de difrutosedianidrido (sub-produto indesejável), formação de cor e odor, justificando, portanto, a utilização da hidrólise enzimática pelas inulinases microbianas (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

### **II.3 INULINASE (2-1 $\beta$ -D-FRUTOFRUTANOHIDROLASE EC 3.2.1.7)**

Muitas inulinases capazes de hidrolisar a inulina têm sido descritas na literatura, sendo encontradas em raízes e tubérculos de plantas que contêm inulina (CLAESSENS *et al.*, 1990) e em diversas espécies microbianas (GROOTWASSINK & HEWITT, 1983; VULLO *et al.*, 1991).

As enzimas hidrolíticas podem ser classificadas, de acordo com seu modo de ação, como endo ou exo enzimas. Neste contexto, as inulinases também são classificadas como endo-inulinases e exo-inulinases, resultando, de sua ação sobre a inulina, oligômeros de frutose ou apenas frutose, respectivamente (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

As exo-inulinases desempenham um importante papel na hidrólise da inulina, uma vez que elas separam as moléculas de frutose a partir do terminal não redutor da cadeia de inulina, quebrando as ligações  $\beta$ -2,1. A liberação da frutose ocorre segundo um mecanismo em cadeia, sob uma ampla faixa de pH e temperatura (GUIRAUD & GALZY, 1989).

Como algumas inulinases microbianas apresentam atividade sobre a sacarose, elas se assemelham à invertase (ROUWENHORST, 1990). No entanto, as invertases apresentam fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose (SNYDER & PHAFF, 1960; GROOTWASSINK & FLEMING, 1980; GROOTWASSINK & HEWITT, 1983; FUCHS *et al.*,

1985). Para distinguir invertase de inulinase, utiliza-se uma relação S/I (atividade relativa sobre sacarose e inulina), que é calculada da seguinte forma:

$S/I = \text{unidades totais de atividade invertase} / \text{unidades totais de atividade inulinolítica}$ .

Valores de S/I para invertase são elevados, enquanto que baixas relações ( $S/I < 50$ ) indicam que a enzima em questão é inulinase (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

### **II.3.1 Características das exo-inulinasas**

#### **II.3.1.1 Estabilidade com o tempo**

A estabilidade da inulinase contida em células livres e imobilizadas de *Kluyveromyces marxianus*, em relação ao tempo, foi determinada por BAJPAI & MARGARITIS (1985) à temperatura ambiente e a 4°C, pela realização periódica do teste de atividade enzimática. A 4°C não houve perda da estabilidade por um período de 30 dias e, à temperatura ambiente, apenas 6% da atividade original foi perdida.

EFSTATHIOU *et al.* (1986) avaliaram a estabilidade da inulinase solúvel, não dialisada, de *Clostridium acetobutylicum* com o tempo e verificaram que a enzima perdeu rapidamente a atividade a 4°C ou - 20°C. Todavia, ela manteve-se estável por vários meses a 4°C, em presença de tampão acetato 0,1M, pH 5.0.

Segundo MANZONI & CAVAZZONI (1988), as enzimas brutas provenientes de *Candida kefyr*, *Candida pseudotropicalis var lactosa*, *Kluyveromyces cicerisporus* e *Kluyveromyces fragilis* se mostraram estáveis por, pelo menos, 5 meses a - 20°C. A 10°C, a estabilidade foi totalmente mantida por, pelo menos, 1 mês.

#### **II.3.1.2 Estabilidade com a temperatura**

De um modo geral, há um consenso na literatura quanto à manutenção da estabilidade da enzima em temperaturas mais altas (por volta de 50°C). Esta característica é de grande interesse industrial, uma vez que os riscos de contaminação em reatores são

diminuídos e a solubilidade do substrato inulina é aumentada (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Segundo SNYDER & PHAFF (1960), testes preliminares mostraram que a inulinase de *Saccharomyces fragilis* é razoavelmente estável a 50°C e rapidamente destruída a 70°C. Os dados mostram, também, que tanto a enzima intracelular quanto a extracelular apresentam o mesmo comportamento.

NEGORO & KITO (1973a), estudando a estabilidade da inulinase intracelular de *Candida kefyr*, concluíram que, após incubação da enzima por 10 minutos em diferentes temperaturas, esta se mantém estável até 55°C, perdendo rapidamente a atividade em temperaturas acima de 60°C.

Inulinases extracelulares de *C. kefyr* e *C. pseudotropicalis*, estudadas por MANZONI & CAVAZZONI (1988), apresentaram boa estabilidade a 45 e 50°C, respectivamente.

Nenhuma perda na atividade foi observada por ROUWENHORST *et al.* (1988), quando inulinases (intracelular, extracelular e ligada à parede) de *K. marxianus* CBS 6556 foram incubadas por 8 horas a temperaturas de até 50°C. Incubação em temperaturas mais elevadas levou à inativação das enzimas.

GUPTA *et al.* (1994a) avaliaram a estabilidade da inulinase (bruta, purificada e imobilizada) obtida de *K. fragilis*. A inulinase bruta foi a mais estável para as diferentes temperaturas testadas (25, 50, 55 e 60°C). Diferentemente, KIM & RHEE (1989) estudaram a estabilidade térmica da exo-inulinase imobilizada e solúvel de *Aspergillus ficuum*, mantendo as enzimas incubadas por 5 horas na faixa de temperatura entre 5 e 70°C. A primeira permaneceu estável até 40°C, decrescendo em temperaturas mais elevadas. A inulinase solúvel, porém, revelou ser ligeiramente menos estável do que a enzima imobilizada.

Exo-inulinase intracelular de *Scytalidium acidophilum* manteve-se estável em até 6 horas de incubação a 60°C e 65°C (KIM *et al.*, 1994). Segundo UHM *et al.*, citado por KIM *et al.*, (1994) dentre as inulinases, apenas a inulinase de *Aspergillus niger* poderia manter

42% da sua atividade original após 6 horas de incubação a 65°C. Todavia, a atividade residual obtida para inulinase de *S. acidophilum* foi de 95% a 60°C e de 85% a 65°C, significando que, do ponto de vista da estabilidade térmica, a inulinase de *S. acidophilum* parece ser a mais estável entre as inulinasas até então estudadas.

### **II.3.1.3 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática (Temperatura ótima)**

De acordo com o trabalho de ROUWENHORST *et al.* (1988), independentemente da localização da enzima (intracelular, extracelular ou periplasmática) ou do processo fermentativo, a temperatura ótima para atividade da inulinase de *K. marxianus* CBS 6556 sobre inulina é de 50°C. O mesmo resultado foi obtido com inulinase intracelular produzida por *Candida kefir* (NEGORO & KITO, 1973a) e inulinase extracelular, com ação endo e exo, de *Chrysosporium pannorum* (XIAO *et al.*, 1988).

No estudo para determinação da temperatura ótima de atuação da inulinase de *K. fragilis*, GUPTA *et al.* (1994a) observaram que a hidrólise máxima da inulina ocorre a 55°C, utilizando inulinase bruta, purificada ou imobilizada. Já MANZONI & CAVAZZONI (1988), ao estudarem o comportamento da inulinase extracelular de quatro leveduras (*C. kefir*, *C. pseudotropicalis var lactosa*, *K. cicerisporus* e *K. fragilis*), constataram que a temperatura ótima para a atividade da enzima foi, em todos os casos, de 60°C. A 65°C, apenas 50% da atividade foi mantida.

A temperatura ótima para atividade da inulinase dos fungos *Panaeolus papillonaceus* (MUKHERJEE & SENGUPTA, 1985), *A. ficuum* (KIM & RHEE, 1989) e *Cladosporium cladosporioides* (FERREIRA *et al.*, 1991) varia entre 50 e 60°C. Por outro lado, para *Fusarium oxysporum*, GUPTA *et al.* (1990) observaram que a temperatura ótima para ação das enzimas livre e imobilizada é de 37°C e 45°C, respectivamente.

### **II.3.1.4 Efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH ótimo) e estabilidade com pH**

A Tabela II.5 apresenta alguns valores de pH ótimo de atuação da inulinase encontrados na literatura para diferentes microrganismos, evidenciando uma faixa de pH

ótimo entre 4,5 e 5,5. Estes baixos valores de pH são de grande interesse industrial, pois diminuem os riscos de contaminação microbiana e, no caso do preparo de xaropes, reduzem a formação de cor, característica indesejável neste produto (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Pode-se observar ainda, na Tabela II.5, as faixas de estabilidade da enzima com o pH. Nestes casos, a estabilidade da inulinase foi avaliada após incubação da enzima em diferentes valores de pH (valores entre parênteses), por um determinado tempo e temperatura, sem substrato. Decorrido o tempo estabelecido, foi medida a atividade residual no valor de pH ótimo.

### **II.3.1.5 Velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) e Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )**

Segundo VANDAMME & DERYCKE (1983), há algumas dificuldades na interpretação de  $K_m$ . Uma determinação precisa do valor de  $K_m$ , expresso em termos de molaridade (mM), é prejudicada porque a inulina não tem peso molecular definido e ainda, porque durante a reação, o comprimento da cadeia de inulina muda, tornando-se sempre menor. Além disto, a solubilidade limitada e a natureza polidispersa da inulina impedem uma determinação confiável (GROOTWASSINK & FLEMING, 1980). Para contornar estes problemas, estes autores utilizaram oligossacarídeos com crescentes graus de polimerização para obtenção das constantes de afinidade para a inulinase de *K. marxianus* ATCC 12424. Sacarose, rafinose e estaquiose (di,tri e tetrassacarídeos, respectivamente) foram usados como substratos para determinação de  $K_m$ , segundo método de Lineweaver-Burk. Um aumento no comprimento da cadeia do substrato aumentou drasticamente o valor de  $K_m$  para invertase (47, 69 e 286 mM) respectivamente, enquanto que para inulinase,  $K_m$  permaneceu relativamente constante (9,4, 6,1 e 6,8 mM). Utilizando o método de Hanes, ROUWENHORST *et al.* (1988) verificaram que, para inulinase de *K.marxianus* CBS 6556, o valor de  $K_m$  é

**TABELA II.5** Valores de pH ótimo e faixas de estabilidade com o pH para inulinase de diferentes microrganismos.

Microrganismo	Tipo de enzima	pH ótimo	Incubação sem substrato (estabilidade)		Referência
			pH	Condições (t, T)	
<b>Leveduras</b>					
<i>S. fragilis</i>	intra/extracelular	5.0-5.2			SNYDER & PHAFF, (1960)
<i>K. marxianus</i>	intra/extracelular	4.8-5.2			ROUWENHORST <i>et al.</i> (1988)
<i>K. fragilis</i>	bruta, purif./imob	5.5			GUPTA <i>et al.</i> (1994a)
<i>C. kefir</i>	extracelular	4.7			MANZONI & CAVAZZONI (1988)
<i>C. kefir</i>	intracelular	4.5	3.8-8.0 (2.0-9.0)	(17 h-30°C)	NEGORO & KITO (1973a)
<b>Bactérias</b>					
<i>C. acetobutylicum</i>	purificada	4.6			EFSATHIOU <i>et al.</i> (1986)
<b>Fungos</b>					
<i>C. pannorum</i>	extracelular	5.5-5.6	4.5-7.0 (3.2-8.0)	(24 h-30°C)	XIAO <i>et al.</i> (1988)
<i>F. oxysporum</i>	imobilizada	6.0			GUPTA <i>et al.</i> (1990)
	extracelular	6.2			GUPTA <i>et al.</i> (1988)
	micelial	5.8			
<i>P. papillonaceus</i>	extracelular	6.5			MUKHERJEE & SENGUPTA (1985)
<i>P. purpurogenum</i>	endo-inulinase	5.1	5.0-7.5 (2.0-12.0)	(24 h-4°C)	ONODERA & SHIOMI (1988)
<i>A. ficuum</i>	imobilizada	4.5			KIM & RHEE (1989)
<i>A. ficuum</i>	exo-inulinase	4.5			ZITTAN (1981)

menor para os oligossacarídeos rafinose (8,2 mM) e estaquiose (9,7 mM) em relação à sacarose (15,7 mM). Os autores comentam que a cinética da enzima é independente da sua origem. Não foram observadas diferenças entre a cinética de atuação das enzimas contida no sobrenadante, ligada à parede ou intracelular.

GUPTA *et al.* (1994a) definiram valores de  $K_m$  para a inulinase imobilizada de *K. fragilis*, tendo inulina como substrato, entre 0,54-0,67 mmol/L. A inulinase bruta forneceu um valor de  $K_m$  da ordem de 1,7 mmol/L.

Outros valores de  $K_m$  sobre inulina, encontrados na literatura são 0,012 mM para *C. acetobutylicum* (EFSTATHIOU *et al.*, 1986), 8 mM para *Bacillus subtilis* (VULLO *et al.*, 1991) e 11-16,7  $\mu$ mol/L para *F. oxysporum* (GUPTA *et al.*, 1988).

#### II.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE INULINASE

A possibilidade de utilização da inulina, como fonte alternativa para produção de frutose, incentivou a seleção de microrganismos capazes de produzir inulinase. Inulinases com atividade  $\beta$ -fructosidase são encontradas em fungos (NAKAMURA *et al.*, 1978; GUPTA *et al.*, 1988; XIAO *et al.*, 1988; FERREIRA *et al.*, 1991), leveduras (GROOTWASSINK & HEWITT, 1983; PAREKH & MARGARITIS, 1985; TSANG & GROOTWASSINK, 1988; MANZONI & CAVAZZONI, 1988; MANZONI & CAVAZZONI, 1992; HENSING *et al.*, 1994) e bactérias (EFSTATHIOU *et al.*, 1986; ALLAIS *et al.*, 1986; VULLO *et al.*, 1991).

Ao contrário das inulinases isoladas de tubérculos e raízes de plantas, que não apresentam atividade em invertase (VANDAMME & DERYCKE, 1983), as inulinases provenientes de microrganismos como leveduras (SNYDER & PHAFF, 1960; ROUWENHORST *et al.*, 1988), bactérias (EFSTATHIOU *et al.*, 1986; ALLAIS *et al.*, 1986) e fungos (MUKHERJEE & SENGUPTA, 1985; XIAO *et al.*, 1988) apresentam uma notável atividade sobre sacarose. As inulinases microbianas também podem diferir no tipo de atividade. A inulinase de *Arthrobacter ureafaciens* hidrolisa inulina em di-D-

fructofuranose-1,2',3'-dianidrido e pequenas quantidades de outras unidades oligoméricas (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

#### II.4.1 Bactérias

Um grande número de bactérias é conhecido pela capacidade de fermentar inulina e/ou levanos, utilizar estes polímeros de frutose como única fonte de carbono e energia para crescimento e produzir enzimas que os degradam. Espécies pertencentes aos gêneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Eubacterium*, *Clostridium* e *Klebsiella* são conhecidas como espécies capazes de crescer ou fermentar inulina (FUCHS *et al.*, 1985).

#### II.4.2 Fungos Filamentosos

Dentre os fungos, lista-se um grande número de espécies capazes de produzir inulinase. No entanto, neste caso, as enzimas produzidas podem ser exofrutanases e/ou endofrutanases. As inulinases de *Aspergillus niger*, por exemplo, formam predominantemente inulotriose, inulotetose e inulopentose e, praticamente, não apresentam ação hidrolítica sobre pequenos oligômeros (VANDAMME & DERYCKE, 1983). *Aspergillus* (NAKAMURA *et al.*, 1978; ETTALIBI & BARATTI, 1990; CARNITI *et al.*, 1991), *Penicillium* (VANDAMME & DERYCKE, 1983), *Fusarium* (GUPTA *et al.*, 1988; KAUR *et al.*, 1992) e *Rhizopus* (VANDAMME & DERYCKE, 1983) são alguns exemplos de fungos capazes de produzir inulinase.

#### II.4.3 Leveduras

Segundo BARNETT *et al.*, citados por ROUWENHORST (1990), das 469 espécies de leveduras descritas, apenas dez espécies, divididas em 7 gêneros (*Debaromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Schizosaccharomyces*), são capazes de metabolizar a inulina. Ao contrário das bactérias, as leveduras parecem ter um padrão enzimático muito restrito, uma vez que todas as enzimas de leveduras, até

então examinadas, são exofrutanasas com atividade tanto inulinase quanto levanase (FUCHS *et al.*, 1985).

Dentre as leveduras produtoras de exo-inulinasas, as do gênero *Kluyveromyces* têm apresentado bom desempenho. A levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi selecionada por PASSADOR-GURGEL *et al.* (1996) em estudos nos quais foram avaliadas espécies pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Schizosaccharomyces*. Além deste microrganismo ter apresentado bom desempenho global dentre os critérios estudados, outras características pertencentes a este gênero também influenciaram na sua escolha.

Na maioria dos casos, a escolha de um microrganismo para utilização industrial e, especialmente, para produção de proteínas heterólogas, depende de sua acessibilidade genética e de suas características fisiológicas. Com o rápido e contínuo avanço da biologia molecular, é de se esperar que mais e mais microrganismos se tornem acessíveis à manipulação genética. Embora a genética molecular de *K. marxianus* não esteja ainda bem estabelecida, esforços já vem sendo realizados neste sentido. Por isto, torna-se agora mais importante a escolha de leveduras com ótimas propriedades fisiológicas (ROUWENHORST, 1990).

Neste contexto, segundo ROUWENHORST (1990), leveduras do gênero *Kluyveromyces* são especialmente atraentes para produção de proteínas heterólogas, uma vez que elas pertencem ao grupo GRAS ("Generally Recognized as Safe") e são aceitas pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos EUA para usos farmacêutico e alimentício. Tanto assim, que atualmente estas leveduras são utilizadas comercialmente para produção de  $\beta$ -D-galactosidase (LALOUX, 1992). *K. marxianus var marxianus* apresentam, ainda, capacidade de utilização de diferentes substratos, incluindo a inulina, possuem um tempo de geração curto, ou seja, alta velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), crescem a temperaturas elevadas (até 45°C) e ainda apresentam crescimento em ampla faixa de pH (2,6 a 7,0) (VAN DIJKEN *et al.*, 1991).

Torna-se relevante citar alguns sinônimos de *Kluyveromyces marxianus*, uma vez que diferenças taxonômicas são encontradas na literatura para o mesmo microrganismo. Conforme descrito por BARNETT *et al.* (1983), lista-se a seguir algumas espécies consideradas como *Kluyveromyces marxianus*: *Candida kefir* (forma assexuada); *Candida pseudotropicalis var pseudotropicalis*; *Guilliermondella fragilis*; *Guilliermondella marxiana*; *Kluyveromyces bulgaricus*; *Kluyveromyces cicerisporus*; *Kluyveromyces fragilis*; *Saccharomyces fragilis*; *Saccharomyces macedoniensis*; *Saccharomyces marxianus*, entre outros.

As leveduras produzem inulinases não específicas capazes de hidrolisar polímeros de frutose, sacarose e rafinose, a monômeros. Como consequência, leveduras capazes de utilizar inulina podem também metabolizar sacarose (ROUWENHORST, 1990). Os monossacarídeos liberados após hidrólise da inulina são transportados para o interior da célula onde são metabolizados (HENSING *et al.*, 1993). Conforme descrito por ROUWENHORST (1990), *Kluyveromyces marxianus* são leveduras Crabtree-negativas. Estes microrganismos, segundo VAN DIJKEN *et al.* (1986), quando cultivados em condições de limitação pelo substrato, em culturas contínuas aeradas, possuem carregadores de glicose com alta afinidade. O transporte de açúcar nestas leveduras é um processo que requer energia.

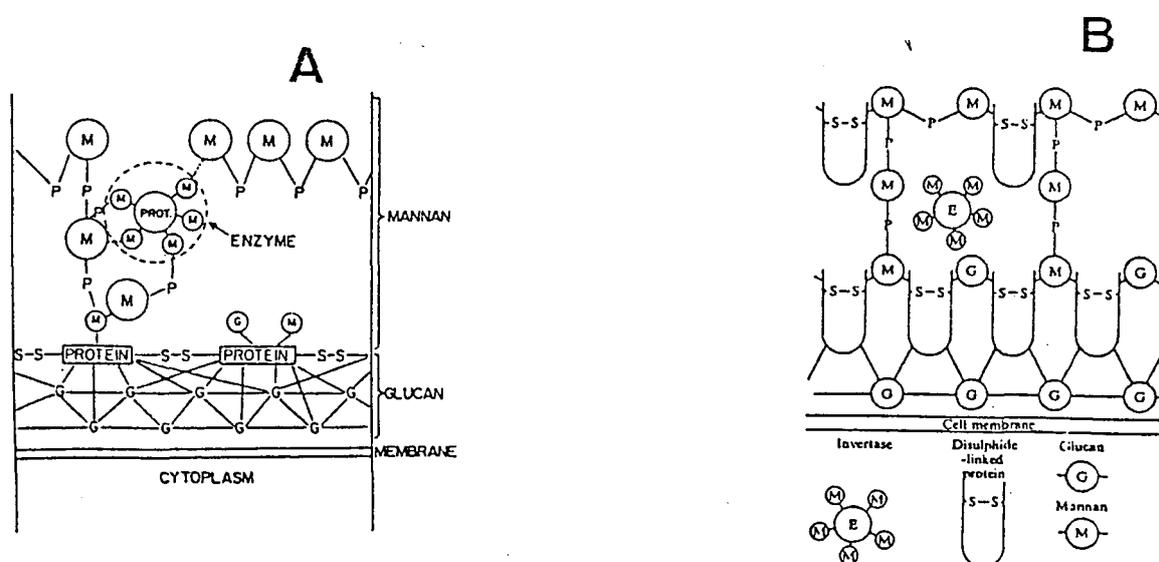
Por sua vez, GOTTSCHALK (1988) relata que o transporte de açúcares para o interior da célula de leveduras, ocorre através do mecanismo de difusão facilitada, de forma que, apesar da necessidade de um carregador específico para cada tipo de açúcar, este mecanismo não envolve energia metabólica.

Na síntese de proteínas extracelulares por leveduras, uma importante característica fisiológica é a localização pós secretória da proteína. Proteínas extracelulares em leveduras são usualmente retidas na parede celular, mas, dependendo da linhagem e das condições de cultivo, elas podem ser liberadas para o meio (ROUWENHORST, 1990). Segundo este autor, os parâmetros que interferem na localização da enzima são: natureza da fonte de carbono, taxa de diluição, composição do meio e temperatura de crescimento.

A purificação e a concentração de uma proteína intracelular requerem ruptura de células, resultando em uma solubilização adicional de grande quantidade de proteínas contaminantes. Quando a proteína é secretada para o meio de cultura, ela se encontra presente em baixas concentrações, mas com maior pureza (ROUWENHORST, 1990). Esta propriedade é de grande interesse na etapa de recuperação ("downstream") de enzimas de baixo ou médio valor (HENSING *et al.*, 1994).

SNYDER & PHAFF (1960) observaram a presença de inulinasas intra e extracelular em culturas de *K. fragilis*, embora sejam comumente encontradas associadas à parede celular e solúveis no meio de cultivo (HENSING *et al.*, 1993). Modelos para tentar explicar o modo de retenção de proteínas extracelulares em leveduras foram propostos por LAMPEN e KIDBY & DAVIES, citados por ROUWENHORST (1990).

Comum a ambos os modelos está a parede celular contendo, na região mais externa, o componente manose-proteína e na região mais interna o glucano, conforme pode ser visto na Figura II.4



**FIGURA II.4** Estrutura esquemática da parede celular de levedura e o modo de retenção de glicoproteínas de acordo com (A) LAMPEN e (b) KIDBY & DAVIES.

Os modelos diferem quanto à estrutura da região externa da parede celular e quanto ao modo de retenção das glicoproteínas na parede celular. LAMPEN propôs que a camada externa da parede celular de *S. cerevisiae* fosse formada de resíduos de manose, unidos por ligações fosfodiéster. Como seu modelo foi baseado em experimentos de degradação induzida da parede celular e concomitante liberação da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, esta enzima seria, então, mantida imediatamente abaixo da camada mais externa por: pontes manose-fosfodiéster entre a manose da parede celular e as moléculas de manose da camada mais externa; ligações de hidrogênio; ou outras forças hidrofílicas. A glicosilação do tipo manose serve então para explicar porque a proteína está ligada à matriz da parede celular. Contrário a este modelo, o modelo de KIDBY & DAVIES propõe que a glicoproteína esteja solúvel na matriz da parede celular e não ligada à parede celular. A retenção da invertase na parede celular de *S. fragilis* parece ser dependente de um componente que é reduzido por compostos sulfidrílicos como 2-mercaptoetanol. Isto levou os autores a postularem que a enzima é retida por uma barreira permeável, cuja integridade estrutural é mantida por ligações dissulfídicas.

A retenção da proteína é então correlacionada com seu peso molecular e com a permeabilidade da parede celular. ESMON *et al.*, conforme descrito por ROUWENHORST (1990), reportaram a relação entre as estruturas oligoméricas da invertase e sua localização. Segundo os autores, a enzima associada à parede é um octâmero, enquanto que a enzima secretada para o meio de cultivo é um dímero. Por outro lado, HENSING *et al.* (1993), estudando a produção de inulinase por *K. marxianus*, concluíram que a enzima secretada para o meio de cultura é um dímero, consistindo de duas sub-unidades (165 KDa/87 KDa), enquanto que a enzima retida na parede é um tetrâmero (335 KDa/87 KDa). Neste caso, tanto a inulinase secretada para o meio de cultivo como a inulinase retida na parede celular têm sub-unidades idênticas, consistindo de um polipeptídeo que contém 26-37% do seu peso molecular como carboidrato. As duas formas de inulinase diferem apenas no grau de oligomerização. A retenção da glicoproteína no espaço periplasmático da parede da levedura é então ocasionada pela permeabilidade da camada

mais externa da parede celular. A oligomerização de proteínas pode então desempenhar um papel importante na retenção da enzima na parede celular (HENSING *et al.*, 1993).

Os valores encontrados na literatura para definir o peso molecular da inulinase diferem entre si. No trabalho de GUPTA *et al.* (1994), o peso molecular da inulinase de *K. marxianus* foi estimado em aproximadamente, 250 KDa. As inulinases de *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* têm peso molecular na faixa de 300 à 325 KDa (GUPTA *et al.*, 1988; GUPTA *et al.*, 1990; GUPTA *et al.*, 1994b). No entanto, AZHARI *et al.* (1989) reportaram peso molecular de 81 KDa para exo-inulinase de *Aspergillus* sp, enquanto que ETTALIBI E BARATTI (1987) encontraram, para exo-inulinase de *A. ficuum*, um peso molecular na faixa de 74 a 76 KDa.

## **II.5 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO CELULAR E ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

### **II.5.1 Temperatura de cultivo**

A influência da temperatura no crescimento celular e/ou na síntese de inulinase vem sendo objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa.

GROOTWASSINK E FLEMING (1980), estudando a produção de inulinase por *K. fragilis* ATCC 12424, observaram que, em fase ativa de crescimento, a produção máxima da enzima ocorreu em temperaturas próximas de 33°C e o crescimento máximo foi observado por volta de 36°C. No entanto, culturas na fase estacionária mostraram que os máximos valores de concentração celular e atividade enzimática foram obtidos a 26°C e 30°C, respectivamente. Por outro lado, ROUWENHORST *et al.* (1988) chegaram a conclusões que divergem dos autores citados anteriormente. Eles verificaram que, exceto

para meio de cultivo contendo etanol como fonte de carbono, a temperatura ótima de crescimento e produção de enzima por *K. marxianus* CBS 6556 localiza-se na faixa de 37 a 42°C. Os autores avaliaram a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) de *Kluyveromyces marxianus* em diferentes meios de cultivo e sob diferentes condições de temperatura e obtiveram, em meio contendo extrato de levedura, bacto peptona e glicose  $\mu_{\max}=0,89 \text{ h}^{-1}$ , para as temperaturas de 37 e 42°C e  $\mu_{\max}=0,87 \text{ h}^{-1}$  a 33°C. Aparentemente, a faixa de temperatura ótima para produção da enzima corresponde à temperatura ótima de crescimento de *K. marxianus*.

NEGORO & KITO (1973b), estudando a produção de inulinase por *C. kefyri*, concluíram que a temperatura ótima para produção da enzima se encontra entre 27 e 30°C. Os autores obtiveram valores de atividade enzimática de 550 e 620 U/g a 27°C e 570 e 650 U/g a 30°C, para as enzimas extra e intracelular, respectivamente. Em temperaturas acima de 32°C a atividade, tanto extra como intracelular, sofreu um decréscimo. MANZONI E CAVAZZONI (1988) testaram três diferentes temperaturas (28, 32 e 36°C) para verificar a produção de inulinase pelas leveduras *C. kefyri*, *C. pseudotropicalis*, *K. cicerisporus* e *K. fragilis*. Os resultados obtidos demonstraram que a atividade máxima de inulinase extracelular após 6 dias de cultivo, ocorre a 28°C em *C. kefyri* (24,6 U/mL) e *C. pseudotropicalis* (31,4 U/mL) e a 32°C em *K. cicerisporus* (32,0 U/mL) e *K. fragilis* (22,4 U/mL). Temperaturas de 22°C, 27°C e 32°C foram estudadas por XIAO *et al.* (1988) para a produção de inulinase por *Chrysosporium pannorum*. A produção da enzima foi decrescente com o aumento da temperatura (47, 22 e 0 U/mL, respectivamente).

Outros autores realizaram estudos sobre a produção de inulinase na faixa de temperatura compreendida entre 25 e 30°C, sem contudo avaliar a influência deste parâmetro (BAJON *et al.*, 1984; PAREKH & MARGARITIS, 1985; TSANG & GROOTWASSINK, 1988; MANZONI & CAVAZZONI, 1988; FERREIRA *et al.*, 1991; GUPTA *et al.*, 1994a).

### II.5.2 pH do meio de cultivo

No estudo realizado por SNYDER & PHAFF (1960), no qual os autores avaliaram a possibilidade de substituição do autolisado de leveduras por outras fontes de nitrogênio, pode-se notar que existe uma relação estreita entre a fonte de nitrogênio e o pH do meio de cultivo. O autolisado foi substituído por meio YNB (Yeast Nitrogen Base), cuja fonte de nitrogênio é o sulfato de amônio. A fermentação resultou em baixos valores de concentração celular, provavelmente devido à queda do pH de 5,0 para 2,4 ou menos. Em valores de pH desta grandeza, a inulinase tem pouca atividade sobre a inulina, substrato utilizado para crescimento. Os autores relataram também, que com o uso de 0,5% de fosfato de amônio dibásico, o pH inicial do meio foi 7,1-7,2 e o crescimento foi latente devido a baixa atividade da inulinase neste pH. Com 1,2% de fosfato de amônio monobásico e 1% de inulina, o pH inicial foi 4,5. Neste caso, o crescimento e a produção de enzima foram satisfatórios, porém o pH caiu para 2,6 nas primeiras 24 horas de crescimento. Possivelmente, parte da enzima exposta a este pH tornou-se inativa. Sendo assim, o pH do meio foi controlado em 5,0 com a utilização de tampão succinato, com concentração final igual a 0,025 M.

XIAO *et al.* (1988) ajustaram o pH inicial do meio de cultura em diferentes valores com a adição de HCl 1N ou NaOH 1N. A produção de inulinase por *Saccharomyces fragilis* não foi significativamente diferente na faixa compreendida entre 4,5 e 5,5 (15 a 21 U/mL). Valores de pH da ordem de 5,5 proporcionaram também máxima atividade de inulinase (106,8 U/L), após 9 dias de cultivo, de *Fusarium oxysporum* (GUPTA *et al.*, 1990).

Na fermentação de inulina por *Clostridium thermosuccinogenes*, realizada por DRENT *et al.* (1991), o pH ótimo para crescimento foi 7,6 enquanto que nenhum crescimento foi possível em valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 9,0.

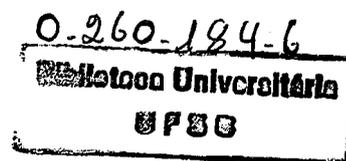
O pH das fermentações visando a produção de inulinase por *Kluyveromyces* sp, realizadas por TSANG & GROOTWASSINK (1988) e ROUWENHORST (1990), foi mantido

em 4,5 pela adição automática de ácido e base enquanto que GROOTWASSINK & FLEMING (1980) e GROOTWASSINK & HEWITT (1983) controlaram o pH do meio em 4,2.

### II.5.3 Composição do meio de cultivo

A composição dos meios de cultivo é um fator fundamental para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*. Isto implica na presença dos nutrientes adequados tais como, nitrogênio, vitaminas e sais, bem como da fonte de carbono no meio de cultivo. Segundo alguns autores (SNYDER & PHAFF, 1960; VANDAMME & DERYCKE, 1983; PAREKH & MARGARITIS, 1986), a presença de inulina como fonte de carbono é, praticamente, um pré requisito para formação de inulinase.

PAREKH & MARGARITIS (1986), estudando a produção de inulinase por *K. marxianus*, concluíram que, para este microrganismo, a inulinase parece ser uma enzima induzida, uma vez que a máxima produção (212 U/mL) foi obtida com meio contendo inulina. Glicose, frutose e sacarose foram considerados fracos indutores da síntese de inulinase, porém ocasionaram um rápido acúmulo de biomassa ( $\mu_{\max}$  entre 0,42 e 0,50 h<sup>-1</sup>) e a fermentação foi completada em 10 horas. NEGORO & KITO (1973b) também concluíram que, comparado com outras fontes de carbono, a inulina leva a uma maior produção da enzima por *Candida kefyr*. Por outro lado, ROUWENHORST *et al.* (1988) relataram que em culturas contínuas de *K. marxianus* CBS 6556, em condições de limitação pelo substrato, os maiores rendimentos em inulinase foram obtidos tanto com sacarose quanto com inulina. GROOTWASSINK & HEWITT (1983) avaliaram também o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de inulinase por *K. fragilis* e concluíram que frutose e sacarose levaram aos maiores rendimentos em inulinase, enquanto que, lactose, galactose, etanol e lactato não estimularam a formação da enzima. A frutose foi, então, identificada como um indutor fisiológico primário da síntese de inulinase. Os autores afirmaram que a evidência mais convincente de que inulinase é uma enzima induzida, foi a obtenção de uma espécie mutante que produz inulinase



constitutivamente. Fermentações com este mutante levaram à formação de altos níveis de inulinase, independentemente da fonte de carbono.

O fungo filamentoso *Chrysosporium pannorum* foi também cultivado em diferentes fontes de carbono e avaliou-se o efeito destes açúcares na produção de inulinase após 5 dias de crescimento a 25°C. A inulinase foi encontrada apenas no meio contendo inulina, sugerindo que, para este microrganismo, esta é uma enzima induzida (XIAO *et al.*, 1988). KIM (1975 a,b), citado por VANDAMME & DERYCKE (1983), observou que a adição de outros açúcares não tem efeito na formação de inulinase por *Penicillium* spp. Além disto, um estudo realizado por GUPTA *et al.* (1990), com o fungo *Fusarium oxysporum*, revelou que a adição de diferentes açúcares, após três dias de cultivo, em meio contendo inulina, diminui a atividade em inulinase. Dos açúcares testados (glicose, frutose, sacarose e galactose) a sacarose apresentou o maior efeito inibitório na produção de inulinase.

Uma vez que a inulina é produzida em pequenas quantidades e a um custo elevado, a utilização deste substrato para produção comercial de inulinase não é conveniente. Portanto fontes alternativas de substrato contendo frutanos com ligações  $\beta$ -2,1, encontradas em plantas como a chicória e a alcachofra de Jerusalém, têm sido utilizadas (GROOTWASSINK & FLEMING, 1980).

No trabalho desenvolvido por GUPTA *et al.* (1994a), avaliou-se a utilização de diversos açúcares (sacarose, inulina, frutose e glicose), bem como extrato de chicória para a produção de inulinase por *K. fragilis*. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo na produção de inulinase extracelular, quando os açúcares comerciais foram substituídos por extrato de chicória. Ainda avaliando extratos naturais de inulina, MANZONI & CAVAZZONI (1988) verificaram que, em meio contendo extrato de topinambur suplementado com sais ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e FeSO<sub>4</sub>), as leveduras *C. kefir*, *C. pseudotropicalis*, *K. cicerisporus* e *K. fragilis* apresentaram maior atividade enzimática quando comparado com o meio contendo inulina comercial. O mesmo meio de

cultivo foi utilizado por Bajpai & Margaritis (1985) para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*.

O efeito da fonte de nitrogênio sobre a formação de inulinase foi estudada por alguns autores. SNYDER & PHAFF (1960), conforme relatado no item II.5.2, concluíram que o meio YNB não constitui uma fonte de nitrogênio adequada para produção de inulinase por *Saccharomyces fragilis*. Neste mesmo estudo, casaminoácidos mostraram-se uma excelente fonte de nutrientes para o crescimento e produção de inulinase. No entanto, nem todos os seus componentes são dialisáveis, o que impede a purificação da enzima. Fosfato de amônio foi igualmente testado como fonte de nitrogênio e valores satisfatórios de atividade foram encontrados quando o pH do meio foi controlado em 5,0 com tampão succinato.

GROOTWASSINK & HEWITT (1983) testaram a possibilidade de substituir extrato de levedura por YNB, tendo glicose como fonte de carbono, na produção de inulinase por *K. fragilis* ATCC 12424. Os resultados foram similares àqueles obtidos com extrato de levedura, indicando que este não contém qualquer substância essencial à formação de inulinase, além daquelas existentes no meio YNB.

Mais recentemente, GUPTA *et al* (1994a) reportaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (orgânica e inorgânica) na produção de inulinase extracelular por *K. fragilis*, tendo extrato de chicória (1% p/v) como fonte de carbono. A substituição de peptona por  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ , uréia, glicina ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  não favoreceu a produção de inulinase. A atividade enzimática obtida após 48 horas de cultivo, em meio contendo peptona foi igual à 5,57 U/mL, caindo para 1,38 U/mL e 0,4 U/mL em meio contendo sulfato de amônio e uréia, respectivamente.

O efeito de nutrientes orgânicos e inorgânicos também foi estudado no cultivo de *C. pannorum* por XIAO *et al.* (1988) para produção de inulinase. Os autores comentam que apesar da Milhocina (“Corn Steep Liquor”), polipeptona e extrato de levedura terem favorecido a produção da enzima, os melhores resultados foram obtidos no meio contendo extrato de carne (1% p/v). Um estudo semelhante foi realizado por NAKAMURA *et al.*

(1978) para o fungo *Aspergillus niger*-12. Os resultados apontaram a Milhocina como melhor fonte de nitrogênio. O meio usado como controle consistiu de inulina (1% p/v) e nitrogênio na forma de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (0,8% p/v) ou  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0,4% p/v), além dos elementos traços. A produção de inulinase neste meio foi desprezível.

Dentre as fontes inorgânicas estudadas por XIAO *et al.* (1988), a adição de 0,02M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  forneceu uma maior produção de inulinase comparado à adição de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ou  $\text{NaNO}_3$ . Um aumento na concentração da fonte de nitrogênio para 0,1M não estimulou a produção da enzima.

De acordo com GUPTA *et al.* (1990) a máxima produção de inulinase foi obtida com  $\text{NaNO}_3$  após 9 dias de cultivo de *Fusarium oxysporum*. Por outro lado, CHOI *et al.*, citados por estes autores, reportaram que esta fonte exerceu um efeito inibitório na produção de inulinase em *K. fragilis*. Isto sugere que cada microrganismo tem preferência por determinada fonte de nitrogênio para produção de inulinase.

Segundo CHANG & HAYES (1978), o farelo de arroz constitui também uma excelente fonte de nitrogênio e vitaminas essenciais para o crescimento microbiano, conforme descrito na Tabela II.6.

**TABELA II.6** Composição e conteúdo vitamínico do farelo de arroz.

Componente	%	Vitaminas	mg/Kg
Umidade	13,8	Tiamina	22,4
Proteína	13,4	Riboflavina	2,6
Gordura	17,1	Niacina	303,2
Fibras	7,9	Ácido pantotênico	23,5
Cinzas	10,2	Vitamina B <sub>6</sub>	43,0
Nitrogênio	37,6	Colina	1254,0
		Biotina	4,2

Fonte: Chang & Hayes (1978).

#### II.5.4 Concentração inicial de substrato

Os estudos referentes à influência da concentração inicial de substrato na produção de inulinase por leveduras são escassos. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura foram realizados com fungos filamentosos.

SNYDER & PHAFF (1960) verificaram a influência da concentração inicial de inulina na produção de inulinase por *Saccharomyces fragilis*. Os autores testaram concentrações de inulina entre 0,5 e 3% (p/v) e os melhores resultados em termos de formação de células e atividade enzimática foram obtidos com 1% (p/v) de substrato. Acima desta concentração, no entanto, os rendimentos não justificaram o uso de grandes quantidades de inulina.

XIAO *et al.* (1978) variaram a concentração de inulina (1 a 5% p/v) e de extrato de carne (0,2 a 5,0% p/v) no meio de cultivo para produção de inulinase por *Chrysosporium pannorum* e observaram que a combinação de 5% de inulina e 4% de extrato de carne forneceu o maior valor de atividade enzimática (115 U/mL após 8 dias de fermentação). Diferentes concentrações de inulina (1 a 4%) proporcionaram resultados diversos de acordo com a concentração de extrato de carne empregada. Conclusões semelhantes puderam ser obtidas a partir do trabalho de NAKAMURA *et al.* (1978), que estudaram os efeitos da concentração de inulina (0,5 e 3,0% p/v) em meios suplementados com Milhocina, na produção de inulinase por *Aspergillus niger* -12. A composição do meio de cultivo contendo 3% de inulina forneceu os melhores resultados de atividade enzimática, sendo o valor máximo obtido igual a 7,93 U/mL.

GUPTA *et al.* (1990) estudaram o efeito de diferentes concentrações de frutanos (1 a 5% p/v) na produção de inulinase extracelular por *Fusarium oxysporum*. Os autores observaram que um aumento da produção de inulinase foi obtido quando o nível de frutano no meio foi elevado até 3%. A partir desta concentração, a produção de inulinase diminuiu.

Anos mais tarde, GUPTA *et al.* (1994a), estudando a produção de inulinase por *Kluyveromyces fragilis*, em diferentes concentrações de frutanos (0,5 a 2 % p/v), reportaram que a máxima atividade de inulinase extracelular foi obtida com 1,5 %.

### II.5.5 Suprimento de oxigênio

Estudos realizados por SNYDER & PHAFF (1960) mostraram que, tendo inulina como fonte de carbono para produção de inulinase por *Saccharomyces fragilis*, culturas agitadas favoreceram a produção da enzima, se comparadas com culturas estáticas. Os autores concluíram que o aumento na quantidade de enzima foi devido, sobretudo, à maior concentração celular do que a algum estímulo específico sobre a produção de inulinase.

Segundo KIM (1975a), citado por VANDAMME & DERYCKE (1983), a máxima produção de inulinase por *Penicillium* spp foi obtida após 72 horas de crescimento, em frascos agitados, a 120 rpm. Culturas em superfície produziram notadamente menos inulinase, mesmo após 120 horas de incubação.

GROOTWASSINK & FLEMING (1980), otimizando a produção de inulinase por *Kluyveromyces fragilis*, avaliaram o efeito da concentração de oxigênio dissolvido em sistemas contínuos. Os autores não observaram mudanças na produção de biomassa e na síntese da enzima quando a concentração de oxigênio dissolvido variou entre 2,5 e 40% da saturação indicando que a concentração crítica de oxigênio para formação da enzima é menor do que 2,5 %.

NAKAMURA *et al.* (1978) avaliaram o efeito da transferência do oxigênio sobre a produção de inulinase por *Aspergillus niger*-12. Pode-se perceber através dos resultados que, após 6 dias de cultivo a 30°C, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, volumes crescentes de meio de cultivo levaram a uma diminuição da oxigenação, diminuindo, com isso, a produção de inulinase. Os autores verificaram também uma queda no pH, sugerindo que em condições de limitação de oxigênio há liberação de metabólitos que

causam o abaixamento do pH, podendo inclusive diminuir a atividade da enzima contida no meio de cultivo.

A ampliação da escala de produção de inulinase, em culturas descontínuas aeradas de *Candida kefyr*, realizada por PESSOA JR *et al.* (1995), se baseou no valor inicial de  $K_{La}$ . Os autores, inicialmente, variaram o  $K_{La}$  inicial entre 25 a  $199 \text{ h}^{-1}$ , em fermentador com volume útil de 10 L, obtendo melhor produção de inulinase em  $K_{La} = 46 \text{ h}^{-1}$ . Nesta condição, o oxigênio dissolvido foi um fator limitante. Sendo assim, a fermentação foi conduzida, nas mesmas condições, em fermentador contendo 200 L de meio de cultivo e os resultados foram similares aos obtidos anteriormente. Os autores puderam concluir que o critério adotado foi apropriado para ampliação de escala (20x).

## III. MATERIAIS E MÉTODOS

### III.1 MICRORGANISMO

A levedura *Kluyveromyces marxianus* obtida da American Type Culture Collection sob o código ATCC 36907, após ter sido selecionada anteriormente nos laboratórios do CBD para a produção de exo-inulinase (PASSADOR-GURGEL *et al.*, 1996), foi utilizada em todos os ensaios deste trabalho.

#### III.1.1 Manutenção da cultura

Culturas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foram mantidas em tubos de ágar inclinado contendo meio semi-sintético com a seguinte composição (g/L):

Extrato de levedura (YE) : 10

Bacto peptona (BP) : 20

Glicose : 20

Ágar : 15

Após incubação por 24 h a 30°C, as culturas foram conservadas a 4°C, em refrigerador e repicadas a cada 2 meses.

#### III.1.2 Preparo do inóculo

O meio de cultivo utilizado foi o seguinte (g/L):

Extrato de levedura (YE) : 10

Bacto peptona (BP) : 20

Inulina ou frutose (I ou F) : 20

Tubos de ensaio de 20 mL contendo 5 mL de meio de cultivo foram inoculados com uma alçada de células de *Kluyveromyces marxianus* e incubados a 37°C e a 220 rpm, em agitador de movimento recíproco (Certomat B.Braun) até que a suspensão celular atingisse um valor de absorvância igual a 4,0 ( $\lambda = 600$  nm). Esta suspensão foi usada como inóculo, numa fração de 1% (v/v), em fermentador ou em frascos de Erlenmeyer. O valor 4,0 de absorvância foi escolhido porque corresponde a células em final de fase exponencial de crescimento. Além disto, este valor de absorvância corresponde a uma concentração celular suficiente (aproximadamente 3,0 g/L) para proporcionar um volume de inóculo pequeno, que não altere, de forma significativa, a concentração dos nutrientes no meio de cultivo.

A esterilização dos meios de cultura foi feita a 121°C por 15min.

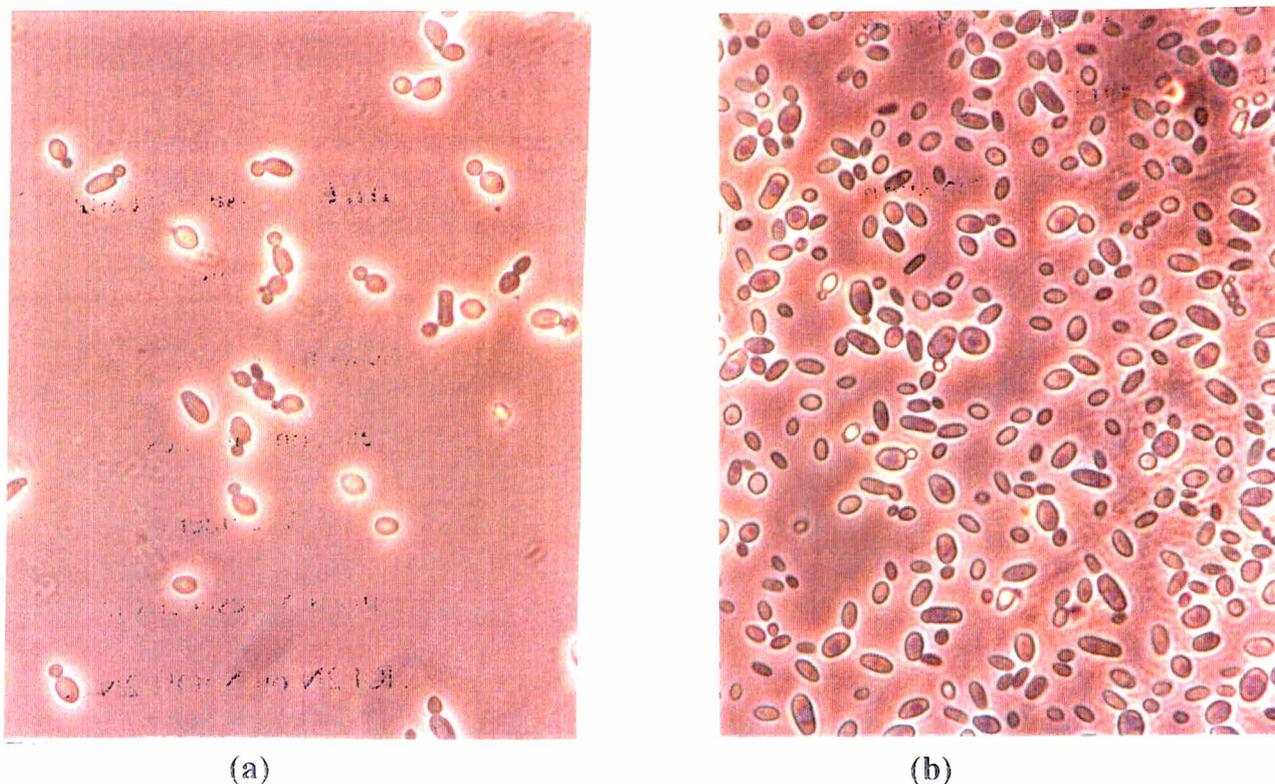
As Figuras III.1(a) e III.1 (b) mostram células de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em diferentes fases de crescimento.

## **III.2 MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO**

### **III.2.1. Ensaios realizados em frascos agitados**

Os meios de cultivo descritos na Tabela III.1 foram avaliados, em duplicata, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com tampa de alumínio, contendo 100 mL de meio, em

agitador com movimento recíproco (Certomat - B.Braun), a 37°C e 175 rpm. A inoculação foi feita conforme descrito no item III.1.2.



**FIGURA III.1** (a) Células de *K. marxianus* ATCC 36907 em fase de crescimento exponencial.

(b) Células de *K. marxianus* ATCC 36907 em fase estacionária de crescimento.

Com exceção da fonte de carbono, os demais componentes do meio de cultivo foram dissolvidos em tampão citrato de sódio 0,2M, pH 4,5 e esterilizados em autoclave a 121°C, por 15min. A inulina foi preparada em água comum e autoclavada separadamente para evitar reação de Maillard e/ou hidrólise ácida durante a etapa de esterilização. O meio de cultivo utilizado para o estudo da evolução espontânea do pH foi preparado em água deionizada e o pH inicial do cultivo foi o pH natural do meio (pH 6,5). A Figura III.2 ilustra o sistema de fermentação em frascos agitados em agitador Certomat B.Braun.

**TABELA III.1** Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos em frascos agitados.

Parâmetro avaliado	Meios	Composição
Temperatura	MT1 - 28°C ; MT2 - 32°C MT3 - 37°C ; MT4 - 45°C	extrato de levedura:1% bacto peptona: 2% inulina :1% (Meio controle : YEP I)
pH	MH1 - sem controle MH2 - com controle	extrato de levedura:1% bacto peptona: 2% inulina :1% (Meio controle : YEP I)
Concentração inicial de inulina	MI1 - 1% ; MI2 - 2% MI3 - 4% ; MI4 - 6%	extrato de levedura : 1% bacto peptona : 2% inulina variando entre 1 e 6%
Concentração de bacto peptona	MB1 - 0% ; MB2 - 0.5% MB3 - 1% ; MB4 - 2%	extrato de levedura : 1% bacto peptona variando entre 0 e 2% inulina 1%
Uréia como fonte de nitrogênio	MU1 - 0,17% ; MU2- 0,35% MU3 - 0,70%	extrato de levedura : 1% uréia variando entre 0,17% e 0,7% inulina 1%
Sulfato de amônio como fonte de nitrogênio	MS1- 0% ; MS2 - 0,75% MS3 - 1,5%	extrato de levedura : 1% sulfato de amônio variando entre 0 e 1,5% inulina 1%
Concentração de extrato de levedura	ME1 - 0% ; ME2 - 0.3% ME3 - 0.6% ; ME4 - 1%	extrato de levedura variando entre 0 e 1% bacto peptona 2% inulina 1%
Prodex e farelo de arroz como fontes de fatores de crescimento e nitrogênio, respectivamente	MF1 - 0,5% FA+ 0,6% PD MF2 - 0,5% FA+ 1,0% PD MF3 - 2,0% FA+ 1,0% PD MF4 - 2,0% FA+ 0,6% PD MF5 - 4,0% FA+ 1,2% PD	Prodex (PD) : 0,6 a 1,2% farelo de arroz (FA) : 0,5 a 4% inulina 1%
Extrato de chicória como fonte de carbono	MC1 - EC MC2 - EC + 0,6% YE MC3- EC+0,6%YE+A,B,C MC4 - I + 0,6% YE	extrato de levedura (YE): 0,6 a 1% extrato de chicória (EC): 1% inulina (I) :1% A. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 1% B. MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O: 0,05% C. FeSO <sub>4</sub> : 0,015%



**FIGURA III.2** Sistema de fermentação em frascos agitados.

Alguns ensaios foram realizados com matérias-primas naturais. Para isto, foi necessário aplicar métodos de extração para retirada dos elementos essenciais ao crescimento do microrganismo.

**III.2.1.1 Preparo do extrato de Chicória:** sementes de *C. intybus* variedade Cassel (provenientes da França) e Fredônia (provenientes da Áustria) foram cultivadas pela Fundação Municipal 25 de Julho em Joinville (SC). Depois de colhidos, os tubérculos foram descascados, cortados em pedaços e triturados em liquidificador. A 300 g de tubérculos, juntou-se 600 mL de água e autoclavou-se a 121°C por 20 min para extração da inulina, de acordo com metodologia descrita por MANZONI & CAVAZONI (1988). Em seguida, procedeu-se a filtração em condições assépticas, a vácuo, em fluxo laminar, com

membrana de porosidade 0,2  $\mu\text{m}$ . O filtrado foi analisado em HPLC para determinação da concentração de inulina e conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**III.2.1.2 Preparo do extrato de farelo de arroz:** o farelo de arroz foi pesado em frascos de centrífuga (Sorval - rotor GSA) esterilizáveis e ressuspensão em tampão citrato de sódio 0,2M, pH 4,5. Em seguida, procedeu-se à extração em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , por 20 min. Após resfriamento, o material foi centrifugado por 15 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi então misturado assepticamente com a fonte de carbono e usado como fonte de nitrogênio.

### **III.2.2 Ensaios realizados em fermentador**

Os ensaios foram realizados em fermentador Biostat MD-B.Braun, em regime descontínuo, em cuba de 2L, com volume útil de 1,5L. O meio de cultura utilizado foi o meio controle, descrito na Tabela III.1.

A temperatura e o pH foram mantidos constantes em todos os experimentos a  $37^{\circ}\text{C}$  e pH 4,5, respectivamente. O controle do pH foi feito através da adição automática de HCl 2N ou NaOH 2N ao meio, durante o cultivo. A frequência de agitação e a vazão de ar variaram de forma a se obter diferentes valores de  $K_{L}a$  (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio).

A Tabela III.2 apresenta as condições de agitação e aeração e o respectivo valor de  $K_{L}a$  inicial utilizados no trabalho. No caso de estados de aeração e agitação elevados,

onde houve a formação de espuma, foram adicionados aproximadamente 0,2 mL de anti-espumante (polipropileno glicol P2000).

**TABELA III.2** Condições de aeração e agitação e os respectivos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ) obtidos em meio de cultivo YEP I, em fermentador Biostat MD B.Braum com cuba de 2L.

	MK1	MK2	MK3
$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	21	36	89
agitação (rpm)	200	330	585
aeração (vvm)	1,5	1,0	1,25

O preparo do fermentador envolveu a montagem do vaso de fermentação com os seguintes itens, como pode-se observar na Figura III.3:

1. sonda de temperatura
2. eletrodo de pH
3. eletrodo de oxigênio
4. sistema de adição de ácido e base
5. condensador
6. "loop" para retirada de amostra ligado à bomba peristáltica
7. aspersor de ar
8. agitador com três turbinas fixadas a 1 cm, 4,5 cm e 7,5 cm, respectivamente da extremidade livre.

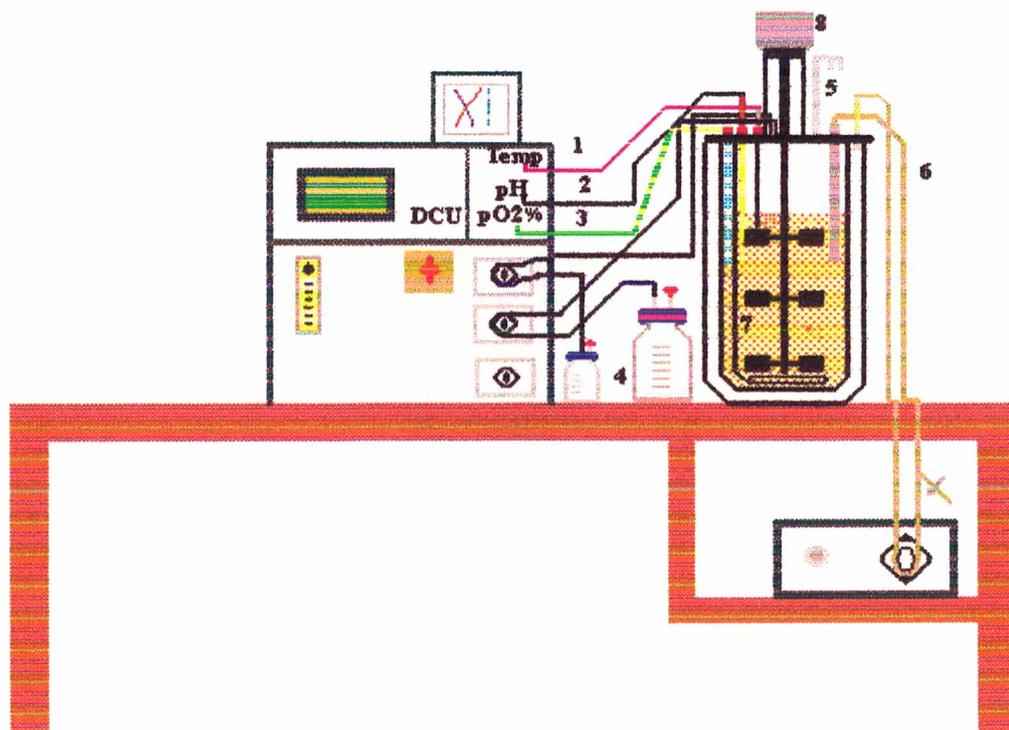
Os dispositivos de entrada de inóculo, antiespumante e meio de cultivo não estão descritos na figura.

A cuba de fermentação, contendo a fonte de carbono, foi esterilizada por 30 min a 121 °C em autoclave. O meio contendo os demais nutrientes foi esterilizado

separadamente e transferido para a cuba de fermentação com auxílio de conexões apropriadas. Após a esterilização e o resfriamento da cuba, o eletrodo de oxigênio foi conectado à DCU (Unidade de Controle do Fermentador), para polarização, 15 h antes da calibração e início do processo.

O eletrodo de pH permaneceu em água deionizada por, pelo menos, 6 horas antes da calibração. Esta sonda foi lavada com álcool etílico 70% e, em seguida, enxaguada com água deionizada esterilizada e instalada na cuba de fermentação em ambiente asséptico.

Uma vez terminada esta etapa, os passos seguintes foram a calibração do eletrodo de oxigênio, como descrito no item III.3.9.2 e a medição do  $K_L a$  conforme descrito no item III.3.10.



**FIGURA III.3** Sistema de fermentação em biorreator.

A Figura III.4 apresenta as unidades que compõem o fermentador (cuba de fermentação, registrador, DCU, sistema de adição de ácido e base e bomba peristáltica para retirada de amostra).

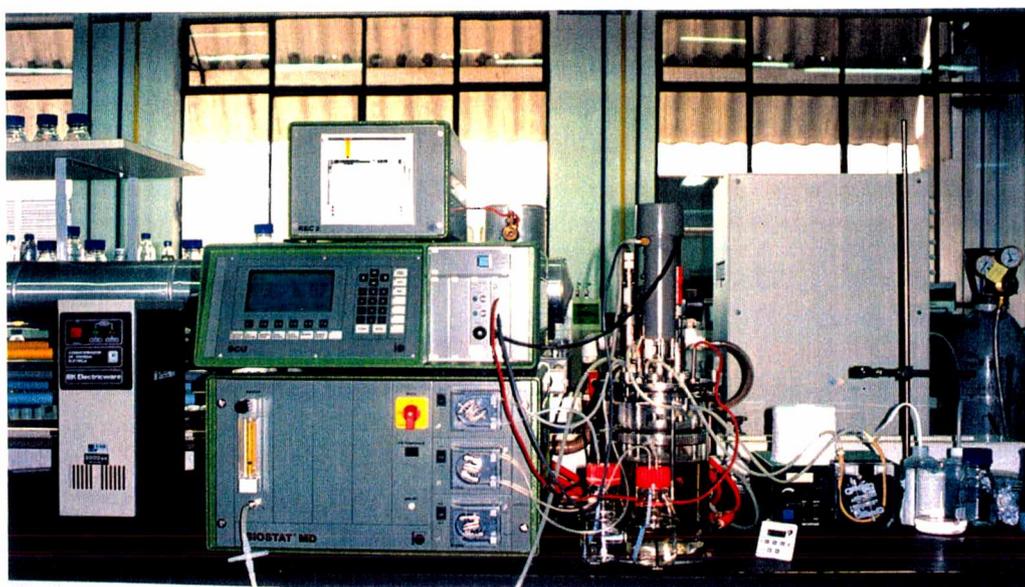
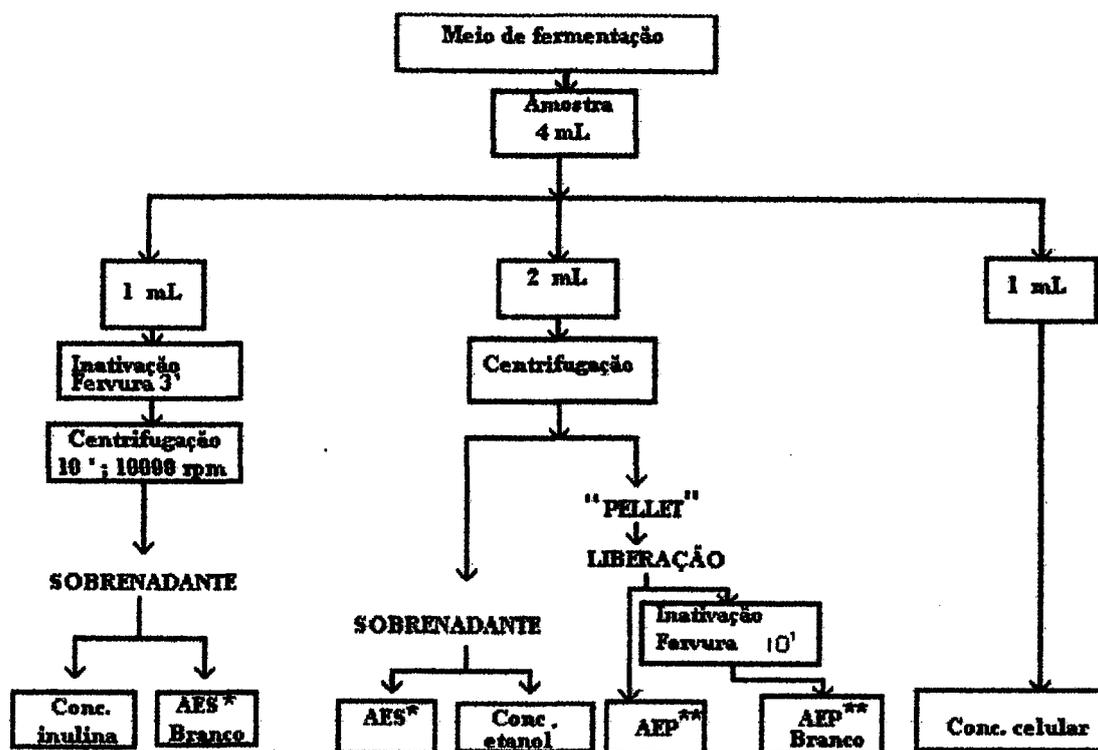


FIGURA III.4. Dispositivo experimental de fermentação.

### III.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### III.3.1 Esquema de tratamento da amostra

A Figura III.5 apresenta, de forma simplificada, o procedimento de tratamento das amostras, utilizado em experimentos realizados em fermentador. O volume e o número de amostras foram reduzidos quando os experimentos foram realizados em frascos agitados, de modo que o volume total de amostra coletado durante cada fermentação não excedesse 10% do volume inicial de meio, para que o perfil de transferência de oxigênio não fosse alterado.



\* AES : atividade extracelular ou contida no sobrenadante.

\*\*AEP : atividade ligada à parede celular ou periplasmática.

FIGURA III.5 Representação esquemática do procedimento de amostragem.

### III.3.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria. Leituras de absorbância das suspensões de células provenientes das fermentações foram feitas em espectrofotômetro LKB a 600 nm e convertidas em concentração celular (g/L) por meio de uma curva de calibração.

Para a construção da curva de calibração, células de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foram cultivadas em meio YEPI. Após atingir o valor de aproximadamente

5,0 g/L de células, a suspensão sofreu várias diluições. Volumes conhecidos das suspensões diluídas foram filtrados a vácuo, em membranas de acetato de celulose (0,45 µm) previamente secas e pesadas. Após secagem até peso constante (24 h a 90°C), a biomassa foi determinada pela diferença de peso seco. A curva obtida, correlacionando a absorbância com a concentração celular (g/L), apresentou um trecho linear compreendendo valores de absorbância entre 0,2 e 0,6 (Figura A.1). A equação matemática que descreve este trecho apresenta coeficiente de correlação (r) igual a 0,9998 e é representada pela expressão:

$$X = (\text{abs} - 0,054)/1.324 \quad (1)$$

onde X = concentração de células (g/L) e abs = absorbância da suspensão diluída

### III.3.3 Obtenção da enzima ligada à parede celular

Parte da alíquota de 2 mL da suspensão de células proveniente da amostragem (Figura III.5) foi destinada à obtenção da enzima ligada à parede celular ou periplasmática (AEP), conforme metodologia definida em trabalhos anteriores realizados nos laboratórios do CDB (POREP *et al.*, 1993a).

Sendo assim, 2 mL do caldo de fermentação foram centrifugados por 5 min a 12000 rpm em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi congelado para posterior análise de etanol e atividade enzimática extracelular (AES). O “pellet” foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,4 M, pH 7,0 mais 16 mM de cisteína e incubado a

temperatura ambiente, sem agitação, por 1 hora, para liberação da enzima periplasmática. Após este intervalo, as células foram novamente centrifugadas nas condições citadas acima, o sobrenadante foi recolhido como a porção contendo a enzima ligada à parede celular e o “pellet” foi descartado. A determinação da atividade inulinolítica foi feita conforme descrito no item III.3.4.

### **III.3.4 Determinação da atividade enzimática**

O procedimento de determinação da atividade inulinolítica foi dividido em 3 etapas para melhor compreensão:

1ª Etapa: Reação enzimática

2ª Etapa: Inativação da enzima

3ª Etapa: Teste enzimático para determinação de glicose e frutose

1ª ETAPA: Reação enzimática

Distribuiu-se 800  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 2% de inulina (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 0,1, M, pH 5,0, em tubos de Eppendorf. Juntou-se a este volume, 200  $\mu\text{L}$  da enzima devidamente diluída (AES ou AEP) e deixou-se reagir por 10 min a 50°C em termomixer Eppendorf sob agitação.

2ª ETAPA: Inativação da enzima

Após 10 min, a reação foi interrompida com a colocação dos tubos de Eppendorf em água fervente por 3 a 5 min.

### 3ª ETAPA: Teste enzimático para determinação de glicose e frutose

Procedeu-se o teste enzimático de dosagem da glicose e da frutose liberadas na 1ª etapa, como descrito no item III.3.5.2, sendo que para cada amostra preparou-se um branco nas mesmas condições de diluição.

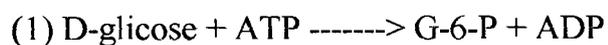
O procedimento de determinação da atividade enzimática foi o mesmo para as enzimas contidas no sobrenadante e ligada à parede celular, com exceção do tempo de inativação da porção de enzima ligada à parede, que foi de 10 min.

### **III.3.5 Teste enzimático para determinação de glicose e frutose**

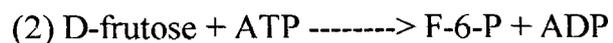
#### **III. 3.5.1 Princípio do método (BEUTLER, 1984)**

D-glicose e D-frutose são fosforiladas pela enzima hexoquinase (HK) e por trifosfato de adenosina (ATP), a glicose-6-fosfato (G-6-P) e frutose-6-fosfato (F-6-P), com formação simultânea de difosfato de adenosina (ADP) (1,2):

**HK**

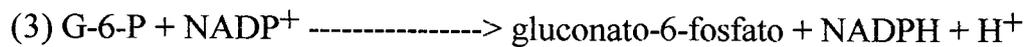


**HK**



Na presença da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), a G-6-P é oxidada pela nicotidamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) a gluconato-6-fosfato, com formação de nicotidamida-adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NAPDH) (3):

### G6P-DH

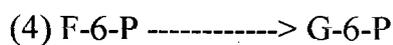


A quantidade de NADPH formada nesta reação é estequiometricamente igual à quantidade de glicose existente. O aumento de NADPH é medido através da leitura da absorbância, a 340 nm.

A F-6-P é convertida a G-6-P pela atuação da enzima fosfoglicose isomerase (PGI)

(4):

### PGI



Do mesmo modo que na reação (3), a G-6-P formada reage com o NADP formando gluconato-6-fosfato e NADPH. A quantidade de NADPH obtida nesta reação é estequiométrica com a quantidade de frutose existente. O aumento de NADPH é medido através do aumento da absorbância, a 340 nm.

#### III.3.5.2 Dosagem de glicose e frutose

O teste de determinação de glicose e frutose foi descrito por BEUTLER (1984) e adaptado para uso no sistema "Microtiter Reader"(SLT), espectrofotômetro onde utilizou-se placas de "ELISA" com 96 cavidades (POREP *et al.*, 1993b) . O volume total de cada cubeta é de 300 µL, sendo que para este teste o volume útil foi de 200µL. Os testes foram realizados a 37°C e as leituras de absorbância foram feitas a 340 nm.

**Curva de calibração:** uma curva de calibração foi preparada a cada análise, com soluções de frutose em concentrações variando entre 0,05 e 0,5 g/L. A absorbância das soluções foi lida a 340 nm e a Figura A.2, mostra um exemplo de curva de correlação linear obtida entre a absorbância e a concentração de frutose. Como a molécula de inulina contém apenas uma unidade de glicose, a quantidade de glicose liberada nas amostras foi considerada desprezível.

### **Reagentes utilizados:**

#### **\* Reagentes do MIX:**

- TEA (trietanolamina) 0,5-M pH 7,6 + MgCl<sub>2</sub> 30 mM
- ATP 27 mM
- NADP 20 mM

\* Amostra: as amostras a serem analisadas em Sistema "Microtiter Reader" foram diluídas de modo que a concentração de glicose e frutose não ultrapassasse ~ 0,5 g/L.

\* Hexoquinase (HK) ("from yeasts") 1400 U/mL (Boehringer/Mannheim)

\* Glicose-6-fosfato deidrogenase (G6P-DH) ("from yeasts") 1750 U/mL

(Boehringer/Mannheim)

\* Fosfo-glicose-isomerase (PGI) ("from yeasts") 3500 U/mL (Boehringer/Mannheim)

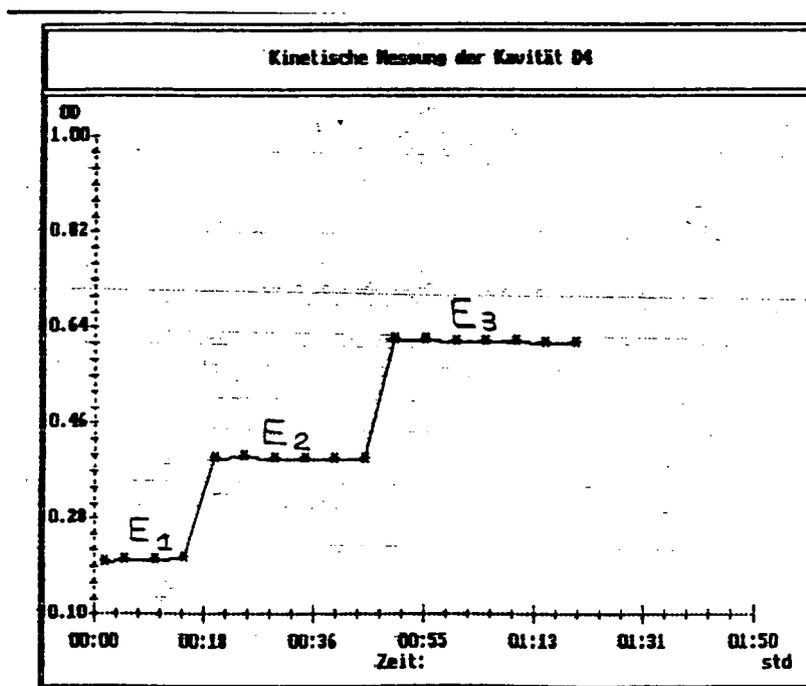
A Tabela III.3 mostra, de maneira esquemática, o procedimento do teste de determinação de glicose e frutose.

**TABELA III.3** Procedimento de determinação de glicose e frutose.

Soluções	Volume	Concentração no teste
Amostra	20 $\mu$ L	0,05 a 0,5 g/L de frutose
Água	90 $\mu$ L	-----
MIX:		TEA: 50 mM
TEA	20 $\mu$ L	MgCl <sub>2</sub> : 3 mM
ATP	20 $\mu$ L	ATP: 2,7 mM
NADP	10 $\mu$ L	NADP: 2,0 mM
1 °Leitura: (E1)*		
HK/G6P-DH	20 $\mu$ L	HK: 2,8 U/mL G6P-DH: 1,4 U/mL
2 °Leitura: (E2)*		
PGI	20 $\mu$ L	PGI : 5 U/mL
3 °Leitura: (E3)*		

\* Quatro leituras são feitas em intervalos de 5 minutos cada uma.

A Figura III.6 apresenta uma curva típica deste tipo de determinação, evidenciando os patamares E1, E2 e E3.



**FIGURA III.6** Curva típica obtida no teste de determinação de glicose e frutose no sistema "Microtiter Reader".

### **III.3.6 Determinação das características da exo-inulinase**

Os testes descritos a seguir foram realizados com frações de enzima em estado bruto (sem qualquer purificação prévia), proveniente de uma mesma fermentação.

#### **Estabilidade com o tempo**

O caldo enzimático (enzima ligada à parede ou contida no sobrenadante) foi congelado (-20°C) e testes de determinação da atividade enzimática foram realizados, periodicamente, durante 4 meses.

#### **Estabilidade com a temperatura**

Adicionou-se 0,5 mL do caldo enzimático (enzima ligada à parede ou contida no sobrenadante), devidamente diluído, a 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 e incubou-se sob diferentes temperaturas (30, 37, 45, 55, 60 e 70 °C) e tempos (2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos). Após cada intervalo de tempo, a solução foi colocada em banho de gelo e o teste de determinação da atividade enzimática foi realizado como descrito no item III.3.4.

#### **Efeito da temperatura na atividade enzimática**

Foram adicionados 200 µL do caldo enzimático (enzima ligada à parede celular ou contida no sobrenadante), devidamente diluído, a 800 µL de uma solução de inulina a 2% (p/v), dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. O tempo de incubação foi de 10 minutos, nas diferentes temperaturas : 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C. Após este

intervalo de tempo, a reação foi interrompida em água fervente e o teste de determinação de glicose e frutose foi realizado como descrito no item III.3.5.2.

### **Efeito do pH na atividade enzimática**

Soluções de inulina a 2% (p/v) foram preparadas em diferentes tampões, de acordo com a faixa de pH desejada:

- \* pH 2,5 e 3,0 - tampão McIlvaine (citrato-fosfato)
- \* pH 3,25 a 5,5 - tampão Walpole (acetato de sódio-0,2 M)
- \* pH 6,0 a 8,0 - tampão Sørensen (fosfato-0,2 M)

Adicionou-se 200  $\mu$ L do caldo enzimático (enzima ligada à parede ou contida no sobrenadante), devidamente diluído, a 800  $\mu$ L das diferentes soluções tampão e incubou-se a 50°C, por 10 minutos. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida em água fervente e o teste de determinação de glicose e frutose foi realizado como descrito no item III.3.5.2.

### **Estabilidade com pH**

Adicionou-se 1 mL do caldo enzimático (enzima ligada à parede ou contida no sobrenadante), devidamente diluído, a 1 mL da solução tampão, de acordo com o pH desejado (conforme descrito anteriormente) e incubou-se por 24 h a 30°C. Após este intervalo de tempo, foi realizado o teste de determinação da atividade enzimática conforme descrito no item III.3.4.

### **Determinação de $K_m$ e $V_{max}$**

Soluções de inulina, em diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 mM), foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A 800  $\mu$ L destas soluções foram adicionados 200  $\mu$ L do caldo enzimático, convenientemente diluído. As soluções foram incubadas por 10 min, a 50°C, em termomixer Eppendorf, sob agitação. Após este tempo, foi realizado o teste de determinação da atividade enzimática conforme descrito no item III.3.4.

Todos os testes referentes à cinética enzimática foram realizados em triplicata e o peso molecular da inulina (Serva) é igual a 5000.

### **III.3.7 Hidrólise da inulina**

A concentração de substrato foi determinada após hidrólise ácida da inulina.

Adicionou-se 800 $\mu$ L de ácido perclórico 0,3 M a 200  $\mu$ L da amostra a ser hidrolisada (proveniente do caldo de fermentação) e incubou-se em termomixer Eppendorf, sob agitação, por 15 min, a 80°C. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida com a incubação da amostra no gelo. Em seguida, determinou-se a concentração de frutose e glicose liberadas, através teste enzimático descrito no item III.3.5.2.

### **III.3.8 Determinação da concentração de etanol**

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia em fase gasosa, usando-se cromatógrafo HP 5890-Série II, com detector de ionização de chama, injetor

automático e coluna HP-FFAP (Cross-Linked) com dimensões de 10 m x 0,53 mm x 1  $\mu$ m.

**Condições de operação:**

\*gases de arraste: hélio e nitrogênio com fluxo de 15 mL/min e 20 mL/min, respectivamente.

\*gases da chama: hidrogênio e oxigênio com vazão de 35 mL/min e 300 mL/min respectivamente.

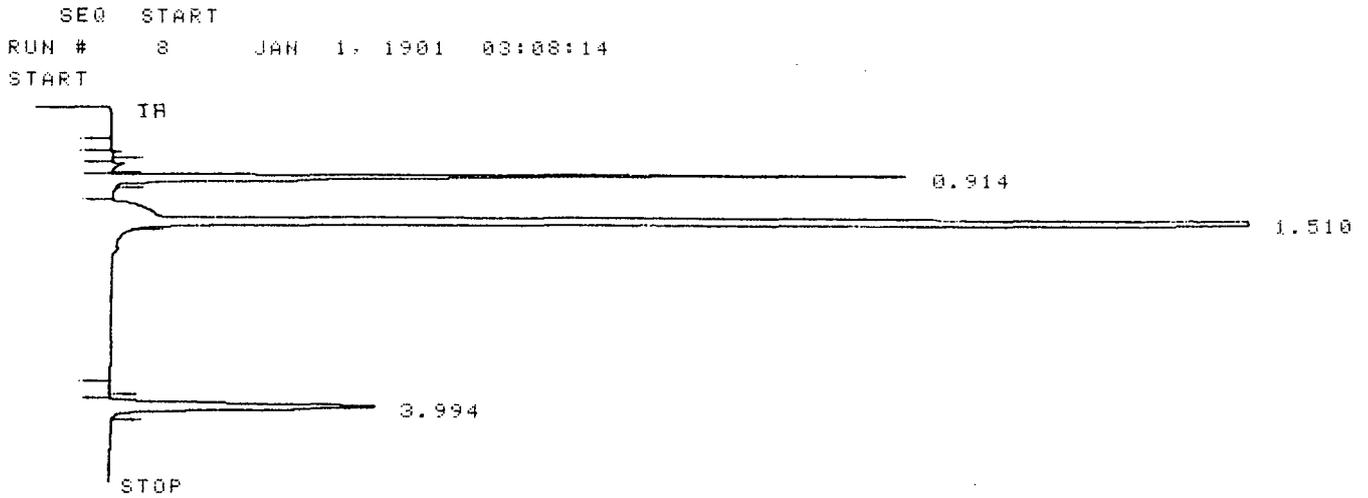
\*temperatura da coluna: 75 a 130°C

\*temperatura do detector: 230°C

\*volume de amostra : 1,0  $\mu$ L

\*padrão interno: isobutanol (1,0 g/L)

Uma curva de calibração foi preparada a cada série de testes, com concentração de etanol variando entre 0,3 e 4,0 g/L e acetoína (possível metabólito) variando entre 0,2 e 2,6 g/L. O tempo de análise foi de 5 minutos. As amostras, bem como os padrões, foram diluídos de forma que a concentração se encontrasse na faixa da curva de calibração. Em seguida, as amostras foram misturadas à solução de padrão interno em iguais proporções. Após ser constatado não haver acetoína em nenhuma condição de fermentação testada, o tempo de análise foi reduzido para 3,0 minutos. A Figura A.3, apresenta uma curva de calibração para etanol, enquanto que a Figura III.7 mostra um cromatograma típico deste tipo de análise.



RUN# 8 JAN 1, 1981 03:08:14

SAMPLE# 1

METHOD NAME: A\*CS00.MET

METODO PARA COLUNA DE 30 M

ISTD-AREA

RT	TYPE	AREA	WIDTH	HEIGHT	CAL#	G/L	NAME
.914	HH	31923	.048	11199	1R	.612	ETANOL
1.510	HH	172278	.069	41679	2S		ISOBUTANOL
3.994	BH	20962	.093	3743	3R	.366	ACETOINA

TOTAL AREA= 225163

MUL FACTOR=1.0000E+00

ISTD AMT=1.0000E+00

**FIGURA III.7** Cromatograma típico na análise de etanol por cromatografia em fase gasosa.

### III.3.9 Medida da concentração de oxigênio dissolvido

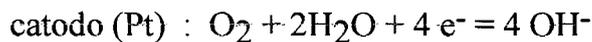
Durante as fermentações realizadas em fermentador MD - B.Braun, a pressão parcial de oxigênio dissolvido foi monitorada através de eletrodo polarográfico esterilizável INGOLD.

### III.3.9.1 Princípio de funcionamento do eletrodo

O eletrodo opera com princípio polarográfico e consiste de um anodo de prata e um catodo de platina, que são separados do meio de fermentação por uma membrana polimérica, permeável ao gás (oxigênio). O anodo e o catodo são conectados condutimetricamente por um eletrólito, que forma uma fina camada entre a membrana e o catodo.

Com uma voltagem adequada de polarização, o oxigênio, que se difunde através da membrana em direção ao catodo, é reduzido. Esta reação química produz uma corrente elétrica, que é diretamente proporcional à pressão parcial de oxigênio no meio.

Reações:



### III.3.9.2 Procedimento de calibração do eletrodo

\* Introduziu-se, no vaso de fermentação, uma corrente de nitrogênio, até que todo o oxigênio fosse expulso. Isto foi verificado através da estabilização da leitura da pressão parcial de oxigênio ( $p\text{O}_2$ ) em valores próximos a 0%. Neste momento definiu-se 0% de saturação de  $\text{O}_2$ .

\* A seguir, alterou-se a corrente, passando-se ar no sistema. No momento da saturação do meio com ar, este valor foi definido como 100%.

Este procedimento foi repetido por 3 vezes na própria cuba de fermentação, após esterilização, nas condições de operação (pH, temperatura, meio de cultivo).

### III.3.10 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_La$ )

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_La$ ) inicial foi determinado com base no método “gassing-out”, descrito por WISE, citado por RAINER (1990), que prevê a utilização de eletrodos com princípio polarográfico para medida da pressão parcial de oxigênio. Este método indireto, ou estático, por ser realizado na ausência de células, tem como princípio, medir a absorção de oxigênio em uma solução.

Inicialmente, preencheu-se o reator com o meio de cultura e ajustou-se as condições de operação. Em seguida, reduziu-se a zero a concentração de oxigênio dissolvido no líquido pela passagem de nitrogênio. Neste momento, reiniciou-se a aeração do líquido e registrou-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido em relação ao tempo.

A equação (2) descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

$$dC/dt = K_La (C^* - C) \quad (2)$$

onde  $C^*$  - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L)

$C$  - concentração de oxigênio dissolvido no instante  $t$  (mmol/L)

Rearranjando e integrando a equação (2) no intervalo de  $t=0$  a  $t=t$ , temos:

$$dC/(C^* - C) = K_La dt \quad (3)$$

$$\ln (C^* - C) = - K_L a t \quad (4)$$

ou ainda

$$\ln (1 - C/C^*) = - K_L a t \quad (5)$$

A equação (5) mantém uma correlação linear entre o  $\ln (1 - C/C^*)$  e o tempo, onde o coeficiente angular da reta fornece o valor de  $K_L a$ . No entanto, como a determinação da concentração de oxigênio na saturação é dificultada no meio de cultura devido à sua complexidade, definiu-se os seguintes limites de integração :

$$t=0 ; C = \alpha C^*$$

$$t=t ; C = \beta C^*$$

Portanto:

$$\ln (C^* - \beta C^*) / (C^* - \alpha C^*) = - K_L a t \quad (6)$$

$$\ln (1 - \beta) / (1 - \alpha) = - K_L a t \quad (7)$$

onde  $\alpha$  é 10% da concentração de saturação em oxigênio e  $\beta$  varia de 10 a 80% da concentração de saturação em oxigênio.

### III.4. METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS

#### III.4.1 Concentração de glicose e frutose

Expressões:

(E2 - E1): valor de absorvância a ser correlacionado à concentração de glicose

(E3 - E2): valor de absorvância a ser correlacionado à concentração de frutose

Equação:

$$(E3 - E2)_{\text{Amostra}} - (E3 - E2)_{\text{Branco}} = \text{abs} \quad (8)$$

Curva de calibração:

$$F = a + b * \text{abs} \quad (9)$$

onde F= concentração de frutose (g/L)

abs = absorvância

A equação obtida para a curva de calibração serviu para determinar a concentração de frutose (g/L) nas amostras.

### III.4.2 Determinação da atividade enzimática (AE)

Uma vez obtido o valor de concentração de frutose, procedeu-se o cálculo da atividade enzimática (U/mL) para 10 minutos de reação.

Uma unidade de inulinase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de frutose por minuto de reação nas condições de análise: [U] = [ $\mu\text{mol}$  frutose/min de reação].

$$AE = \frac{[F] \cdot 10^6}{180 \cdot 1000 \cdot 10} \quad (10)$$

onde: AE = atividade enzimática (U/mL)

[F] = concentração de frutose (g/L)

$10^6$  = fator de conversão mol ---->  $\mu\text{mol}$

180 = peso molecular da frutose

1000 = fator de conversão L -- -> mL

10 = tempo de reação (min)

$$AE \text{ (U/mL)} = F \text{ (g/L)} \cdot \frac{0,556 \mu\text{mol} \cdot \text{L}}{\text{g} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}} \quad (11)$$

Os cálculos são realizados da mesma forma para ambas as frações de enzima e a atividade enzimática total é obtida pela soma destes valores:

$$AET = AES + AEP \quad (12)$$

onde: AES = atividade enzimática extracelular ou contida no sobrenadante.

AEP = atividade ligada à parede ou periplasmática.

### III.4.3 Concentração de inulina

Para o cálculo da concentração de substrato, procedeu-se conforme descrito no item III.4.1. A concentração de frutose é diretamente correlacionada com a quantidade de inulina presente na amostra.

### III.4.4 Fatores de conversão

Fator de conversão de substrato em produto: (U de inulinase prod/g de substrato cons)

$$Y_{P/S} = (AET_{\max} - AET_0) / (S_0 - S_f) * 10^3 \quad (13)$$

Fator de conversão de substrato em células : (g de células/g de substrato)

$$Y_{X/S} = (X_{\max} - X_0) / (S_0 - S_f) \quad (14)$$

Onde:

$X_{\max}$ ,  $AET_{\max}$  : valores máximos de concentração celular (g/L) e atividade enzimática total (U/mL), respectivamente;

$X_0$ ,  $S_0$ ,  $AET_0$  : valores iniciais de concentração celular (g/L), concentração de substrato (g/L) e atividade enzimática total (U/mL), respectivamente;

$S_f$  : concentração final de substrato (g/L)

### III.4.5 Produtividade

Produtividade em enzima ( $U \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ):

$$P_{AE} = (AET_{\max}/t) * 10^3 \quad (15)$$

Produtividade em células ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ):

$$P_X = (X_{\max}/t) \quad (16)$$

Produtividade específica ( $U/ g \text{ células} \cdot h^{-1}$ ):

$$P_{\text{esp}} = AET_{\max} / t \cdot X' * 10^3 \quad (17)$$

Onde:

$t$  = tempo de fermentação (h) correspondente a  $AET_{\max}$  (U/mL) ou a  $X_{\max}$  (g/L)

$X'$  = concentração celular (g/L) correspondente à  $AET_{\max}$  (U/mL)

### III.4.6 Atividade enzimática específica (U/g de células)

$$AET_{\text{esp}} = AET_{\text{max}} / X' * 10^3 \quad (18)$$

Onde :X' = concentração celular (g/L) correspondente à  $AET_{\text{max}}$  (U/mL)

### III.4.7 Velocidades instantâneas e específicas

A partir dos perfis de concentração celular, formação de produto e consumo de substrato com o tempo, foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano ( $dX/dt$ ), formação de produto ( $dP/dt$ ) e consumo de substrato ( $dS/dt$ ).

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular no ponto, obtém-se as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ), formação de produto ( $\mu_p$ ) e consumo de substrato ( $\mu_s$ ):

$$\mu = 1/X \, dX/dt \quad (19)$$

$$\mu_p = 1/X \, dP/dt \quad (20)$$

$$\mu_s = 1/X \, dS/dt \quad (21)$$

As velocidades instantâneas e específicas de crescimento, formação de produto e consumo de substrato foram determinadas segundo metodologia descrita por LE DUY & ZAJIC (1973). Para isto, foram traçadas curvas suavizadas a partir dos pontos experimentais. O intervalo de tempo para retirada dos valores de concentração foi de 30 minutos.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada através do coeficiente angular da reta obtida relacionando o logaritmo neperiano da concentração celular com o tempo.

#### **III.4.8 Velocidade máxima de reação ( $V_{\max}$ ) e Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para inulinase**

A partir de um conjunto de medidas de velocidade de reação, para diferentes concentrações de substrato, determinou-se  $K_m$  e  $V_{\max}$  segundo o método descrito por Lineweaver-Burk (BAILEY & OLLIS, 1986), correlacionando o inverso da velocidade de reação com o inverso da concentração de substrato. A expressão 22 mostra que, analogamente à equação da reta, o coeficiente linear e o coeficiente angular permitem estimar os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten.

$$1/V = 1/V_{\max} + K_m/V_{\max} * 1/S \quad (22)$$

onde ` V= velocidade em diferentes concentrações de substrato ( $g \cdot L^{-1} \cdot \min^{-1}$ )

S = concentração de substrato (mM)

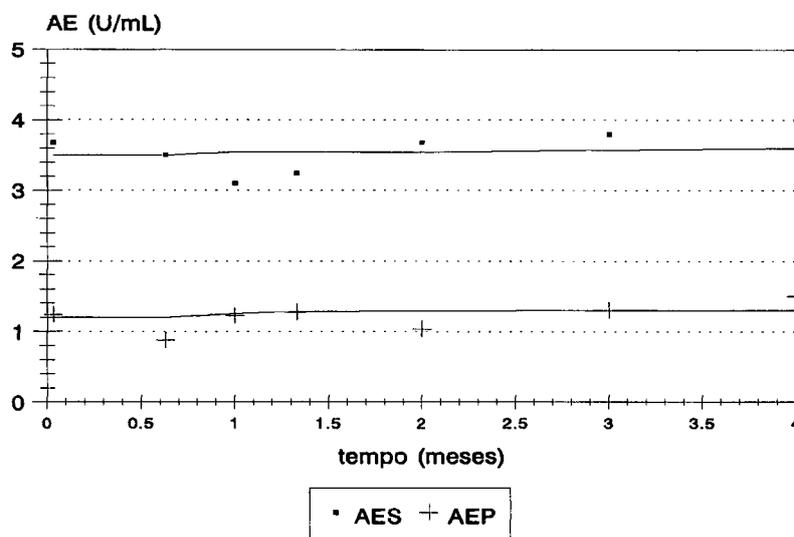
## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA EXO-INULINASE PRODUZIDA POR *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907

#### IV.1.1 Estabilidade com o tempo

Porções de inulinase extracelular e ligada à parede foram estocadas em freezer (-20°C), por 4 meses. Periodicamente, alíquotas foram descongeladas e analisadas quanto à atividade enzimática. Como pode ser observado na Figura IV.1, a enzima se mostrou completamente estável, independentemente da sua localização, durante os 4 meses de armazenamento.

Diferentemente do trabalho de EFSTATHIOU *et al.* (1986), sobre a estabilidade da inulinase solúvel não dialisada de *Clostridium acetobutylicum*, não houve necessidade de conservar a enzima em tampão acetato para manter a sua estabilidade.



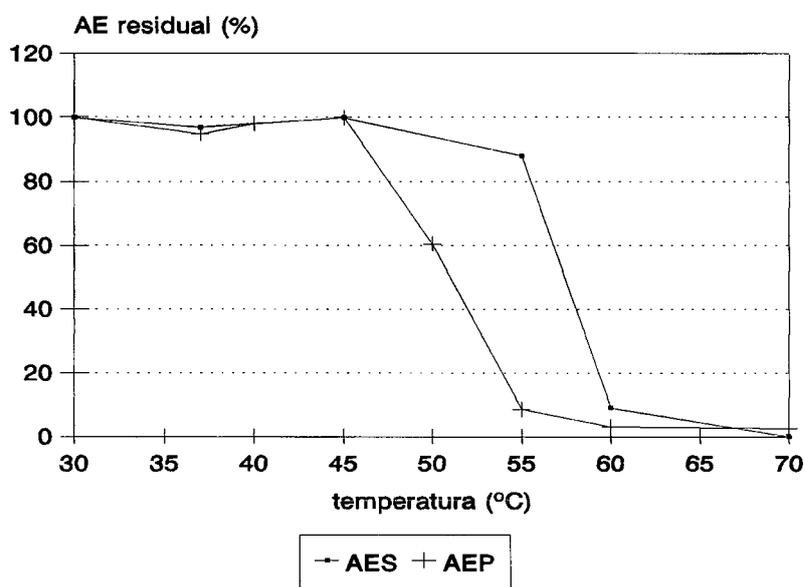
**FIGURA IV.1** Estabilidade da enzima extracelular (AES) e periplasmática (AEP) em função do tempo de estocagem.

#### IV 1.2 Estabilidade com a temperatura

Conforme descrito no item III.3.6, as duas frações de enzima foram incubadas por 60 minutos em temperaturas variando entre 30 e 70°C. As enzimas foram avaliadas, periodicamente, quanto à atividade residual, à temperatura de 50°C e os resultados obtidos revelaram comportamentos ligeiramente distintos (Figura IV.2). A inulinase extracelular de *K. marxianus* ATCC 36907 se manteve razoavelmente estável até a temperatura de 55°C, mas perdeu drasticamente a atividade em temperaturas mais elevadas. Resultados similares foram encontrados por NEGORO & KITO (1973a), em estudos sobre a estabilidade da inulinase intracelular de *Candida kefyr*. Por outro lado, a enzima ligada à parede celular foi sensível a temperaturas acima de 45°C. A 55°C a atividade residual da enzima periplasmática foi de 6,5%, enquanto que para enzima extracelular, 88% da atividade foi mantida a esta temperatura. Segundo HENSING *et al.* (1993), a inulinase periplasmática de *K. marxianus* é um tetrâmero, enquanto que a enzima secretada para o meio é dímero. Estas diferenças na estrutura podem conferir propriedades distintas, ou seja, comportamentos diferentes da enzima face a um mesmo parâmetro.

Da mesma forma, determinadas substâncias presentes na composição do meio poderiam explicar esta maior estabilidade para a inulinase extracelular, como sugeriram GUPTA *et al.* (1994a). Estes autores, avaliaram a estabilidade da inulinase extracelular bruta, purificada e imobilizada de *K. fragilis* e notaram que a inulinase bruta foi a mais estável para as temperaturas testadas (ver item II.3.1.2). Isto poderia ocorrer devido a interação entre vários metabólitos presentes no extrato bruto, como polióis e proteínas,

que protegem a enzima contra a desnaturação térmica. Todavia, como neste trabalho estudou-se apenas a estabilidade da inulinase bruta, não se pode afirmar que, após purificação, a enzima manteria o mesmo comportamento.



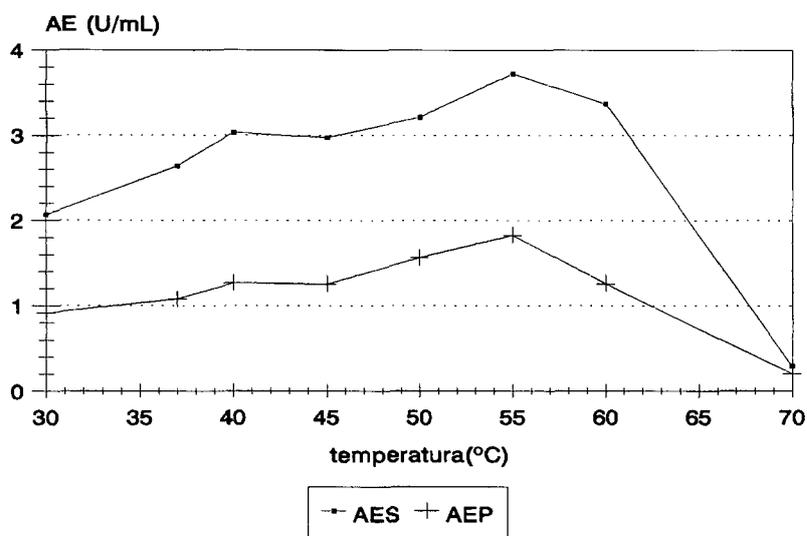
**FIGURA IV.2** Atividade residual das enzimas extracelular (AES) e periplasmática (AEP) após incubação por 1 h, em diferentes temperaturas, em tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0.

#### IV.1.3 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática (Temperatura ótima)

A temperatura de incubação para realização do teste enzimático variou entre 30 e 70°C e os resultados obtidos revelaram que, independentemente da localização da enzima (AES ou AEP), a faixa ideal de temperatura para atuação da inulinase ficou entre 50 e 60°C, apresentando um valor ótimo em 55°C (Figura IV.3). Resultado idêntico foi obtido por GUPTA *et al.* (1994a), estudando o comportamento da inulinase extracelular bruta, purificada e imobilizada de *K. fragilis*. Por outro lado, MANZONI E CAVAZZONI (1988), estudando o efeito da temperatura sobre a atividade inulinolítica das leveduras *C. kefyri*,

*C. pseudotropicalis*, *K. cicerisporus* e *K. fragilis*, observaram que a atividade máxima foi obtida a 60°C. Temperaturas acima de 60°C promoveram uma rápida perda de atividade. ROUWENHORST *et al.* (1988), por sua vez, verificaram que a temperatura ótima de atuação da inulinase de *K. marxianus* CBS 6556 foi 50°C. Para valores acima de 70°C, nenhuma atividade inulinolítica foi detectada.

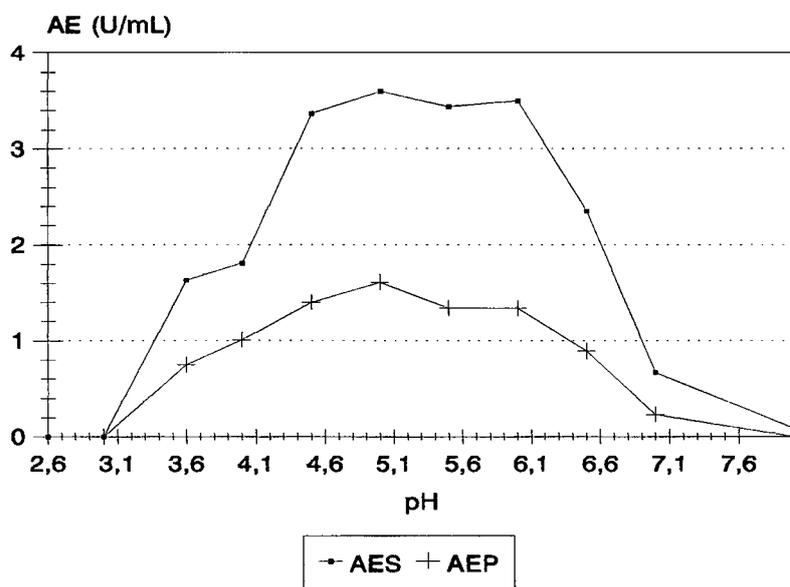
Apesar da temperatura de 55°C ter sido a ótima, o teste de determinação da atividade enzimática continuou sendo conduzido a 50°C, uma vez que esta temperatura tem sido descrita na literatura (ROUWENHORST, 1990; TSANG & GROOTWASSINK, 1988; MANZONI & CAVAZZONI, 1988) para realização deste teste e se encontra dentro da faixa ideal de atuação da enzima. À temperatura de 50°C, 86,5% e 83,3% da atividade foram mantidas para enzima extracelular e periplasmática, respectivamente.



**FIGURA IV.3** Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas extracelular (AES) e periplasmática (AEP).

#### IV.1.4 Efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH ótimo) e estabilidade com pH

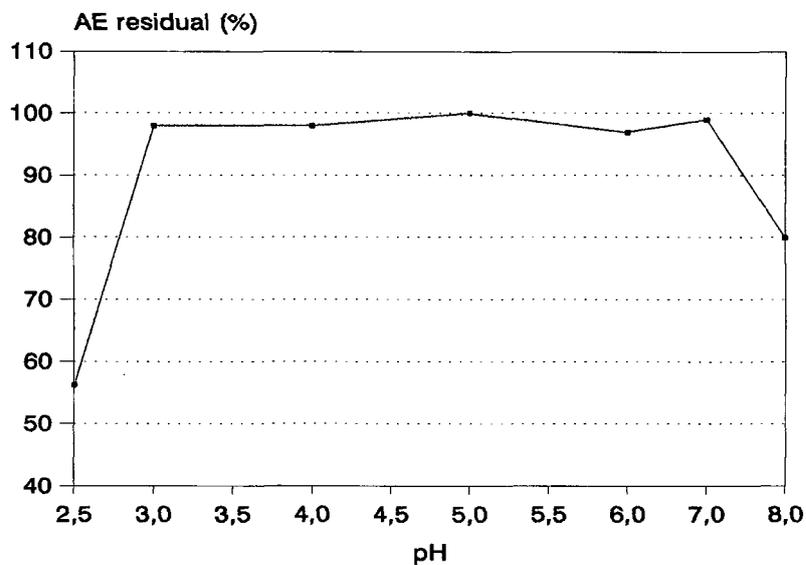
Após realização do teste de atividade enzimática em diferentes valores de pH (2,5 a 8,0), definiu-se a faixa ótima de pH para atuação de ambas as enzimas entre 4,5 e 6,0 (Figura IV.4). Para valores externos à esta faixa, uma redução drástica na atividade enzimática foi observada. O máximo valor de pH ótimo descrito na literatura para inulinases de leveduras é 5,5 (Tabela II.5). É importante, para fins industriais, que o pH ótimo de atuação da enzima seja baixo, para evitar contaminação de origem bacteriana, sendo porém, vantajoso que a enzima tenha capacidade de atuar em uma faixa ampla de pH, pois isto flexibiliza o processo.



**FIGURA IV.4** Efeito do pH sobre a atividade das enzimas extracelular (AES) e periplasmática (AEP).

A estabilidade da enzima com o pH foi verificada após 24 h de incubação, em valores de pH variando entre 2,5 e 8,0 (Figura IV.5). Para valores de pH entre 3,0 e 7,0, a atividade extracelular foi constante, sendo que apenas 60% da atividade foi mantida em

pH 2,5. Não foi possível, no entanto, avaliar a estabilidade da enzima periplasmática com o pH, uma vez que ao se misturar o caldo enzimático com as diferentes soluções tampão, os valores de pH das diferentes misturas se mantiveram entre 5,7 e 7,2. Este efeito pode ser atribuído ao procedimento de liberação da enzima com tampão fosfato de potássio. Além do íon fosfato ter a capacidade de estabilizar a enzima, esta se encontra solúvel neste meio tamponante. Desta maneira, a mudança no valor do pH, após adição de outro tampão, foi muito pequena.



**FIGURA IV.5** Atividade residual da enzima extracelular (AES) após incubação por 24 horas, a 30°C, em diferentes valores de pH.

#### IV.1.5 Determinação de $K_m$ e $V_{max}$

Conforme descrito no item III.4.8, os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram estimados através do método descrito por Lineweaver-Burk (BAILEY & OLLIS, 1986), para porção enzimática extracelular com atividade igual a 3,6 U/mL. Para tanto, relacionou-se para diferentes concentrações de substrato, a concentração de produto formado (frutose) com o

tempo (Figura B.1). O coeficiente angular das várias retas obtidas forneceu a velocidade de reação para cada concentração de substrato testada. A dificuldade em se determinar  $K_m$  e  $V_{max}$  deveu-se ao perfil sigmoidal obtido no traçado da velocidade de reação em função da concentração de inulina. GUPTA *et al.* (1994) também observaram este perfil sigmoidal para inulinase de *K. fragilis*, tendo inulina como substrato. Os autores atribuíram este comportamento à capacidade da inulinase em hidrolisar a inulina sucessivamente, a partir do terminal não redutor, liberando frutose e um homólogo mais curto da inulina. Este homólogo passa a ser um novo substrato para liberação da frutose, podendo resultar em um aumento da velocidade de hidrólise. Este modo de ação, onde o produto se torna substrato para subsequente ação da enzima pode levar a um comportamento não hiperbólico.

De posse dos valores obtidos, relacionou-se o inverso da velocidade em função do inverso da concentração de substrato, como apresentado na Figura IV.6.

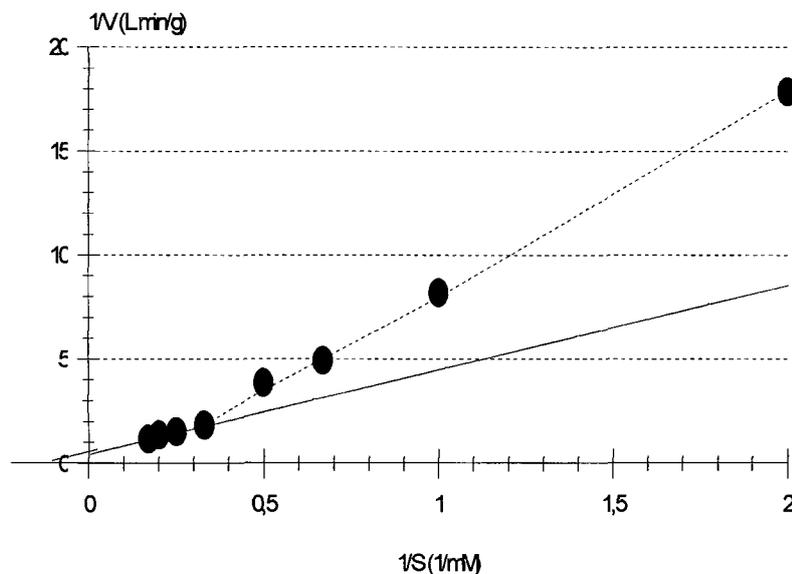
Decidiu-se, portanto, estimar os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  a partir de concentrações mais elevadas de substrato. A equação obtida foi a seguinte:

$$1/V = a + b 1/S \quad (1)$$

Esta equação forneceu um valor de  $K_m$  igual a 7,79 mM e  $V_{max}$  igual a 1,93 g L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Valores de  $K_m$  da mesma grandeza foram encontrados para inulinase de *K. marxianus* tendo rafinose como substrato (ROUWENHORST *et al.*, 1988), para inulinase de

*Bacillus subtilis* (VULLO *et al.*, 1991) e para células livres de *K. marxianus* contendo inulinase (BAJPAI & MARGARITIS, 1985).

Segundo, GROOTWASSINK & FLEMING (1980), uma forma de contornar os problemas de estimação dos parâmetros cinéticos, tendo inulina como substrato, é a utilização de oligossacarídeos com crescentes graus de polimerização. Os autores utilizaram sacarose, rafinose e estaquiose como substratos para determinação de  $K_m$  e constataram que um aumento no comprimento da cadeia do substrato levou a um drástico aumento do valor de  $K_m$  para invertase, enquanto que para inulinase o aumento não foi marcante. No entanto, não foi possível, neste trabalho, utilizar tais oligômeros a fim de se confirmar os resultados.



**FIGURA IV.6** Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) pelo método descrito por Lineweaver-Burk.

## IV.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MEIO E DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NO CRESCIMENTO CELULAR E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### IV.2.1 Influência da temperatura

A influência da temperatura foi avaliada no cultivo de *K. marxianus* ATCC 36907, realizado em frascos de Erlenmeyer, visando a produção de inulinase.

Os resultados estão resumidos na Tabela IV.1. As curvas de crescimento e de atividade enzimática total se encontram no apêndice B (Figuras B.2 e B.3).

**TABELA IV.1** Resultados gerais das fermentações realizadas sob diferentes temperaturas.

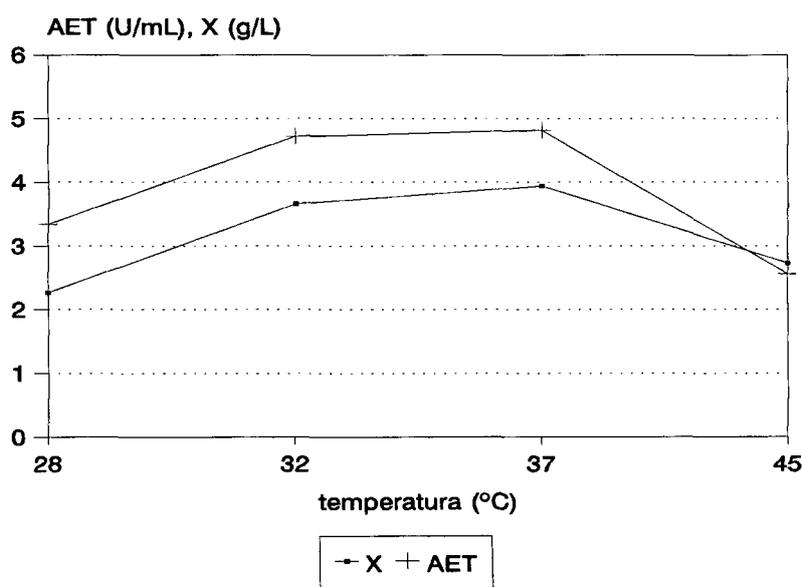
Temperatura	AET <sub>max</sub> (U/mL)	X <sub>max</sub> (g/L)	AET <sub>esp</sub> (U/g)	Y <sub>P/S</sub> (U/g)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )
28°C	6,60	9,00	733	660	0,90	0,70
32°C	9,65	9,40	1.026	965	0,94	0,74
37°C	9,40	7,30	1.287	940	0,73	0,82
45°C	4,40	4,50	978	440	0,45	0,84

Os valores máximos de atividade volumétrica e específica, assim como do fator de conversão de substrato em produto, foram obtidos nas temperaturas de 32 e 37°C.

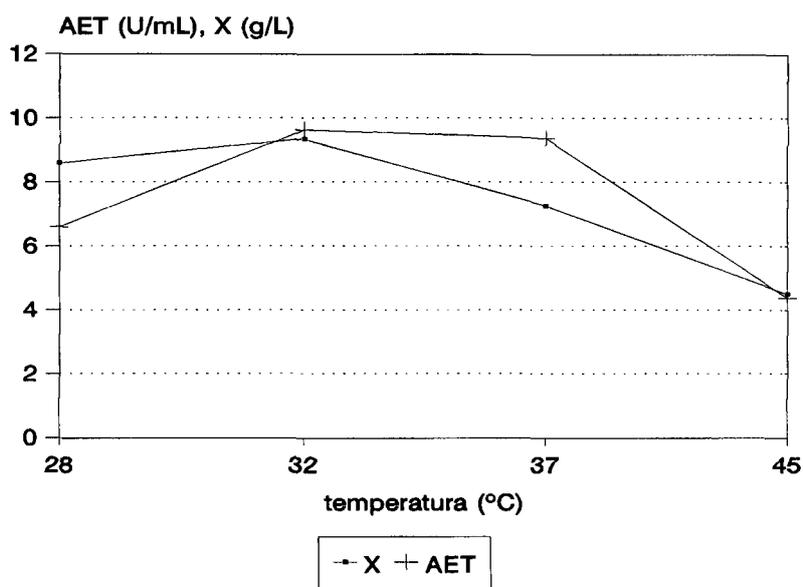
A capacidade de *K. marxianus* ATCC 36907 se desenvolver com facilidade a temperaturas elevadas pode ser constatada pelos altos valores de velocidade específica de

crescimento. Conforme descrito na Tabela IV.1, valores de  $\mu_{\max}$  de 0,82 e 0,84  $\text{h}^{-1}$  foram obtidos nas temperaturas de 37 e 45 °C, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por ROUWENHORST *et al.*, (1988) para faixa de temperatura compreendida entre 37 e 42 °C.

As Figuras IV.7 (a) e IV.7 (b) mostram o efeito da temperatura sobre a cultura, levando em consideração duas fases do crescimento celular. (a) fase de crescimento exponencial (10 horas de cultivo) e (b) fase estacionária de crescimento (48 horas de cultivo). Para células que se encontravam na fase exponencial de crescimento, a temperatura ótima para formação de células e síntese da enzima foi de 32 a 37°C. Em fase estacionária de crescimento, a faixa ótima de temperatura para produção de enzima foi de 32 e 37°C, enquanto que a maior concentração celular foi obtida entre 28 e 32°C.



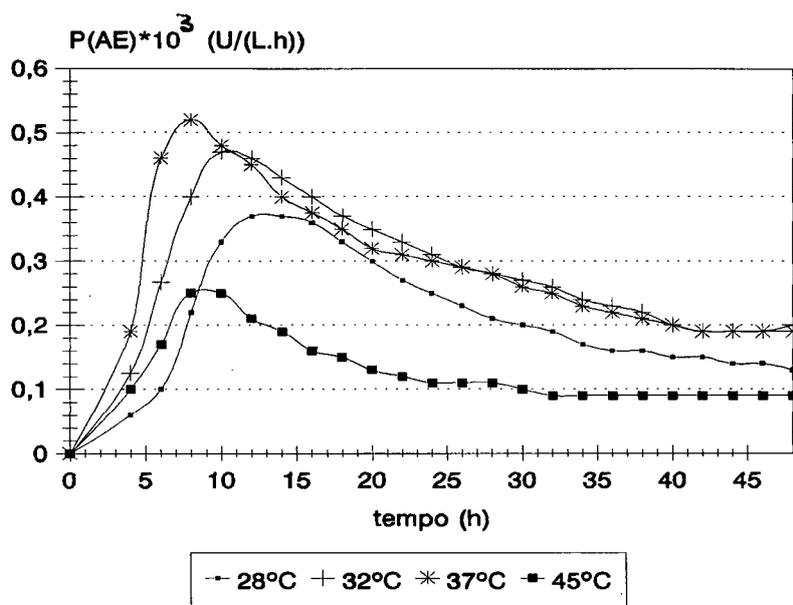
**FIGURA IV.7 (a)** Concentração celular (X) e atividade enzimática total (AET), em função da temperatura, após 10 horas de cultivo.



**FIGURA IV.7 (b)** Concentração celular (X) e atividade enzimática total (AET), em função da temperatura, após 48 horas de cultivo.

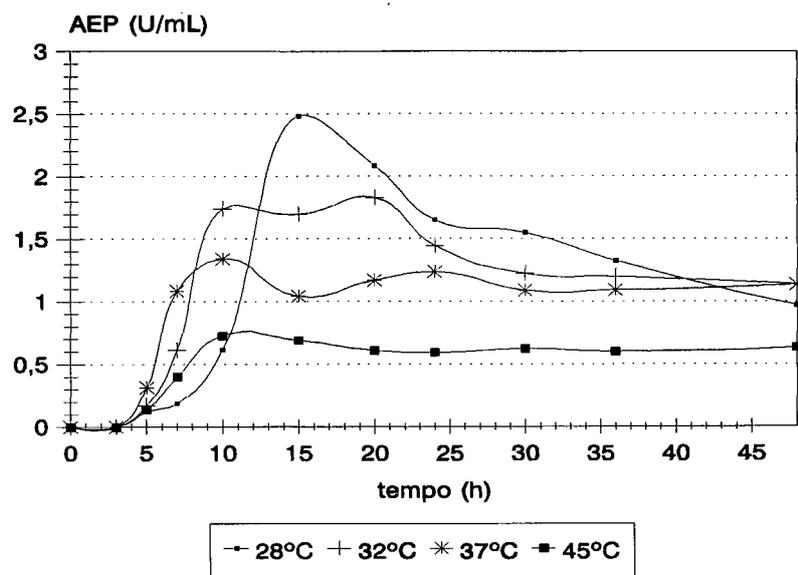
Estas observações estão próximas àquelas feitas por dois outros grupos de pesquisa. GROOTWASSINK & FLEMING (1980) obtiveram, independentemente da fase de cultivo, temperaturas ótimas distintas para o crescimento celular (36 e 26°C para culturas na fase exponencial e estacionária, respectivamente) e para produção de enzima (33 e 30°, respectivamente). ROUWENHORST *et al.* (1988), por sua vez, reportaram uma mesma faixa de temperatura (37 e 42°C) para produção de enzima e crescimento celular.

A Figura IV.8 mostra os perfis de produtividade em enzima ( $P_{AE}$ ), em função do tempo de cultivo, para as diferentes condições de temperatura avaliadas. Como se pode notar, a temperatura de 37°C proporcionou valores mais elevados de produtividade, tendo sido, portanto, escolhida para a continuidade dos trabalhos.

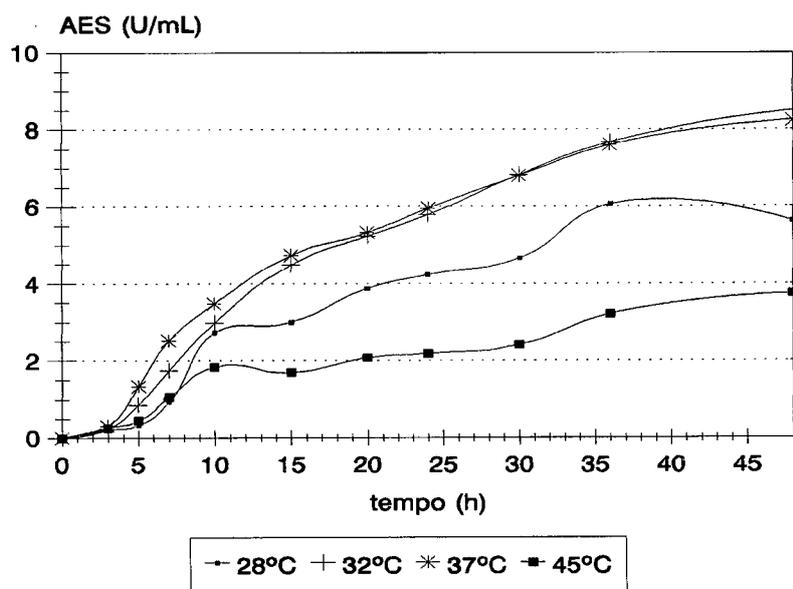


**FIGURA IV.8** Produtividade em enzima ( $P_{AE}$ ), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.

Quanto ao efeito da temperatura sobre a localização da enzima, observou-se que o acúmulo de enzima na parede celular diminui com o aumento da temperatura (Figura IV.9). No entanto, a maior porção de enzima é sempre encontrada solúvel no sobrenadante (Figura IV.10). Pelos perfis das curvas obtidas para enzima ligada à parede (Figura IV.9), pode-se notar que há um acúmulo de enzima até um certo tempo de fermentação, quando então a atividade enzimática periplasmática começa a decrescer.



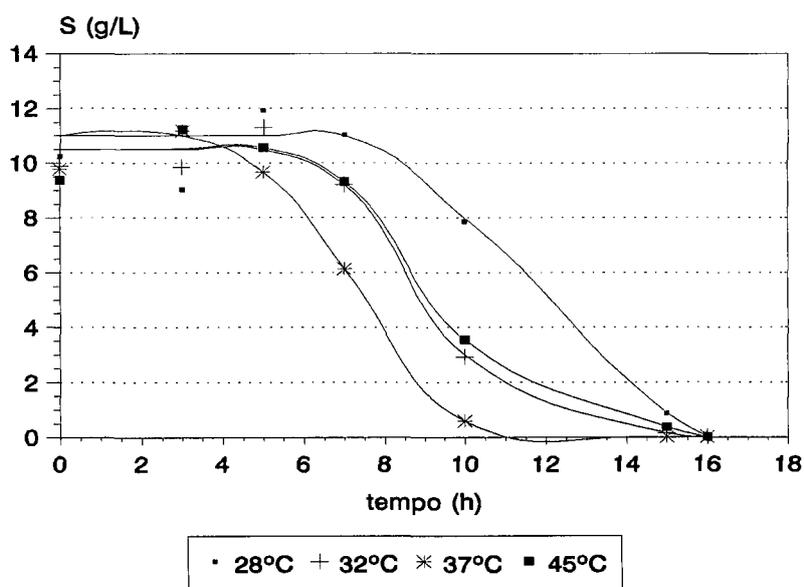
**FIGURA IV.9** Atividade enzimática periplasmática (AEP), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.



**FIGURA IV.10** Atividade enzimática extracelular (AES), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.

O acúmulo de enzima no espaço periplasmático ocorre simultaneamente ao consumo de substrato e ao crescimento celular. No momento em que não há mais substrato, a enzima retida na parede passa a ser secretada para o meio de cultivo. Este efeito pode ser explicado como uma forma que o microrganismo dispõe para sua manutenção, uma vez que a pressão osmótica diminui em função do consumo de substrato. Possivelmente, ocorre também lise celular, levando a um aumento da porção de enzima localizada no sobrenadante.

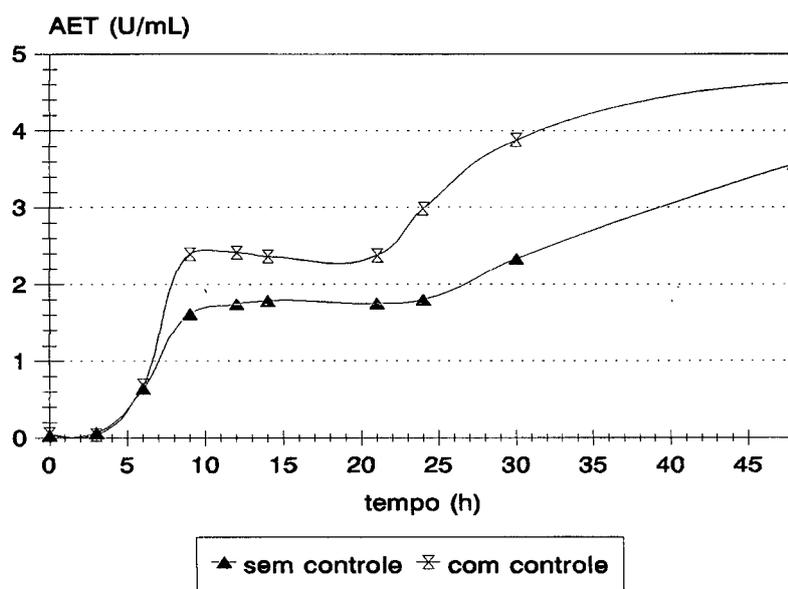
Pode-se tentar, então, relacionar o instante em que ocorre o acúmulo máximo da enzima ligada à parede, ao esgotamento do substrato no meio. Observa-se que, para a temperatura de 28°C, na qual a velocidade de consumo de substrato foi menor (Figura IV.11), ocorreu uma defasagem no pico de atividade enzimática na parede em relação às demais temperaturas.



**FIGURA IV.11** Concentração de substrato (S), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.

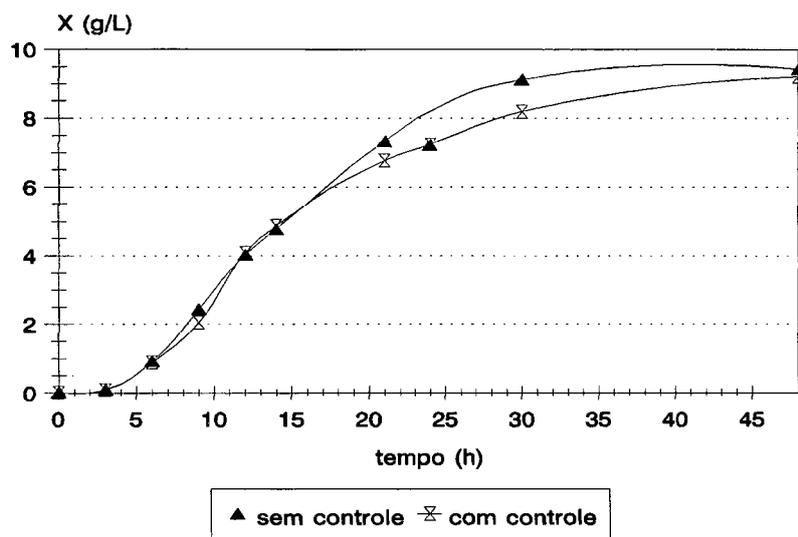
### IV.2.2 Influência do pH

O estudo sobre a influência do controle do pH foi realizado em frascos agitados, conforme descrito no item III.2.1. Os resultados revelaram que o controle do pH em 4,5 é favorável à produção de inulinase, não interferindo, significativamente, no crescimento celular, como pode se observar através das Figuras IV.12 e IV.13, respectivamente.



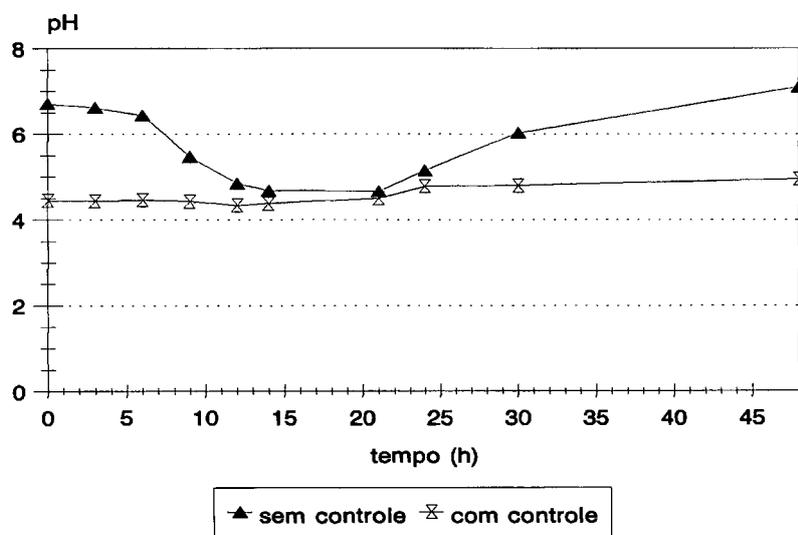
**FIGURA IV.12** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, em meio com e sem controle de pH.

O pH, inicialmente controlado, subiu de 4,4 para 4,8 no decorrer da fermentação, provavelmente devido a um consumo do íon sódio pelo microrganismo (Figura IV.14). Este efeito foi observado por SNYDER & PHAFF (1960), quando tampão succinato foi utilizado para controlar o pH em 5,0. Neste caso, o pH subiu de 5,1 para 5,8.



**FIGURA IV.13** Concentração celular (X), em função do tempo, em meio com e sem controle de pH.

No experimento realizado sem controle de pH, foi observado uma diminuição do pH de 6,5 para 4,7, seguido de uma elevação, finalizando a fermentação em pH 7,0. Esta elevação só ocorreu a partir do momento em que o substrato foi esgotado.

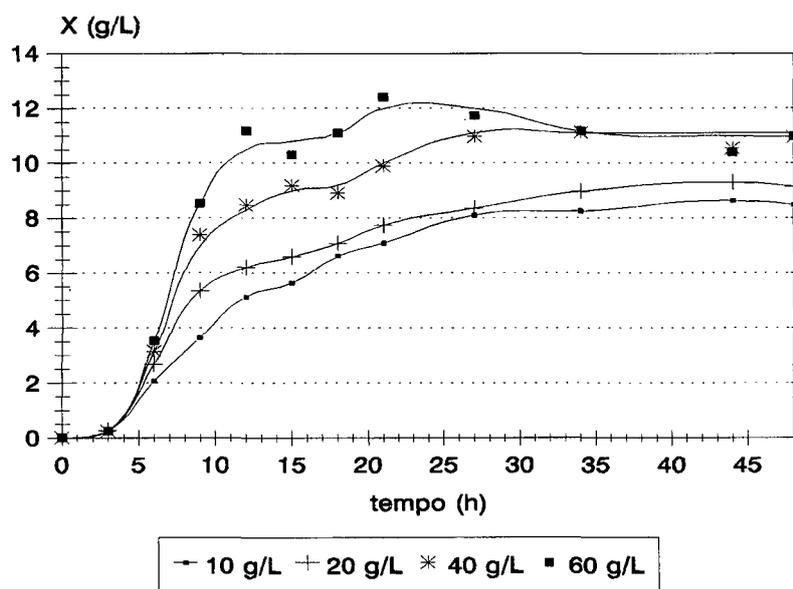


**FIGURA IV.14** Evolução do pH, em função do tempo, em meio com e sem controle de pH.

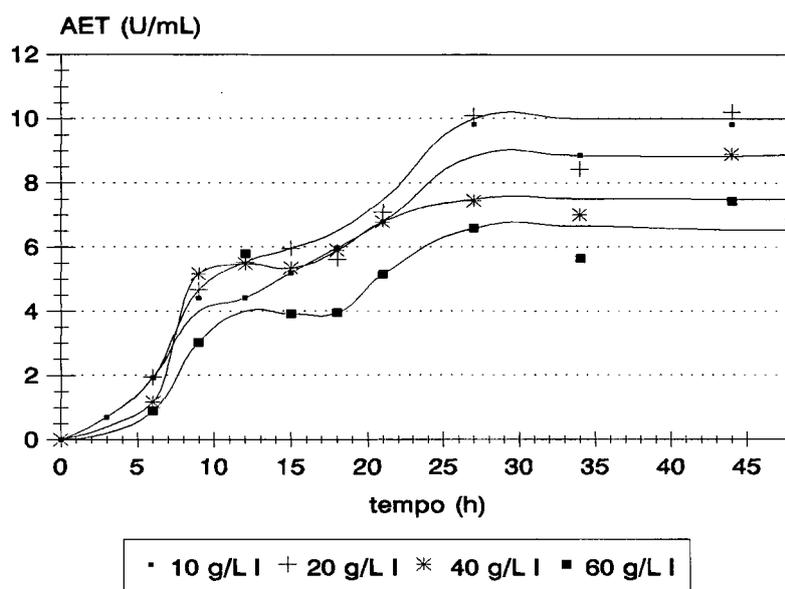
### IV.2.3 Influência da concentração inicial de substrato

Diferentes concentrações iniciais de inulina (10 a 60 g/L) foram avaliadas quanto à formação de inulinase. Os perfis das curvas de crescimento e atividade enzimática total estão representados nas Figuras IV.15 e IV.16.

Pode-se observar que aumento da concentração inicial de substrato foi favorável a produção de células. Concentrações de inulina até 20 g/L aumentaram a atividade enzimática. No entanto, a partir deste valor, o aumento da concentração de inulina afetou negativamente a formação de enzima.



**FIGURA IV.15** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações iniciais de substrato.



**FIGURA IV.16** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações iniciais de substrato.

A Tabela IV.2, apresenta alguns parâmetros cinéticos em função da concentração inicial de substrato no meio de cultivo.

**TABELA IV.2** Resultados gerais das fermentações utilizando diferentes concentrações iniciais de substrato.

Inulina (g/L)	$AET_{max}$ (U/mL)	$X_{max}$ (g/L)	$AET_{esp}$ (U/g)	$Y_{P/S}$ (U/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$P_{AE}$ (U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
10	9,00	8,50	1.125	900	0,85	333	0,62
20	10,00	9,00	1.212	500	0,45	370	0,96
40	7,50	11,00	682	190	0,27	312	1,01
60	6,75	12,00	562	112	0,20	250	1,04

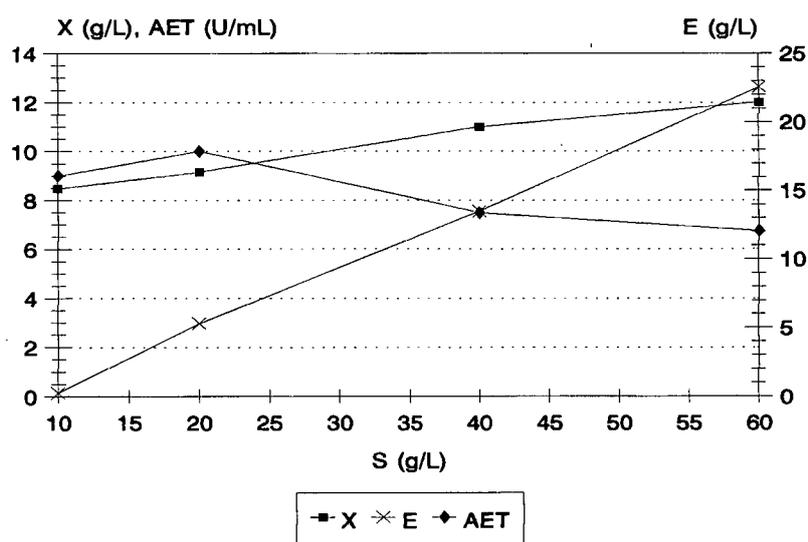
A maior produtividade ocorreu com 20 g/L de substrato inicial, enquanto que a melhor conversão de substrato em enzima foi obtida com 10 g/L de inulina, onde cada grama forneceu 0,9 U. Os valores máximos de atividade enzimática volumétrica e específica foram obtidos para as concentrações de 10 e 20 g/L de inulina.

A Figura IV.17 mostra os valores de concentração celular, atividade enzimática total e concentração de etanol em 48 horas de cultivo. Como se pode observar, a concentração de etanol aumenta drasticamente com a elevação da concentração inicial de inulina no meio, nas condições de cultivo utilizadas. Acredita-se, porém, que a transferência de oxigênio não tenha sido adequada e que uma possível limitação deste substrato tenha favorecido a formação de etanol, em detrimento da formação de inulinase, para concentrações crescentes de inulina. A partir dos resultados, sugere-se que o aumento da concentração inicial de inulina tenha levado a um desvio da via metabólica oxidativa para via fermentativa, resultando na produção de etanol. Portanto, nas condições de trabalho utilizadas, pode-se dizer que concentrações iniciais de inulina acima de 20 g/L desfavorecem a produção de inulinase.

Resultados similares são reportados na literatura. Concentrações de frutano acima de 30 g/L não foram favoráveis à síntese de inulinase por *Fusarium oxysporum*, levando a uma redução de aproximadamente 50% na atividade enzimática (GUPTA *et al.*, 1990). A levedura *K. fragilis* foi, no entanto, mais sensível a concentrações elevadas de inulina, apresentando um decréscimo na atividade enzimática quando concentrações superiores a 15 g/L foram empregadas (GUPTA *et al.*, 1994a).

GROOTWASSINK & HEWITT (1983), estudando a produção de inulinase por *K. fragilis* em frascos agitados, observaram que a síntese de inulinase era intensificada no final da fase de crescimento, em meio contendo glicose, frutose ou sacarose. Considerando que o crescimento foi realizado em condições de limitação pelo substrato, supõe-se que baixas concentrações de açúcar, observadas no final da fase de crescimento, sejam pré requisitos para síntese de inulinase. As elevadas concentrações iniciais de substrato causaram, provavelmente, repressão catabólica.

A concentração inicial de 10 g/L de inulina foi escolhida para dar continuidade aos trabalhos.



**FIGURA IV.17** Concentração de etanol (E), células(X) e atividade enzimática total (AET), para diferentes concentrações iniciais de substrato (S).

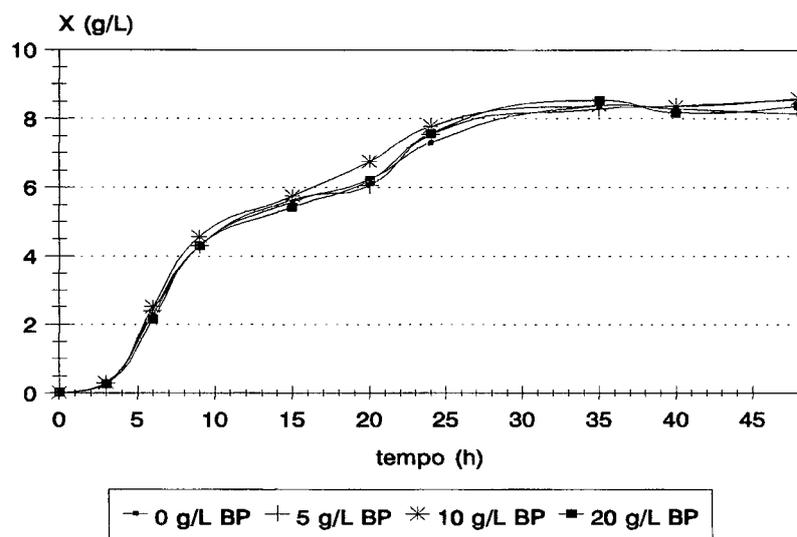
#### **IV.2.4 Estudo da fonte de nitrogênio**

A utilização de bacto peptona, como principal fonte de nitrogênio, foi avaliada em diferentes concentrações (0 a 20 g/L).

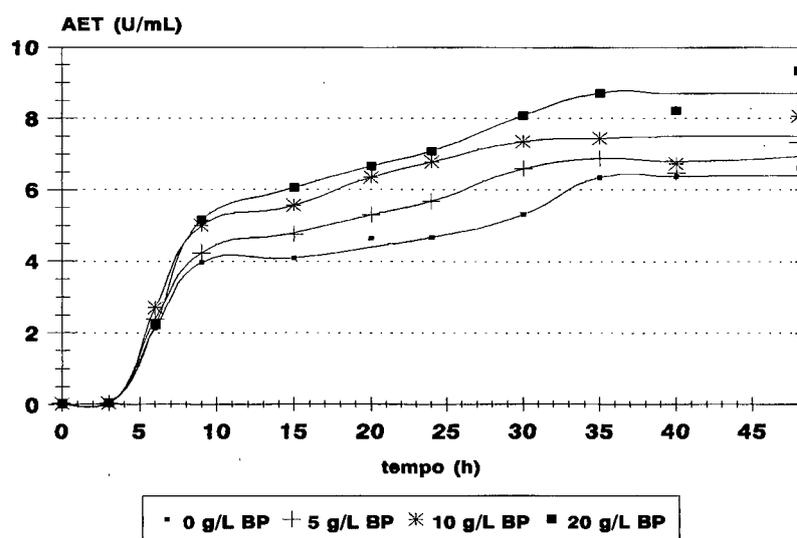
Os resultados ilustrados na Figura IV.18, mostram que o crescimento celular não foi afetado pelas diferentes concentrações de bacto peptona testadas. Sendo assim, a concentração de nitrogênio presente no extrato de levedura é suficiente para garantir o crescimento e fornecer todos os nutrientes necessários ao metabolismo celular. No entanto, a atividade enzimática total sofreu variações de acordo com a concentração de bacto peptona empregada, como pode ser verificado na Figura IV.19. Considerando que, no cultivo contendo 20 g/L de bacto peptona, a formação de inulinase foi equivalente a 100% (8,7 U/mL), concentrações de 0, 5 e 10 g/L levaram a uma redução na atividade enzimática de aproximadamente 25, 20 e 14%, respectivamente.

Uma vez que não se conseguiu reduzir a concentração de bacto peptona sem redução simultânea da atividade enzimática, decidiu-se substituí-la por fontes de nitrogênio mais simples e baratas.

A utilização de fontes de nitrogênio mais simples permite obter inulinase extracelular com maior grau de pureza, uma vez que são isentas de proteínas. Segundo o Manual da Difco de Meios de Cultura, bacto peptona contém nitrogênio na forma de aminoácidos, facilmente assimiláveis pelo microrganismo. Possui, ainda, um conteúdo elevado de peptonas e apenas uma pequena parcela de proteoses e constituintes complexos de nitrogênio.



**FIGURA IV.18** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de bacto peptona (BP).



**FIGURA IV.19** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de bacto peptona (BP).

Conhecendo-se o teor de nitrogênio contido no bacto peptona (BP), concentrações equivalentes de nitrogênio em sulfato de amônio (SA) e uréia (Ur) foram testadas. Estas relações são:

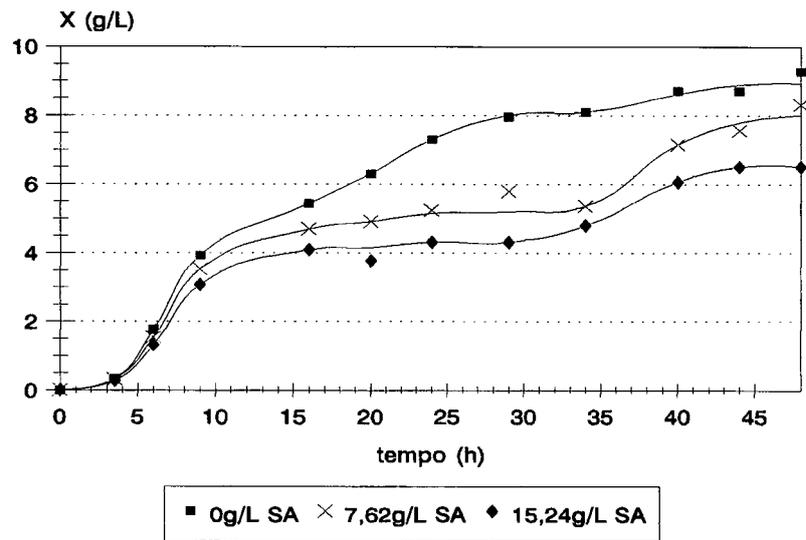
\* 20 g/L de BP corresponde à 6,93 g/L de Ur e 15,24 g/L de SA.

\* 10 g/L de BP corresponde à 3,46 g/L de Ur e 7,62 g/L de SA.

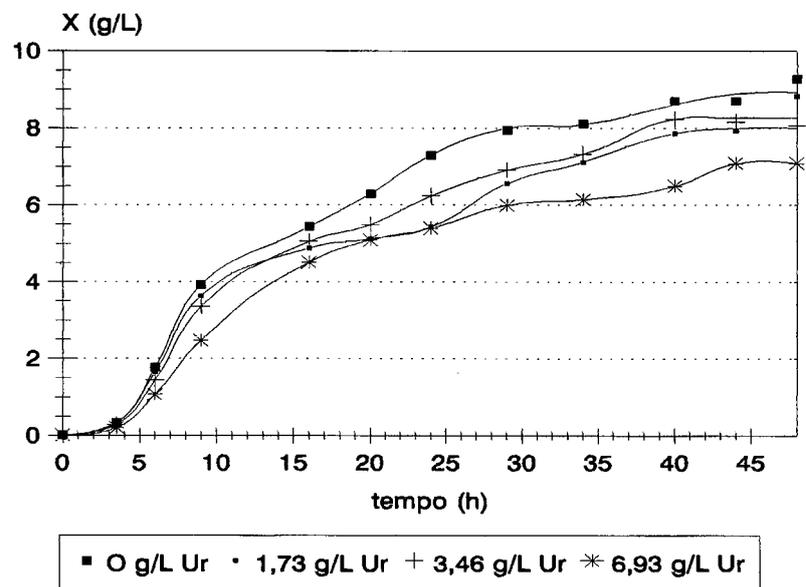
\* 5 g/L de BP corresponde à 1,73 g/L de Ur .

\* 0 g/L de BP corresponde à 0 g/L de Ur e 0 g/L de SA.

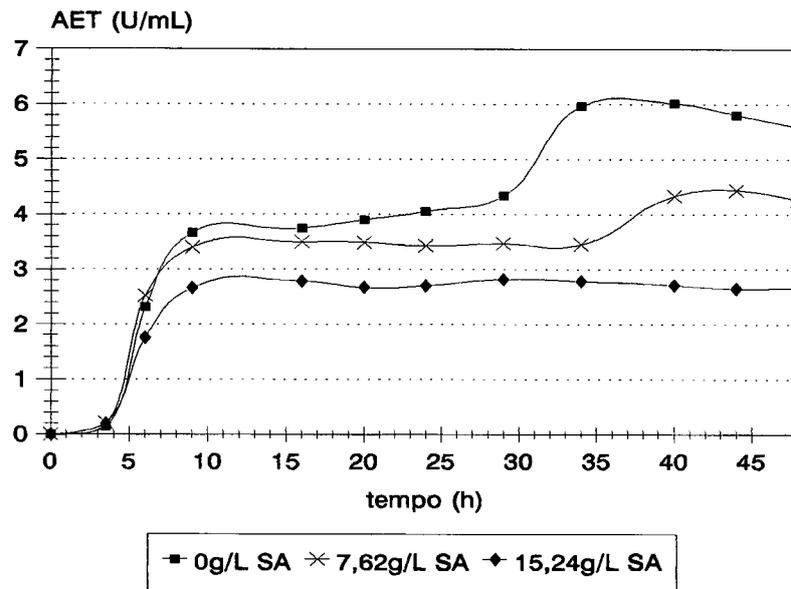
Como pode ser constatado através da Figura IV.20, um aumento na concentração de sulfato de amônio interfere negativamente no crescimento celular, enquanto que nos meios contendo uréia (Figura IV.21) este efeito é um pouco menos pronunciado. Quanto à atividade enzimática total, um aumento na concentração de sulfato de amônio levou a uma diminuição da formação da enzima (Figura IV.22), mas não a diferenças significativas quando se empregou uréia (Figura IV.23). No entanto, a atividade enzimática ainda é maior quando esta fonte de nitrogênio não está presente. Este fenômeno foi também observado por GUPTA *et al.*, (1994a). Os autores avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de inulinase por *K. fragilis*, e constataram que todas as fontes de nitrogênio testadas ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ , uréia, glicina ou sulfato de amônio) em substituição à peptona, desfavoreceram a produção de inulinase, conforme descrito no item II.5.3.



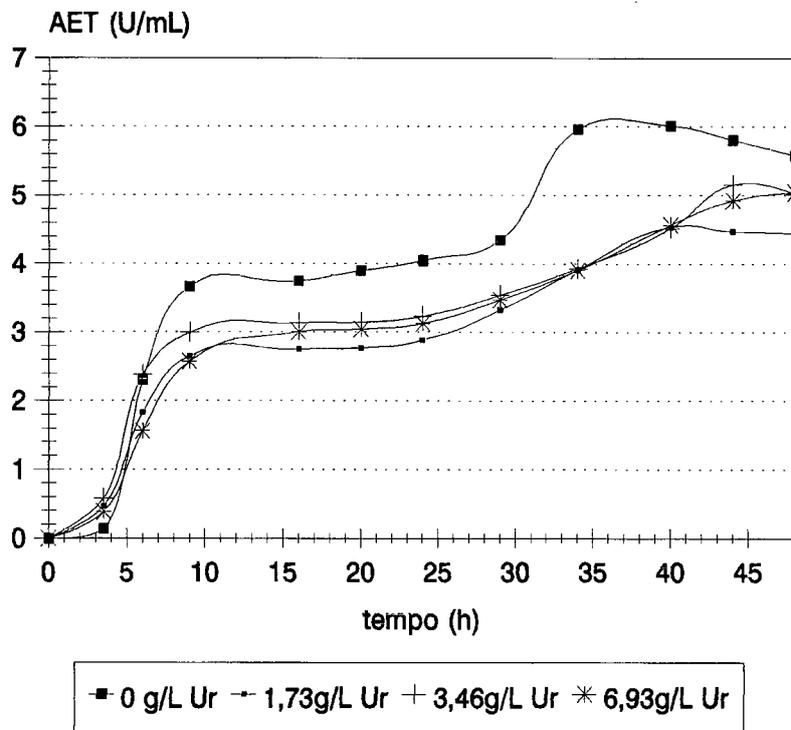
**FIGURA IV.20** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de sulfato de amônio (SA).



**FIGURA IV.21** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de uréia (Ur).



**FIGURA IV.22** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de sulfato de amônio (SA).



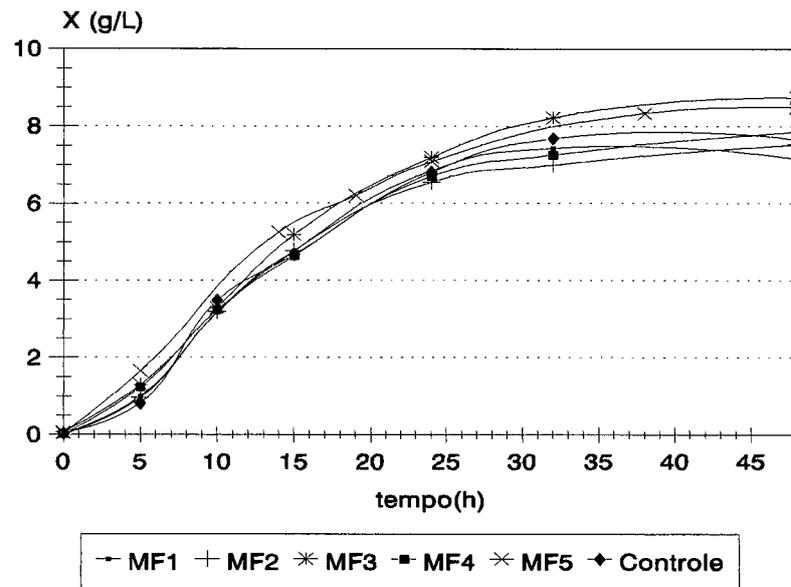
**FIGURA IV.23** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de uréia (Ur).

Uma vez que a utilização de sulfato de amônio ou uréia como fontes de nitrogênio para produção de inulinase por *K. marxianus* ATCC 36907 não foi satisfatória, e tendo em vista que bacto peptona e extrato de levedura são excessivamente caros, optou-se por avaliar a eficiência do farelo de arroz, um resíduo da indústria de alimentos e do Prodex, um autolisado de leveduras com um custo 30 vezes inferior ao do extrato de levedura comercial.

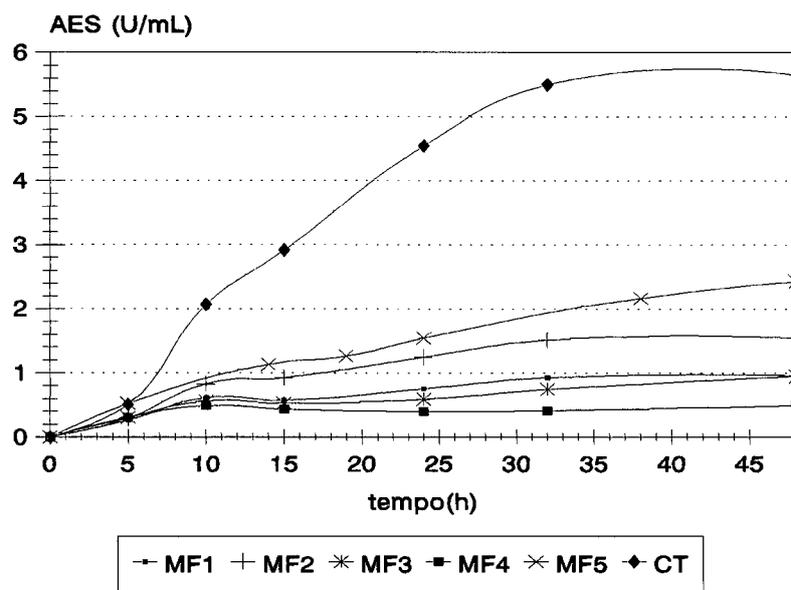
O farelo de arroz, conforme descrito na Tabela II.6, possui um conteúdo elevado em nitrogênio (37%), além das vitaminas essenciais ao crescimento de *K. marxianus* ATCC 36907 (niacina, ácido pantotênico e biotina), como foi identificado em trabalhos anteriores realizados nos laboratórios do CDB (POREP *et al.*, 1993c). Considerou-se, portanto, que o farelo de arroz contribuiria como fonte de nitrogênio, enquanto que Prodex, baseado na sua origem, seria fonte principalmente de vitaminas e sais.

Os perfis de crescimento celular e atividade enzimática extracelular encontram-se ilustrados nas Figuras IV.24 e IV.25.

Mesmo havendo pouca diferença no crescimento celular, para os diferentes meios testados, a atividade enzimática foi fortemente afetada pela substituição de extrato de levedura e bacto peptona por farelo de arroz e Prodex. A utilização dos meios alternativos não foi favorável à síntese da enzima. É possível que, apesar destes meios de cultivo permitirem um crescimento celular semelhante ao obtido com o meio controle, eles não fornecem os elementos necessários à formação da enzima. Este fato sugere que a síntese de inulinase por *K. marxianus* ATCC 36907 esteja ligada à presença de determinados aminoácidos no meio de cultivo.



**FIGURA IV.24** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo.



**FIGURA IV.25** Atividade enzimática extracelular (AES), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo.

#### IV .2.5 Efeito da concentração de extrato de levedura

Cultivos de *K. marxianus* ATCC 36907 foram conduzidos com o objetivo de conhecer o efeito da concentração de extrato de levedura (0 a 10 g/L) sobre o crescimento celular e a atividade enzimática. A Tabela IV.3 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos neste ensaio.

**TABELA IV.3** Resultados gerais das fermentações utilizando diferentes concentrações de extrato de levedura.

YE (g/L)	AET <sub>max</sub> (U/mL)	X <sub>max</sub> (g/L)	AET <sub>esp</sub> (U/g)	Y <sub>P/S</sub> (U/g)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	P <sub>AE</sub> (UL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
0	0,16	1,50	-	16	0,15	5,0
3	3,30	5,50	660	330	0,55	170
6	7,00	8,50	875	700	0,85	230
10	7,50	8,50	937	750	0,85	250

Como pode ser observado, os fatores de conversão de substrato em enzima e em células, assim como a produtividade enzimática, aumentaram com o aumento da concentração de extrato de levedura, principalmente entre 0 e 6 g/L.

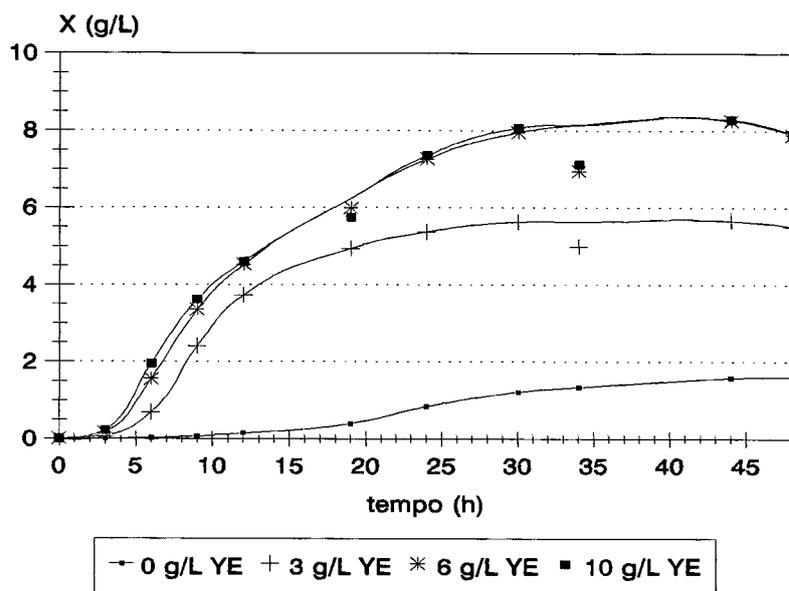
Conforme pode ser visto na Figura IV.26, a formação de biomassa foi fortemente influenciada pela variação da concentração de extrato de levedura. Concentrações

crescentes de extrato de levedura até 6 g/L favoreceram a formação de células, porém não houve diferenças entre 6 e 10 g/L de extrato de levedura. Conforme descrito por STANIER *et al.*, (1986), extrato de levedura é uma excelente fonte de vitaminas do complexo B e, freqüentemente, supre as exigências destes fatores em meios de cultura.

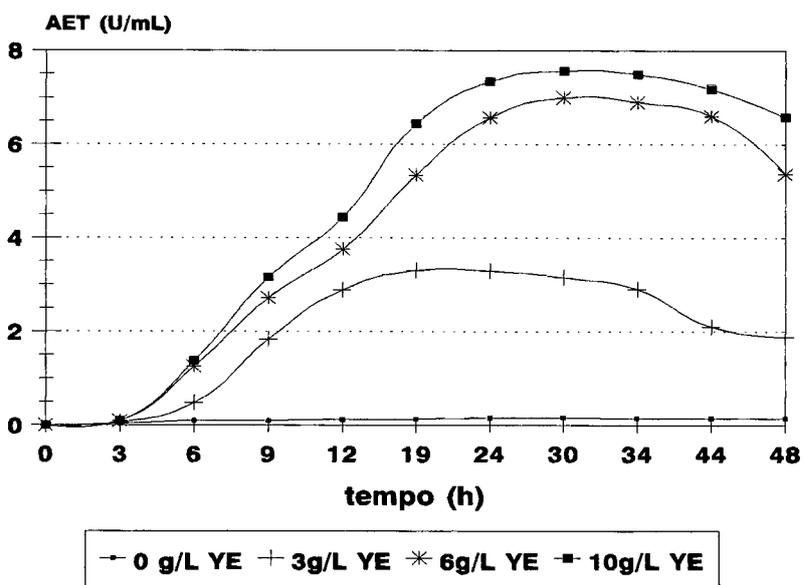
A atividade enzimática total aumentou progressivamente com o aumento da concentração de extrato de levedura, como pode ser visualizado na Figura IV.27.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a presença de extrato de levedura é fundamental para o crescimento deste microrganismo. Da mesma forma, NEGORO & KITO (1973b), verificaram que a produção de inulinase por *Candida Kefyr* foi aumentada pela adição de pequenas quantidades de extrato de levedura.

O incremento na atividade enzimática total, em meio contendo 10 g/L de extrato de levedura, foi de apenas 7% em relação ao meio contendo 6 g/L. Isto significa que nestas condições de cultivo, o aumento de 40% na concentração de extrato de levedura não estimulou proporcionalmente a produção da enzima. Sendo assim, a elevação na atividade enzimática não justifica a utilização de extrato de levedura na concentração de 10g/L.



**FIGURA IV.26** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes concentrações de extrato de levedura (YE).



**FIGURA IV.27** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes concentrações de extrato de levedura (YE).

#### **IV. 2. 6 Utilização do extrato de chicória como fonte de carbono para produção de inulinase**

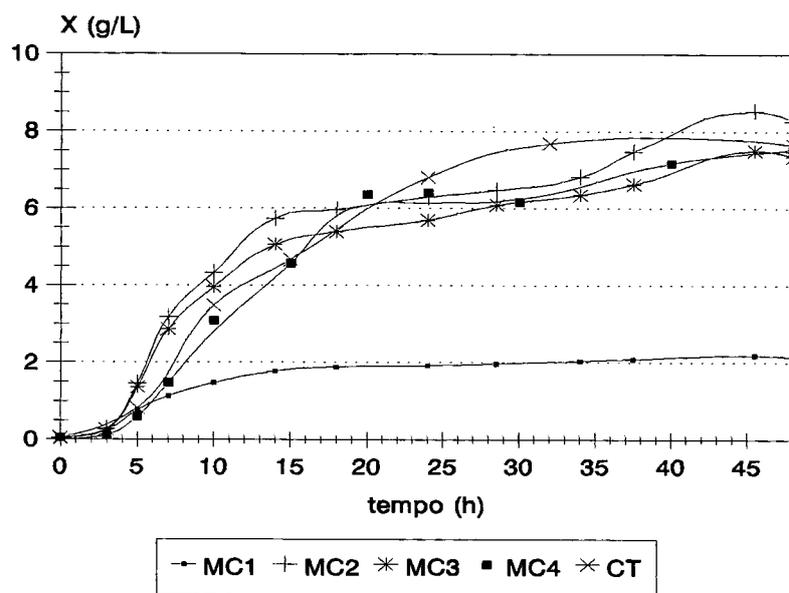
Experimentos realizados anteriormente nos laboratórios do CDB (resultados não publicados), com a finalidade de avaliar a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em presença de diferentes fontes de carbono (sacarose, frutose, glicose, lactose e inulina), revelaram que o uso de inulina como substrato proporcionou maiores valores de atividade enzimática volumétrica e específica.

Sendo a inulina um substrato de alto custo para produção comercial de inulinase, decidiu-se avaliar, neste trabalho, o uso do extrato de chicória como substrato para produção desta enzima.

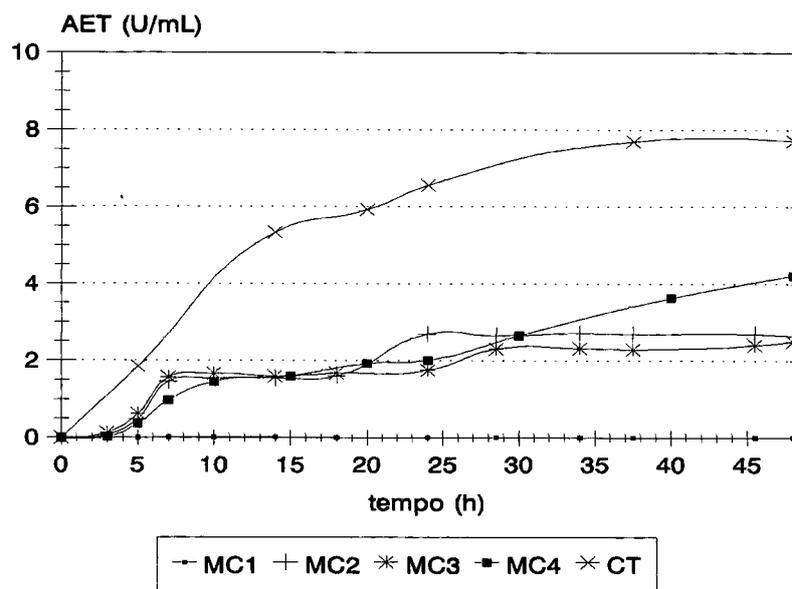
Baseado nos dados da literatura, (BAJPAI & MARGARITIS, 1985; MANZONI & CAVAZZONI, 1988) e nos resultados obtidos no item anterior, *K. marxianus* foi cultivado em meio contendo extrato de chicória nas formas: sem suplementação, suplementado com extrato de levedura (6,0 g/L) e suplementado com extrato de levedura e sais ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e FeSO<sub>4</sub>).

As curvas de crescimento e produção de inulinase estão ilustradas na Figura IV.28 e IV.29, respectivamente.

Comparando os meios MC1 e MC2, verifica-se a influência da suplementação do extrato de chicória com extrato de levedura ao nível de 6,0 g/L. O extrato de chicória sem nenhum tipo de suplementação (MC1) não permite a formação de inulinase e a formação de biomassa é muito baixa.

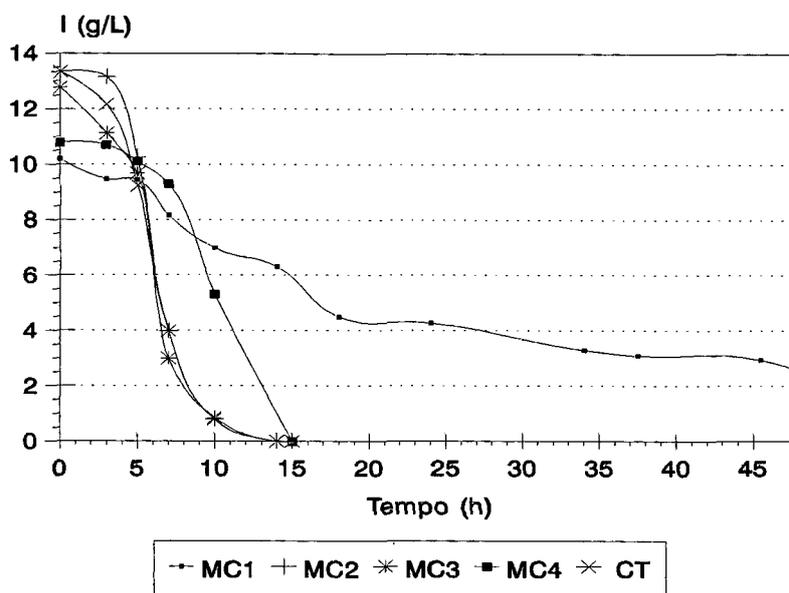


**FIGURA IV.28** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo.



**FIGURA IV.29** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo.

As curvas de consumo de inulina (Figura IV.30) permitem concluir que, além da velocidade de consumo de substrato ser muito lenta, a fermentação não foi concluída em 48 horas no meio MC1. Este fato mostra claramente a existência de carência nutricional neste meio.



**FIGURA IV.30** Concentração de substrato (S), em função do tempo, para diferentes meios de cultivo.

A atividade enzimática total no meio de cultivo contendo extrato de chicória e extrato de levedura (MC2) não ultrapassou 2,8 U/mL, valor inferior àquele obtido com inulina comercial (MC4), que foi de 4,2 U/mL.

Ainda, tendo extrato de chicória como substrato (MC2), avaliou-se a influência da adição de sais sobre atividade enzimática (MC3) e observou-se que estes não estimularam a formação de enzima. Comparando-se o meio MC4 com o meio controle (CT), observa-se que, apesar da presença de inulina comercial naquele meio (MC4), a atividade enzimática foi inferior àquela obtida no meio controle.

Cabe salientar que, quando foi avaliado o efeito das concentrações de bacto peptona (0 a 20 g/L) e extrato de levedura (0 a 10 g/L) sobre o crescimento celular e a síntese de inulinase, um dos elementos estava sempre em excesso. Ao decidir-se, neste ensaio, por excluir o bacto peptona e utilizar extrato de levedura ao nível de 0,6%, não foi considerada a interação que ocorre quando estes nutrientes são utilizados em conjunto.

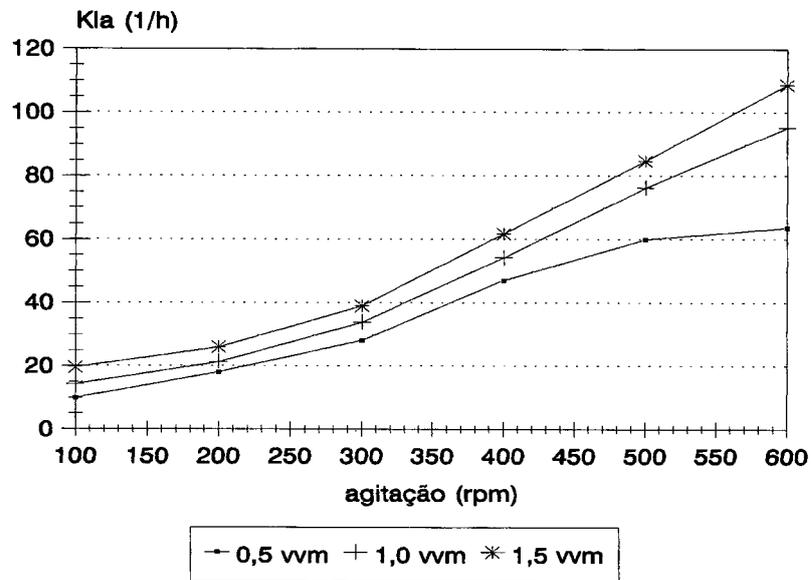
Estes resultados, levaram ao questionamento da causa dos baixos valores de atividade enzimática obtidos quando extrato de chicória foi utilizado, uma vez que outros autores (MANZONI & CAVAZZONI, 1988; GUPTA *et al.*, 1994a) alcançaram as melhores produções de inulinase com extratos vegetais (topinambur e chicória). A presença de substâncias fenólicas no extrato foi a hipótese mais provável. Algumas plantas contêm substâncias fenólicas que funcionam como mecanismo de defesa e proteção. Estas plantas, ao sofrerem injúria, expõem radicais que, em contato com o oxigênio do meio ambiente, formam substâncias fenólicas de cor marrom (VUKOV *et al.*, 1993). Estas substâncias são muitas vezes inibidoras do crescimento de microrganismos. No caso de *K. marxianus* ATCC 36907 não há inibição do crescimento, porém a atividade enzimática é comprometida. Para evitar estes problemas, poderia-se modificar o método de extração da inulina das raízes de chicória, ou ainda, procurar eliminar os compostos fenólicos contidos no extrato, através de métodos de extração adequados. Uma alternativa seria a utilização de agentes clarificantes, tais como ácido cítrico e ácido acético para evitar a oxidação enzimática dos polifenóis (VUKOV *et al.*, 1993).

#### IV.2.7 Influência do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio ( $K_{La}$ )

Nos ensaios realizados em frascos agitados não foi possível acompanhar detalhadamente a cinética do processo fermentativo devido a limitação do volume de amostra, que não deve exceder 10% do volume inicial. Além disso, não havia como quantificar, de forma precisa, a transferência de oxigênio nas condições empregadas, uma vez que o fornecimento de oxigênio era determinado pela relação entre o volume de meio de cultivo e o volume do frasco, nas condições de agitação utilizadas. Sendo assim, o estudo das diferentes condições de transferência de oxigênio foi conduzido em reator de bancada, com volume útil de 1,5L, em regime descontínuo, à 37°C e pH 4,5 controlado automaticamente.

O meio de cultivo utilizado para a condução dos experimentos foi o meio controle. Baseado nos experimentos realizados anteriormente sobre a composição do meio de cultivo para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, optou-se por um meio rico, completo, onde se pudesse avaliar apenas a interferência do substrato oxigênio. A utilização de outros meios de cultivo poderia levar rapidamente a uma limitação de nutrientes.

A Figura IV.31 apresenta os diferentes valores de  $K_{La}$  obtidos para as três condições de aeração testadas (0,5, 1,0 e 1,5 vvm), em função do estado de agitação. Apesar desta curva ser uma referência para a escolha do binômio aeração/agitação, no início de cada fermentação, repetiu-se o procedimento de determinação do  $K_{La}$ , tendo em vista que pequenas variações, como pressão, temperatura e concentração de sais e nutrientes, podem levar a variações na transferência de oxigênio para o meio.



**FIGURA IV.31** Valores de  $K_{La}$  obtidos para diferentes condições de aeração e agitação, em meio de cultivo YEP I, em reator de 2L, volume útil 1,5L.

Os experimentos de fermentação foram realizados sob três diferentes condições de agitação e aeração e os resultados obtidos estão resumidos na Tabela IV.4. Os valores de  $\mu_{max}$  foram calculados, através do coeficiente angular da reta obtida relacionando o logaritmo neperiano da concentração celular com o tempo (como descrito no item III.4.7). As curvas apresentando as correlações lineares estão localizadas no apêndice B (Figuras B4, B5 e B6).

**TABELA IV.4** Resultados gerais obtidos no cultivo de *Kluyveromyces marxianus* sob diferentes condições de suprimento de oxigênio.

Condições	MK1	MK2	MK3
$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	21	36	89
Tempo de ferm(h)	36	24	15
$X_{max}$ (g/L)	7,50	11,00	13,00
$AET_{max}$ (U/mL)	6,50	6,50	8,00
E (g/L)	9,00	2,50	0,06
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,83	1,10	1,30
$Y_{P/S}$ (U/g)	722	650	800
$P_{AE}$ ( $U.L^{-1}.h^{-1}$ )	180	270	530
$AET_{esp}$ (U/g)	867	591	615
$P_{esp}$ ( $U.g^{-1}.h^{-1}$ )	24	25	41
$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	0,79	0,72	0,58

As Figuras IV.32 a IV.34 apresentam a evolução do crescimento celular, atividade enzimática total, consumo de substrato, formação de etanol, concentração de oxigênio dissolvido e velocidade específica de crescimento, bem como as relações lineares obtidas entre a velocidade específica de crescimento e de formação de enzima para as três condições de suprimento de oxigênio testadas. Os perfis de velocidade específica de crescimento e formação de enzima, em função do tempo, encontram-se no apêndice B (Figuras B7, B8 e B9).

Pela Figura IV.32b, pode-se observar que a maior parte do tempo de fermentação ocorreu sob condições de limitação pelo oxigênio. A partir de 2 horas de cultivo, a transferência de oxigênio para o meio não foi suficiente para suprir a demanda do microrganismo. Nesta situação, em paralelo à via metabólica oxidativa, a via fermentativa passou a ser utilizada pelo microrganismo, com produção de etanol (9,0 g/L). Constatase pela Figura IV.32a, que o substrato esgotou-se em 10 horas de cultivo, momento no qual o etanol, até então acumulado, passou a ser consumido. Este novo substrato foi capaz de manter o crescimento celular até, aproximadamente, 36 horas, quando o oxigênio dissolvido voltou a subir, indicando que a transferência de oxigênio para o sistema foi superior à demanda do microrganismo.

Observa-se, ainda, pela Figura IV.32a, que há um aumento de atividade enzimática mesmo após o esgotamento do substrato, o que pode ser explicado pela ocorrência de dois fatores: a liberação da enzima retida na parede para o meio de cultivo e a lise celular.

Através da análise das curvas de crescimento celular e de velocidade específica de crescimento, nas quinze primeiras horas de cultivo (Figura IV.32c), pode-se observar quatro fases distintas para o crescimento celular. De 0 a 1,0 hora, aproximadamente, ocorre a fase de latência e aceleração do crescimento (Fase I), seguida de uma fase exponencial (Fase II) entre 1,0 e 4,0 horas (que pode ser constatada sobretudo, através da figura B4), com  $\mu_{max}=0,79 \text{ h}^{-1}$ . Inicia-se então a desaceleração do crescimento (Fase III), que apresenta uma faixa linear entre 5,0 e 10,5 horas. A partir deste ponto, a velocidade de crescimento celular diminuiu, tendendo a estacionar (Fase IV).

Conforme pode ser observado através da Figura IV.32d, existe uma correlação linear entre  $\mu$  e  $\mu_p$ , para valores de  $\mu$  variando entre 0,12 e 0,42  $\text{h}^{-1}$ , ou seja, entre 5,5 e 9,5 horas de cultivo. Nesta fase da fermentação, estes parâmetros podem ser relacionados através da equação (2):

$$\mu_p = 1,37\mu - 0,08 \quad (2) \quad r=0,98$$

Pode-se observar através da equação (2) que,  $\mu_p$  e  $\mu$  estão correlacionados de modo a favorecer, em geral, a síntese da enzima, indicando também que a produção está associada às células em reprodução e não à biomassa já existente no meio. Este período da fermentação encontra-se, na faixa linear da fase de desaceleração do crescimento celular.

A Figura IV.33a apresenta o perfil de crescimento, consumo de substrato e formação de enzima para  $K_{La}=36 \text{ h}^{-1}$ . Com 24 horas de fermentação, a atividade enzimática total foi máxima (6,5 U/mL). Como o suprimento de oxigênio foi superior em relação ao experimento anterior, a formação de células foi também maior.

A Figura IV.33b mostra o perfil de consumo de oxigênio no decorrer da fermentação. Nesta condição de transferência de oxigênio, este substrato tornou-se limitante após 5 horas de cultivo. A duração da fase de limitação pelo oxigênio foi cerca de 50% inferior àquela observada no experimento anterior. A sistemática de produção e consumo de etanol foi a mesma ocorrida para  $K_{La}=21 \text{ h}^{-1}$ . No entanto, a concentração

máxima de etanol foi muito inferior (2,5 g/L), uma vez que a maior transferência de oxigênio para o meio favoreceu o metabolismo oxidativo.

As fases de crescimento podem ser observadas na Figura IV.33c. Neste caso, analisando-se apenas a curva de  $\mu$ , obtida pelo método de Le Duy & Zajic, não se observa fase exponencial. Porém, pode-se notar pela curva de crescimento (Figura IV.33c) e constatar pela Figura B5, que a fase exponencial está presente entre 2,0 e 5,0 horas (Fase II). As demais fases de crescimento estão representadas pelas fases I, III e IV, conforme observado anteriormente. Nesta condição, o valor obtido para  $\mu_{\max}$  pelo método de Le Duy & Zajic foi de  $1,05 \text{ h}^{-1}$ , ou seja, 31% superior àquele obtido pelo método logarítmico. Todavia, o valor considerado real foi  $\mu_{\max} = 0,72 \text{ h}^{-1}$ , obtido por este método, uma vez que os erros embutidos nos cálculos de  $\mu$  pelo método de Le Duy Zajic são elevados para baixos valores de concentração celular.

Não houve, neste experimento, defasagem no tempo entre  $\mu_p$  e  $\mu$  (Figura B8), mas uma relação linear entre estes parâmetros só foi obtida para faixa de  $\mu$  compreendida entre  $0,18$  e  $0,37 \text{ h}^{-1}$  (Figura IV.33d), equivalente ao período de 6,5 a 10,5 horas de fermentação. Neste caso, a equação da reta (3) obtida foi:

$$\mu_p = 1,6\mu - 0,24 \quad (3) \quad r=0,99$$

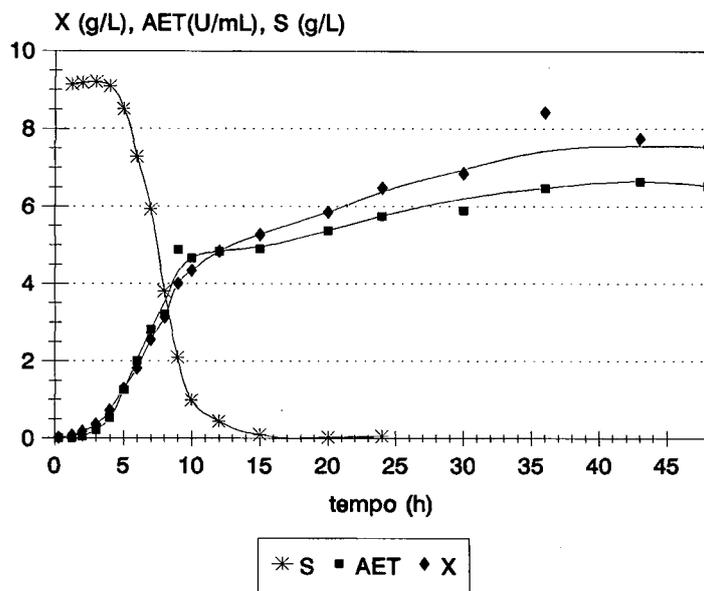
Nesta condição, o elevado valor do coeficiente linear (em módulo) revela que a formação de células, neste período, é favorecida em relação à formação de produto.

O aumento do  $K_{La}$  para  $89 \text{ h}^{-1}$  proporcionou uma sensível diminuição da velocidade de consumo de substrato em relação aos experimentos anteriores. Todavia, o tempo de fermentação foi reduzido para 15 horas (Figura IV.34a).

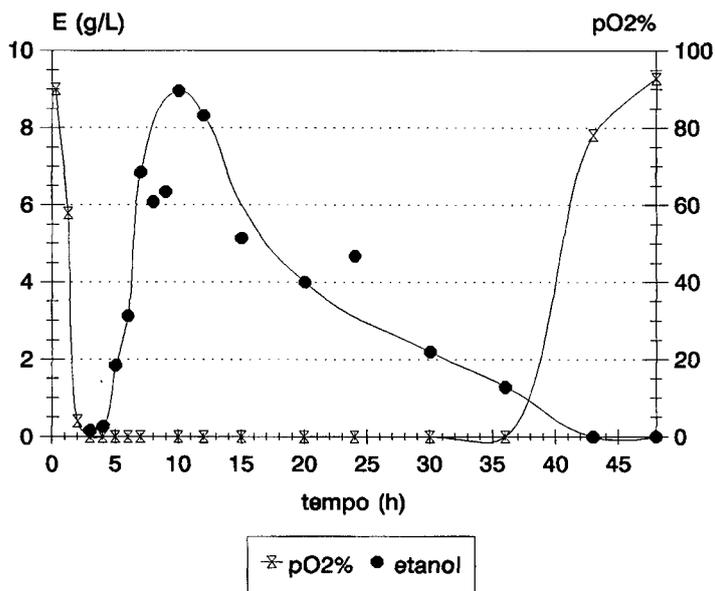
A produção de etanol foi praticamente inexistente (Figura IV.34b). Com isso, a inulina presente no meio de cultivo foi destinado à formação de biomassa. Apesar do aumento da concentração celular, em relação aos experimentos anteriores (IV.34c), a velocidade específica máxima de crescimento caiu para  $0,58 \text{ h}^{-1}$  (obtido pelo método logarítmico). As fases de crescimento observadas foram semelhantes àsquelas obtidas anteriormente.

Assim como no ensaio anterior, não houve defasagem no tempo entre  $\mu$  e  $\mu_p$  (Figura B9). Contudo, uma relação linear entre estes parâmetros foi obtida entre 5,0 e 8,5 horas de crescimento ( $0,40 < \mu < 0,62 \text{ h}^{-1}$ ), conforme observado na Figura IV.34d e na equação (4):

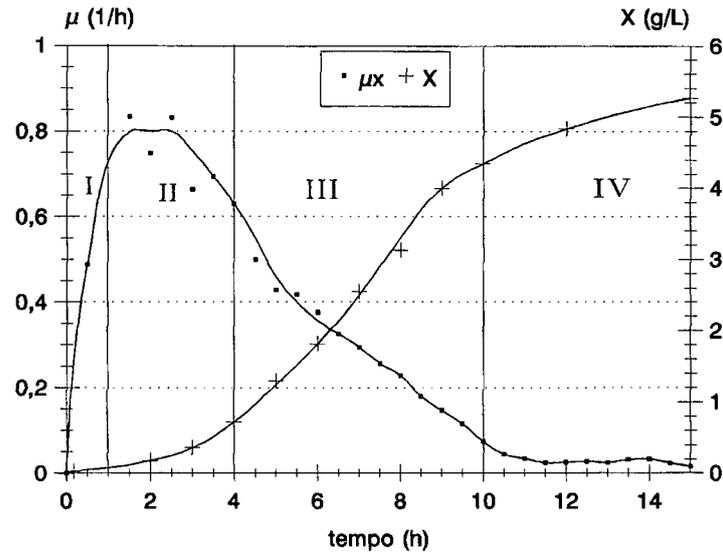
$$\mu_p = 1,57\mu - 0,48 \quad (4) \quad r=0,98.$$



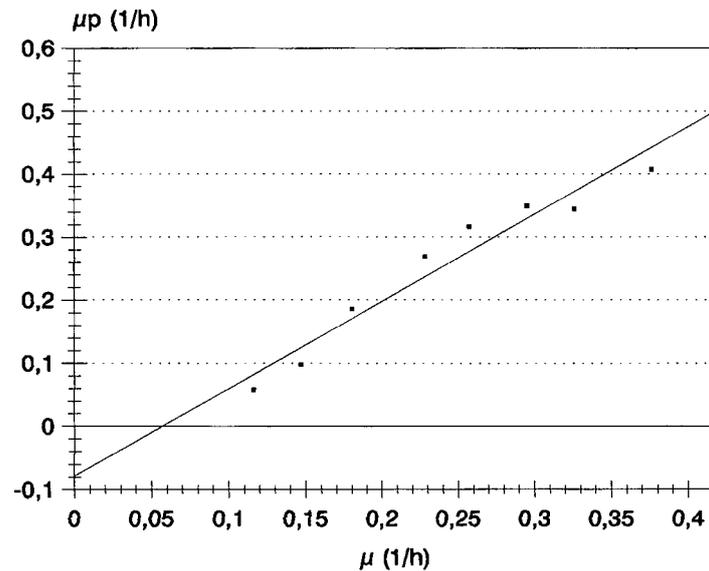
**FIGURA IV.32 a** Crescimento celular (X), atividade enzimática total (AET) e consumo de substrato (S), em função do tempo, para  $K_L a$  igual a  $21 \text{ h}^{-1}$ .



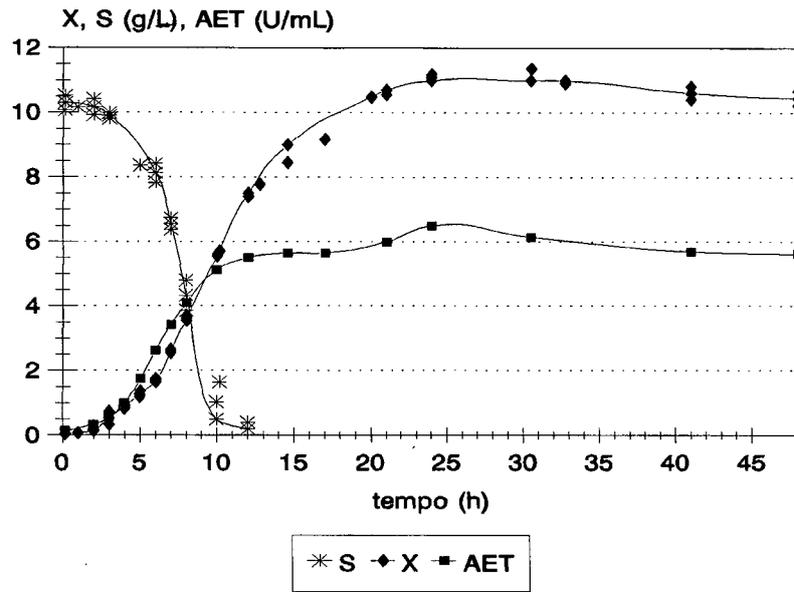
**FIGURA IV.32 b** Concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e etanol (E), em função do tempo, para  $K_L a$  igual a  $21 \text{ h}^{-1}$ .



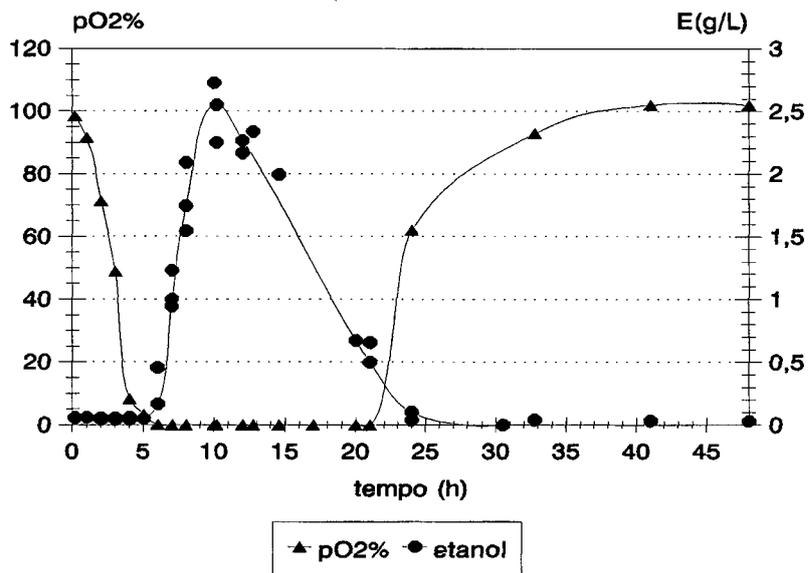
**FIGURA IV.32 c** Evolução do crescimento celular ( $X$ ), e da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento, para  $K_L a$  igual a  $21 \text{ h}^{-1}$ .



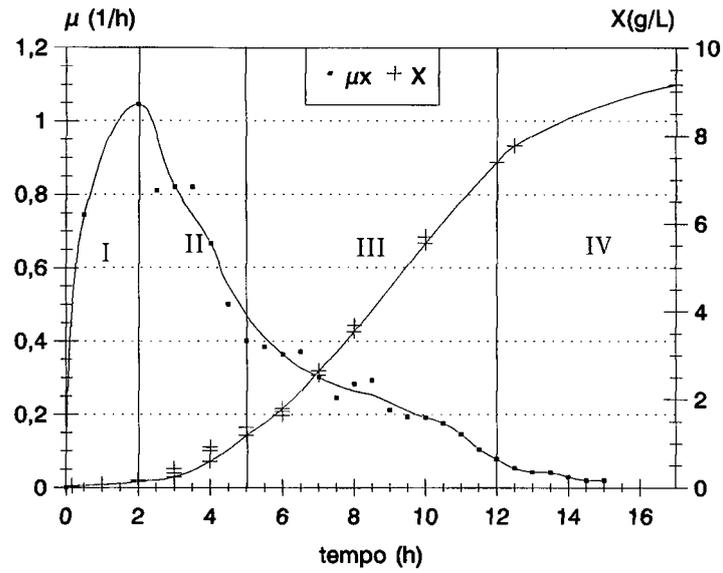
**FIGURA IV.32 d** Correlação linear entre  $\mu$  e  $\mu_p$ , obtida entre 5,5 e 9,5 horas de cultivo, para  $K_L a$  igual a  $21 \text{ h}^{-1}$ .



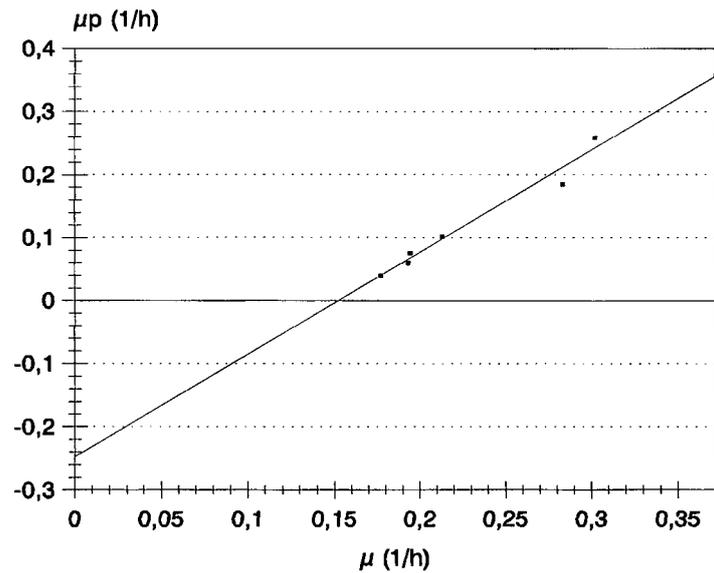
**FIGURA IV.33 a** Crescimento celular (X), atividade enzimática total (AET) e consumo de substrato (S), em função do tempo, para  $K_L$  igual a  $36 \text{ h}^{-1}$ .



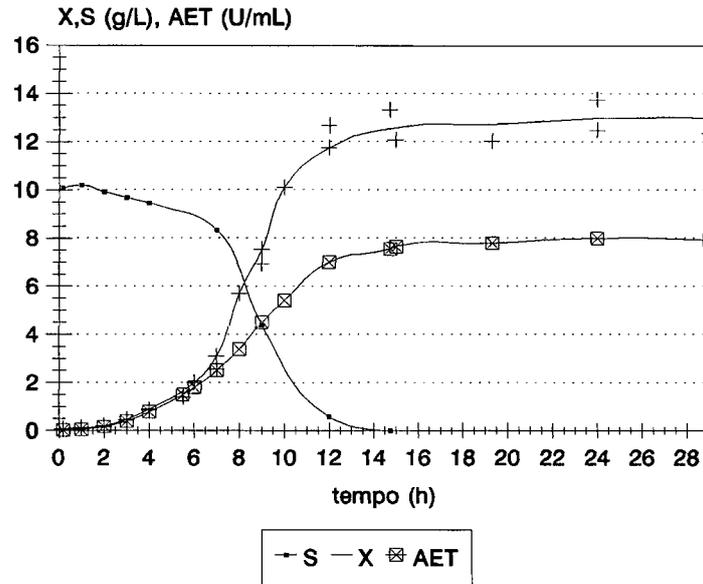
**FIGURA IV. 33 b** Concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e etanol (E), em função do tempo, para  $K_L$  igual a  $36 \text{ h}^{-1}$ .



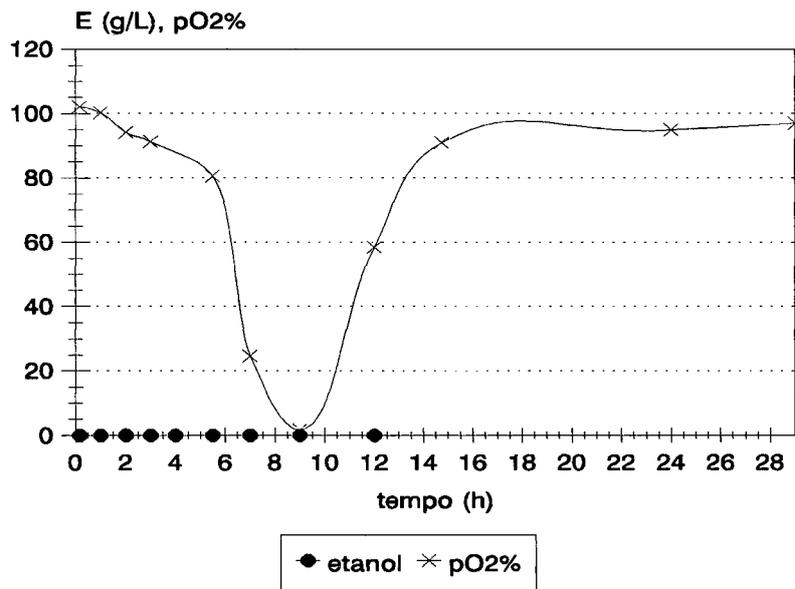
**FIGURA IV.33 c** Evolução do crescimento celular ( $X$ ), e da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento, para  $K_L$  igual a  $36 \text{ h}^{-1}$ .



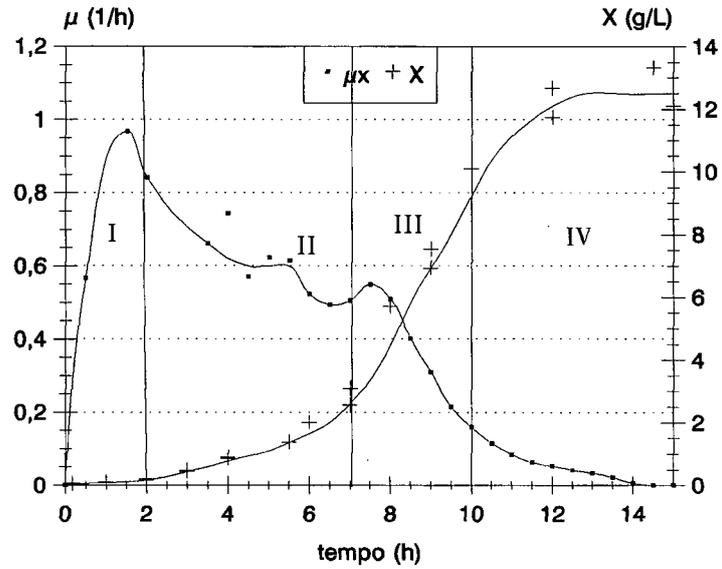
**FIGURA IV.33 d** Correlação linear entre  $\mu$  e  $\mu_p$ , obtida entre 6,5 e 10,5 horas de cultivo, para  $K_L$  igual a  $36 \text{ h}^{-1}$ .



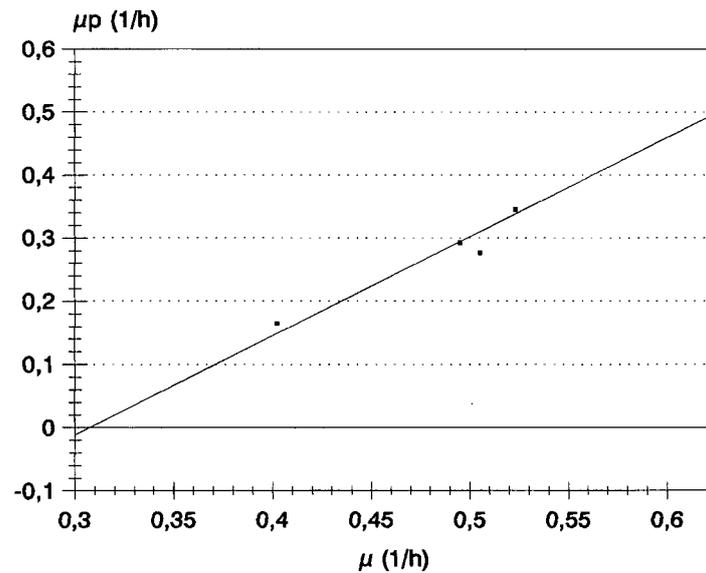
**FIGURA IV.34 a** Crescimento celular (X), atividade enzimática total (AET) e consumo de substrato (S), em função do tempo, para  $K_{La}$  igual a  $89 \text{ h}^{-1}$ .



**FIGURA IV.34 b** Concentração de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ) e etanol (E), em função do tempo, para  $K_{La}$  igual a  $89 \text{ h}^{-1}$ .



**FIGURA IV.34 c** Evolução do crescimento celular ( $X$ ), e da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento, para  $K_L a$  igual a  $89 \text{ h}^{-1}$ .



**FIGURA IV.34 d** Correlação linear entre  $\mu$  e  $\mu_p$ , obtida entre 5,0 e 8,5 horas de cultivo, para  $K_L a$  igual a  $89 \text{ h}^{-1}$ .

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As principais conclusões deste trabalho encontram-se relacionadas abaixo:

- ⇒ A exo-inulinase extracelular e periplasmática de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 mostrou-se estável durante os 4 meses de estocagem a -20°C.
- ⇒ A enzima extracelular apresentou-se estável em temperaturas inferiores a 55°C e na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 7,0, nas condições do teste, enquanto que a enzima periplasmática mostrou-se mais sensível à influência da temperatura, começando a perder atividade acima de 45°C.
- ⇒ O efeito da temperatura e do pH sobre a atividade inulinolítica foi também investigado. Independentemente da localização da enzima (extracelular ou periplasmática), as faixas ideais de temperatura e pH para atuação da inulinase foram 50-60°C e pH 4,5-pH 6,0, respectivamente.
- ⇒ As constantes da equação de Michaelis-Menten foram determinadas :  $K_m = 7,79$  mM e  $V_{max} = 1,93$  g.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.
- ⇒ A influência da temperatura de cultivo foi avaliada entre 28 e 45°C. A faixa de temperatura entre 32-37°C proporcionou melhor atividade enzimática total, sendo que os valores mais elevados de produtividade em enzima foram obtidos a 37°C.
- ⇒ O acúmulo de enzima na parede celular ocorreu enquanto o substrato se encontrou presente no meio de cultivo. A partir do momento em que o substrato se tornou

limitante, o microrganismo passou a liberar progressivamente a enzima periplasmática para o meio de cultivo. Sugere-se que este mecanismo esteja ligado à manutenção das células. Uma vez que não existe mais substrato no meio, o microrganismo procura utilizar outras formas para continuar mantendo sua atividade celular, liberando assim inulinase da parede para o meio.

⇒ O controle do pH do meio de cultivo em 4,5 foi mais eficiente para a produção de enzima, quando comparado ao meio sem controle de pH.

⇒ A influência da concentração inicial de substrato foi estudada entre 10 e 60 g/L. Os resultados mostraram que concentrações de inulina acima de 20 g/L não são favoráveis à produção de enzima nas condições de fermentação utilizadas. Concentrações iniciais de substrato mais elevadas, causaram, provavelmente, repressão catabólica.

⇒ A utilização de bacto peptona em meio contendo extrato de levedura e inulina não foi imprescindível à formação de enzima. No entanto, a presença de extrato de levedura é fundamental para o crescimento e, conseqüentemente, para a formação de enzima.

⇒ Uréia e sulfato de amônio foram utilizados como possíveis fontes de nitrogênio para o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e produção de inulinase. No entanto, concentrações crescentes de sulfato de amônio ocasionaram uma diminuição na formação de células e na síntese de inulinase. O mesmo efeito, porém menos acentuado, foi observado quando uréia foi usada como fonte de nitrogênio.

⇒ A substituição simultânea de bacto peptona e extrato de levedura por farelo de arroz e Prodex, apesar de permitir o crescimento celular a níveis comparáveis ao meio controle (bacto peptona, extrato de levedura e inulina), não foi adequado à formação de

inulinase. Estes resultados sugerem que a síntese de inulinase esteja associada à presença de determinados aminoácidos ou grupo de aminoácidos no meio de cultivo.

⇒ Sendo a inulina um indutor da síntese de inulinase, como constatado em experimentos realizados anteriormente nos laboratórios do CDB e, tendo em vista o alto custo deste substrato, extrato de chicória foi utilizado como fonte de carbono no cultivo de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. O extrato de chicória sem suplementação não favoreceu o crescimento celular nem a síntese da enzima, uma vez que o substrato não foi consumido, indicando uma carência nutricional neste meio. No entanto, a suplementação do extrato de chicória com extrato de levedura e sais, permitiu o crescimento microbiano sem, contudo, favorecer a síntese da enzima. Sendo assim, a hipótese provável para explicar este fenômeno é a presença de substâncias fenólicas no extrato de chicória que comprometem a atividade inulinolítica.

⇒ Valores crescentes do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $21$  a  $89 \text{ h}^{-1}$ ) foram favoráveis à formação de biomassa e à síntese de inulinase, além de proporcionarem uma redução no tempo de fermentação. Valores globais de fator de conversão de substrato em enzima ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade ( $P_{AE}$ ) iguais a  $800 \text{ U/g}$  e  $530 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente, foram obtidos em  $K_{La} = 89 \text{ h}^{-1}$ . A produção de etanol diminuiu com o aumento da oxigenação do meio, sendo nula em  $K_{La} = 89 \text{ h}^{-1}$ . A síntese deste produto ocorreu apenas em condições de limitação pelo oxigênio e seu consumo iniciou após o esgotamento do substrato. A atividade inulinolítica continuou aumentando no meio extracelular após o esgotamento da inulina devido, provavelmente, a lise celular e a liberação da enzima periplasmática para o meio.

⇒ Os perfis de velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de produto ( $\mu_p$ ) foram definidos e a cinética do processo foi estudada. O maior valor da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max} = 0,79 \text{ h}^{-1}$ ) foi obtido em  $K_{La} = 21 \text{ h}^{-1}$ , diminuindo com o aumento deste.

Os resultados deste trabalho levaram a uma série de questionamentos, que poderão ser abordados na continuidade deste estudo:

⇒ Estudo dos aminoácidos ou grupos de aminoácidos necessários à síntese da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* a fim de substituir bacto peptona por fontes alternativas de nitrogênio.

⇒ Utilização de métodos analíticos que permitam detectar a presença de enzima, mesmo na forma inativa, uma vez que, neste trabalho, os termos produção de enzima e atividade enzimática foram utilizados indiscriminadamente. A quantificação da enzima foi realizada pelo teste de atividade enzimática, sendo que, em alguns casos, a enzima poderia estar presente de forma inativa.

⇒ Ampliação da faixa de estudo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ), uma vez que os valores de fator de conversão de substrato em enzima e produtividade foram crescentes na faixa estudada neste trabalho.

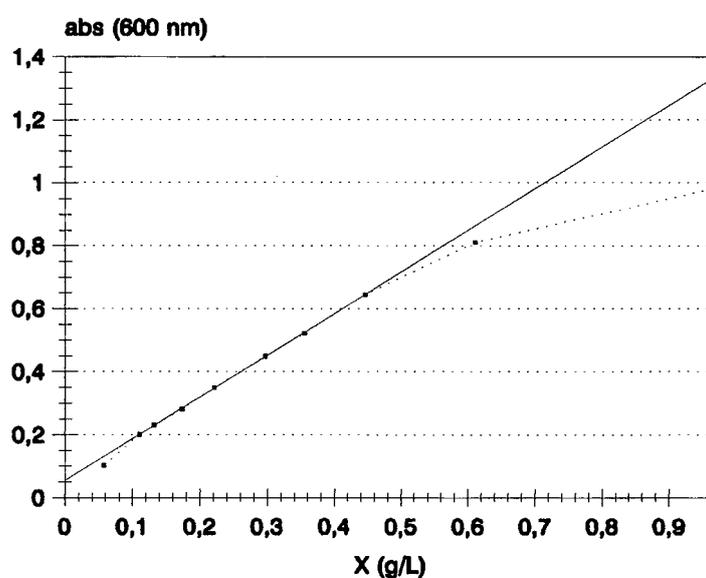
⇒ Avaliação da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em sistemas contínuos, uma vez que neste tipo de processo pode-se evitar o fenômeno de repressão catabólica, mantendo-se baixas concentrações de substrato residual no meio de cultivo. Este processo facilitaria o estudo da regulação do metabolismo do microrganismo, tendo em vista que as condições ambientais são mantidas constantes. Além do mais, o estudo da cinética do processo mostrou que não existe defasagem no tempo entre as velocidades específicas de crescimento e formação de enzima, sugerindo o uso de culturas contínuas.

## **APÊNDICE A**

### **CURVAS DE CALIBRAÇÃO**

**TABELA A.1** - Valores de absorvância de suspensões de células de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 cultivadas em meio contendo YEP I (espectrofotômetro LKB, 600 nm).

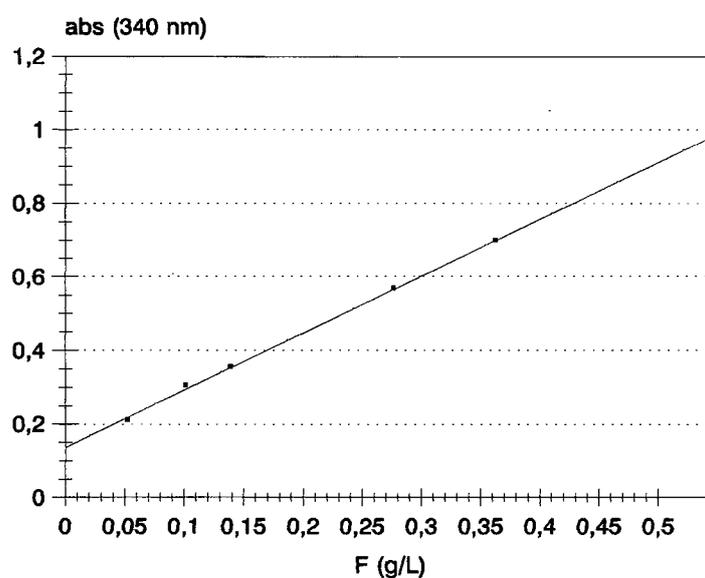
<b>X (g/L)</b>	0.057	0.111	0.132	0.174	0.221	0.296	0.355	0.446	0.612	0.970
<b>ABS</b>	0.103	0.201	0.230	0.281	0.350	0.449	0.522	0.645	0.811	0.983



**FIGURA A.1** - Curva de correlação entre concentração celular (X) a absorvância (abs) obtida a partir de suspensões de células de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 cultivadas em meio YEPI:  $X = (abs - 0,054) / 1,324$ ,  $r = 0,9998$ .

**TABELA A.2** - Valores de absorvância de soluções padrão de frutose (espectrofotômetro "Microtiter Reader", 340 nm).

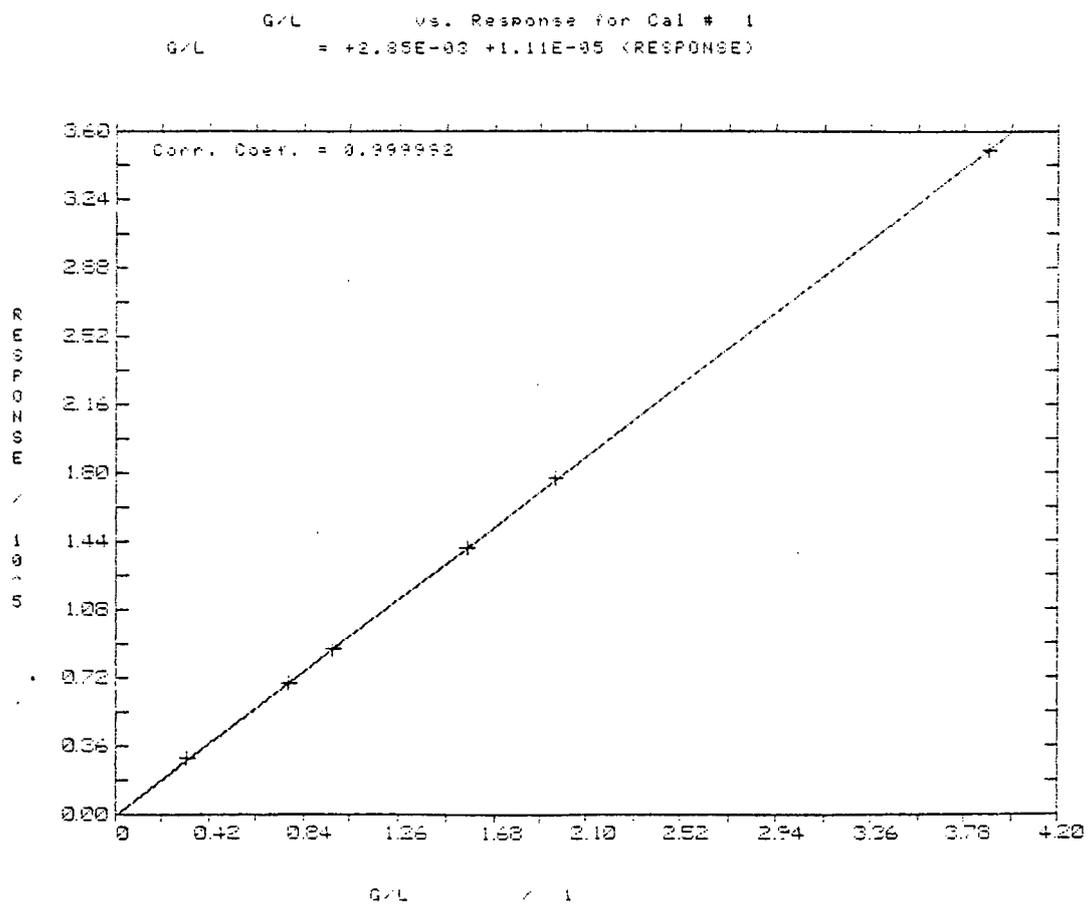
<b>F (g/L)</b>	0.052	0.101	0.139	0.276	0.362	0.548
<b>ABS</b>	0.212	0.307	0.357	0.570	0.700	0.982



**FIGURA A.2** - Exemplo de uma curva de calibração obtida no teste de determinação de glicose e frutose em Sistema "Microtiter Reader":  $[Frutose] = (abs - 0,042)/1,538$ ,  $r = 0,9997$ .

**TABELA A.3** - Concentração das soluções padrão de etanol (E) e suas respectivas áreas para construção da curva de calibração em cromatografia em fase gasosa.

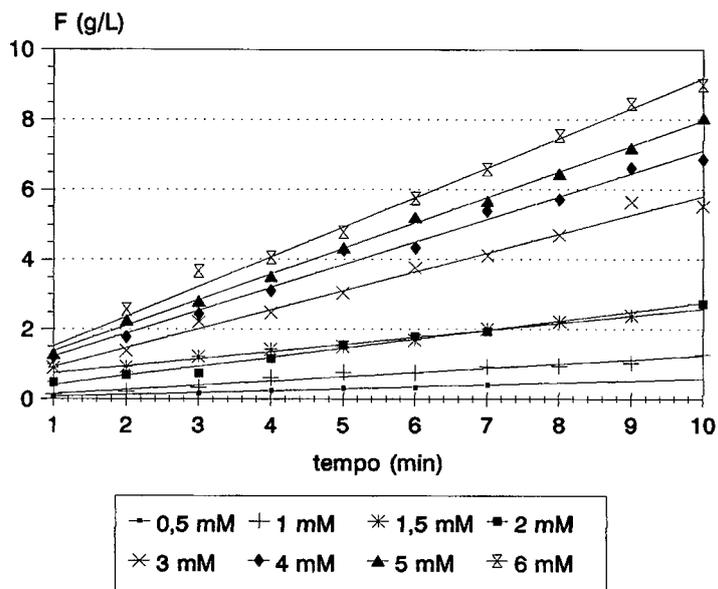
<b>E (g/L)</b>	0,324	0,775	0,974	1,559	1,958	3,888
<b>Área</b>	29.425	69.228	87.374	140.038	177.262	350.317



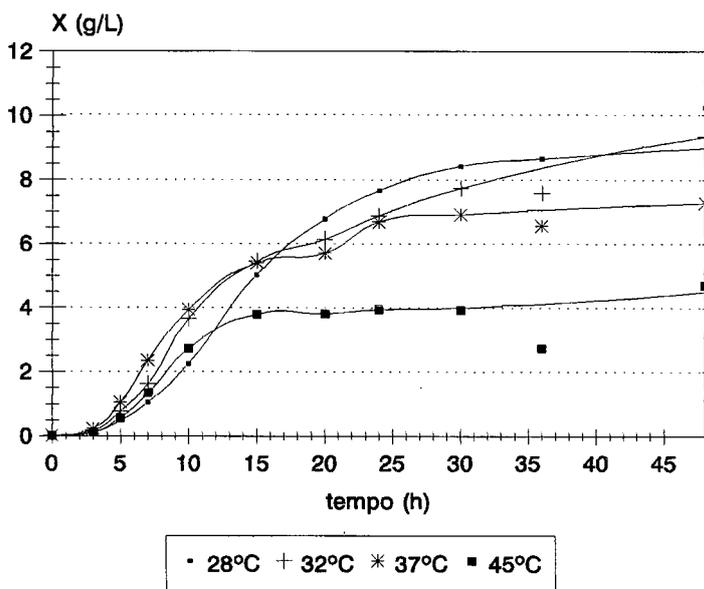
**FIGURA A.3** - Exemplo de curva de calibração para etanol (E), obtida para cromatografia em fase gasosa.

## **APÊNDICE B**

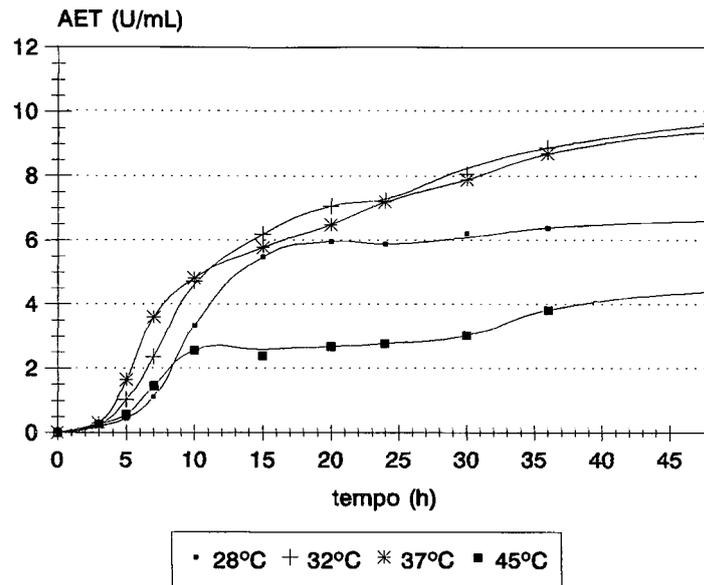
### **FIGURAS**



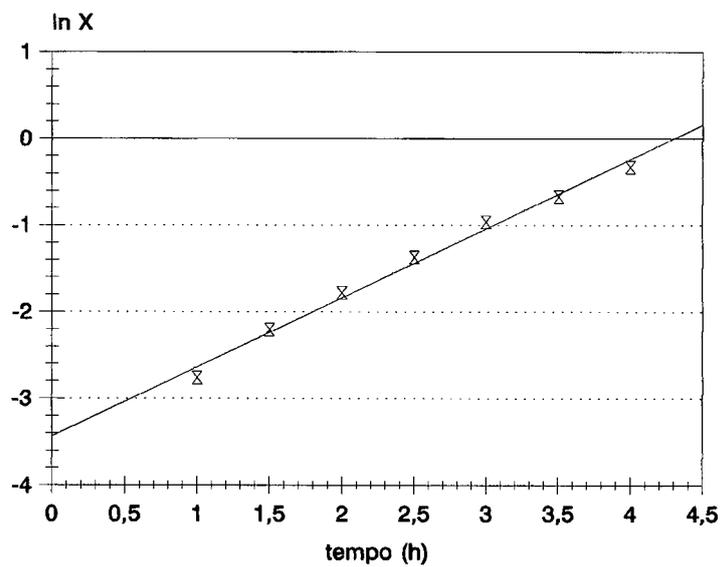
**FIGURA B.1** Concentração de frutose (F), em função do tempo, para diferentes concentrações de inulina.



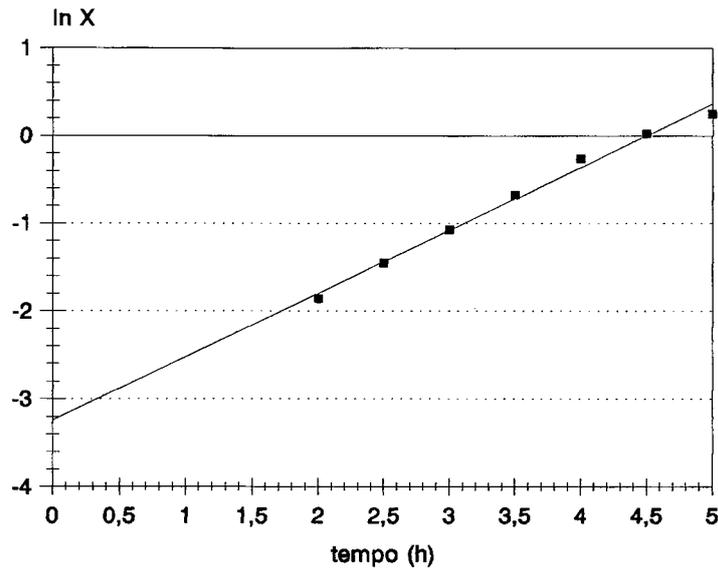
**FIGURA B.2** Concentração celular (X), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.



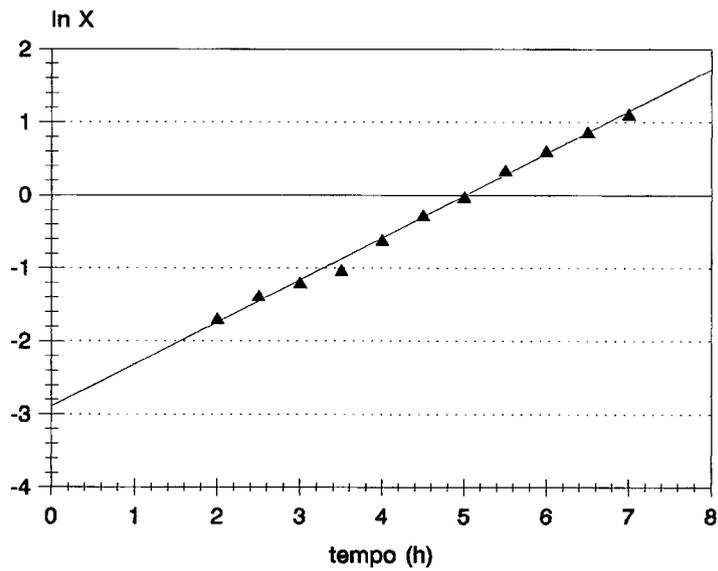
**FIGURA B.3** Atividade enzimática total (AET), em função do tempo, para diferentes condições de temperatura.



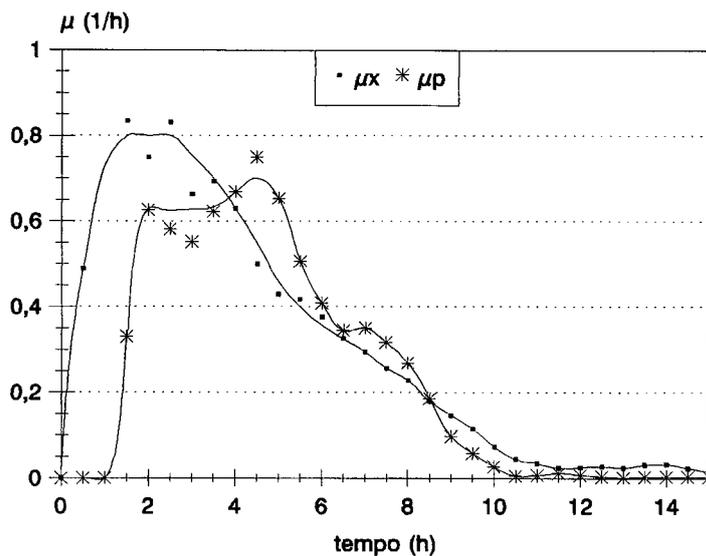
**FIGURA B.4** Determinação de  $\mu_{max}$  pelo método logarítmico, para  $K_L$  igual a  $21 \text{ h}^{-1}$ .  
 $\mu_{max} = 0,79 \text{ h}^{-1}$ ,  $r = 0,99$ .



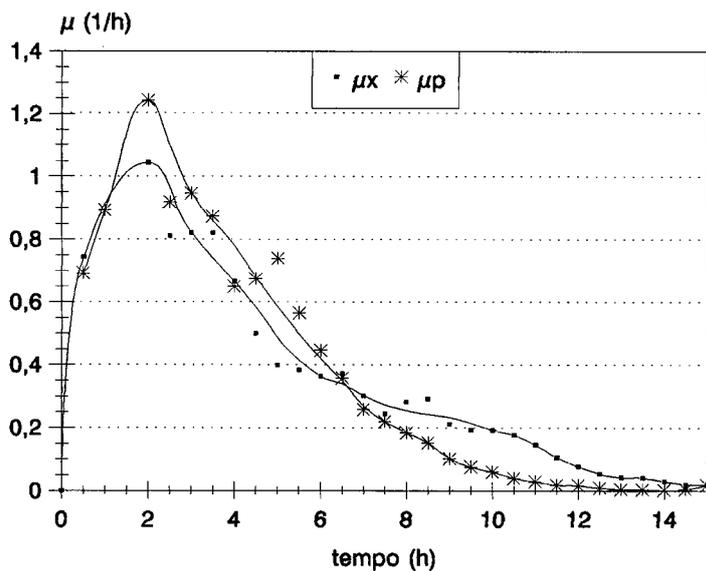
**FIGURA B.5** Determinação de  $\mu_{\max}$  pelo método logarítmico, para  $K_{La}$  igual a  $36 \text{ h}^{-1}$ .  
 $\mu_{\max} = 0,72 \text{ h}^{-1}$ ,  $r = 0,99$ .



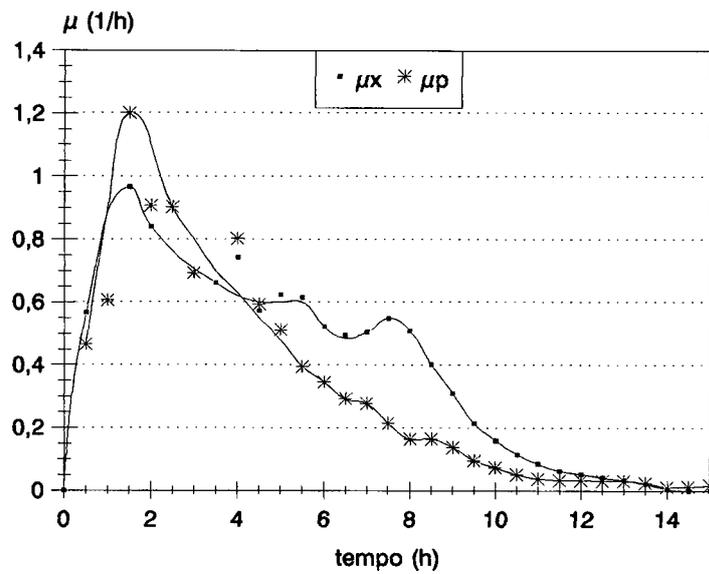
**FIGURA B.6** Determinação de  $\mu_{\max}$  pelo método logarítmico, para  $K_{La}$  igual a  $89 \text{ h}^{-1}$ .  
 $\mu_{\max} = 0,58 \text{ h}^{-1}$ ,  $r = 0,99$ .



**FIGURA B.7** Evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de enzima ( $\mu_p$ ), em função do tempo, para  $K_{La}$  igual a  $21 \text{ h}^{-1}$ .



**FIGURA B.8** Evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de enzima ( $\mu_p$ ), em função do tempo, para  $K_{La}$  igual a  $36 \text{ h}^{-1}$ .



**FIGURA B.9** Evolução da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e de formação de enzima ( $\mu_p$ ), em função do tempo, para  $K_L a$  igual a  $89 \text{ h}^{-1}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIS, J.-J.; KAMMOUN, S.; BLANC, P.; GIRARD, C.; BARATTI, J.C. Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.5, p.1086-1090, 1986.
- AZHARI, R.; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. Purification and Characterization of endo- and exo-Inulinase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.11, p.105-117, 1989.
- BACON, J.S.D. & LOXLEY, R. **Biochemistry Journal**. v.51, p.208-213, 1952. In: VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. **Fermentation Process, Properties and Applications**. *Advances in Applied Microbiology*, v.29, p.139-176, 1983.
- BAJPAI, P. & MARGARITIS, A. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 1. Preparation and enzymatic properties. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.7, p.373-376, 1985.
- BAJON, A.M.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Isolation of an Inulinase Derepressed Mutant of *Pichia polymorpha* for the Production of Fructose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.XXVI, p.128-133, 1984.
- BÄR, A. Xylitol. "Alternative Sweeteners". O'Brien Nabors L., Gelardi R., Marcel Dekker INC., New York, Basel, p. 185-216, 1986.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983. In: ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in Kluyveromyces Yeasts**. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- BAYLEY, L.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2<sup>nd</sup> ed. Mc Graw-Hill Book Co., 1986, 984p.
- BEUTLER, H.O. D-Fructose. v.6, p.321-327. In: **Methods of Enzymatic Analysis**. Ed Bergmeyer, H.U. 3<sup>rd</sup> Edition, Ed. Verlag Chemie: Weinheim - Deenfield Beach, Florida-Basel, 1984
- BOURJI, J.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Isolation of *Kluyveromyces fragilis* derepressed mutant hyperproducer of inulinase for ethanol production from Jerusalem artichoke. **J. Ferment. Technol.**, v.64, n.3, p.239-243, 1986.
- CARNITI, P.; BELTRAME, P.L.; GUARDIONE, D.; FOCHER, B.; MARZETTI, A. Hydrolysis of Inulin: A Kinetic Study on the Reaction Catalyzed by an Inulinase from *Aspergillus ficuum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.575-579, 1991.

- CHANG, S.T. & HAYES, W.A. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms.** Academic Press. New York, p.416-418, 1978.
- CHOI, W.S.; CHOE, Y.K.; KIM, S.I.; BYUN, S.M.; Production of Inulinase using Jerusalem artichoke tuber extract. **J. Korean Agri. Chem., Soc**, v.27,p.238-244, 1984. In: GUPTA, A.K.; RATHORE, P.; KAUR, N.; SINGH, R. **Production, Thermal Stability and Immobilization of Inulinase from *Fusarium oxysporum*.** *J. Chem. Tech. Biotechnology*, v.47, p.245-257, 1990.
- CLAESSENS, G.; VAN LAERE, A.; DE PROFT, M. Purification and Properties of an Inulinase from Chicory Roots (*Cichorium intybus* L.). **J. Plant Physiol.**, v.136, p.35-39, 1990.
- COKER, L.E. & VENKATASUBRAMANIAN, K. High Fructose Corn Syrup.p.165-171 In: CHEREMISINOFF, P. & OVELLETTE, R.P (Ed.).**Biotechnology, Application and Research**, v.1, Technomic Publishing CO INC., 1985.
- DRENT, W.J.; LAHPOR, G.A.; WIEGANT, W.M.; GOTTSCHAL, J.C. Fermentation of Inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Various Habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.2, p.455-462, 1991.
- DUVNJAK, Z.; KOSARIC, N.; HAYES, R.D. Kinetics of ethanol production from Jerusalem artichoke juice with some *Kluyveromyces* species. **Biotechnology Letters**, v.3, n.10, p.589-594, 1981.
- DWIVEDI, B.K. Polyalcohols: sorbitol, mannitol, maltitol and hydrogenated starch hydrolysates. "**Alternative Sweeteners**" .O'Brien Nabors L., Gelardi R., Marcel Dekker INC., New York, Basel, p. 165-183, 1986.
- ECHEVERRIGARAY, S. & TAVARES, F.C.A. Atividade da inulinase em leveduras e fermentações de extrato de *Helianthus tuberosus* L. **Rev. Microbiol.**, SP, v.16, n.2, p.127-131, 1985.
- EFSTATHIOU, I.; REYSSET, G.; TRUFFAUT, N.A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.143-149, 1986.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.26, p.13-20, 1987.
- ETTALIBI, M. & BARATTI, J.C. Molecular and Kinetic Properties of *Aspergillus ficuum* Inulinases. **Agric. Biol. Chem.**, v.54, n.1, p.61-68, 1990.

- ESMON, P.C.; ESMON, B.E.; SCHAUER, I.E.; TAYLOR, A.; SCHEKMAN, R. Structure, assembly and secretion of octameric invertase. **J.Biol.Chem.**, v.262, p.4387-4394, 1987. In: ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in *Kluyveromyces Yeasts***. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- FERREIRA, M.S.S.; DE ANDRADE, A.V.M.; KENNEDY, J.F. Properties of a Thermostable Nonspecific Fructofuranosidase Produced by *Cladosporium Cladosporioides* Cells for Hydrolysis of Jerusalem Artichoke Extract. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.31, n.1, p.1-9, 1991.
- FUCHS, A.; DE BRUIJN, J.M.; NIEDEVELD, C.J. Bacteria and yeasts as possible candidates for the production of inulinases and levanases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.51, p.333-351, 1985.
- FUCHS, A. Perspectives of Inulin and Inulin-Containing Crops in the Netherlands and in Europe. Proceeding of the 3<sup>rd</sup> Seminar on Inulin. **International Agricultural Centre**, p.80-102, Wageningen, Holanda, 1<sup>st</sup> March, 1989.
- GOTTSCHALK, G. **Bacterial Metabolism**. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag. New York, 359p., 1988.
- GROOTWASSINK, J.W.D. & FLEMING, S.E. Non-specific  $\beta$ -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.2, p.45-53, 1980.
- GROOTWASSINK, W.D. & HEWITT, G.M. Inducible and Constitutive Formation of  $\beta$ -fructofuranosidase (inulase) in batch and Continuous Cultures of the Yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, v.129, p.31-41, 1983.
- GUIRAUD, J.P.; DAURELLES, J.; GALZY, P. Alcohol production from Jerusalem artichoke using yeasts with inulinase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.XXIII, p.1461-1465, 1981.
- GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Inulin Conversion by Yeasts, p.255-296. In: VERACHTERT, H. & DE MOT, R. **Yeast, Biotechnology and Biocatalysis**. v.5. Catholic University of Leuven, Belgium, 1989, 521p.
- GUPTA, A.K.; NAGPAL, B.; KAUR, N.; SINGH, R. Mycelial and extracellular inulinases from *Fusarium oxysporum* grown on aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. **J. Chem. Tech. Biotechnology**, v.42, p.69-76, 1988.
- GUPTA, A.K.; KAUR, N.; SINGH, R. Fructose and Inulinase Production from Waste *Cichorium intybus* Roots. **Biological Wastes**, v.29, p.73-77, 1989.
- GUPTA, A.K.; RATHORE, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Thermal Stability and Immobilization of Inulinase from *Fusarium oxysporum*. **J. Chem. Tech. Biotechnology**, v.47, p.245-257, 1990.

- GUPTA, A.K.; SINGH, D.P.; KAUR, N.; SINGH, R. Production, Purification and Immobilization of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.59, p.377-385, 1994 a.
- GUPTA, A.K.; GILL, A.; KAUR, N.; SINGH, R. High Thermal Stability of Inulinases from *Aspergillus* species. **Biotechnology Letters**, v.16, n.7, p.733-734, 1994 b.
- HANOVER, L.M. Crystalline Fructose: Production, Properties and Applications. In: SCHENCK, F.W. & HEBEDA, R.E. **Starch Hydrolysis Products. Worldwide Technology, Production and Applications**. USA. 1992, 650p.
- HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKUNAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v.5, n.1, p.37-50, 1986.
- HIDAKA, H. & HIRAYAMA, M. Useful characteristics and commercial applications of fructooligosaccharides. **Biochemical Society Transactions**, v.19, p.561-565, 1991.
- HENSING, M.C.M.; ROUWENHORST, R.J.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Production and Localization of Inulinase in *Kluyveromyces* yeasts, p.241-250. In: FUCHS, A. (Ed.) **Inulin and Inulin-containing Crops**. Elsevier Science Publishers, 1993, 417p.
- HENSING, M.C.M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.516-521, 1994.
- KAUR, N.; KAUR, M.; GUPTA, A.K.; SINGH, R. Properties of  $\beta$ -fructosidase (Invertases and Inulinases) of *Fusarium oxysporum* Grown on an Aqueous Extract of *Cichorium intybus* Roots. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.53, p.279-284, 1992.
- KAWAMURA, M. & UCHIYAMA, T. Formation of a cycloinulo-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. **Carbohydrate Research.**, v.192, p.83-90, 1989.
- KIDBY, D.K. & DAVIES, R. Invertase and disulphide bridges in the yeast wall. **J. Gen. Microbiol.**, v.61, p.327-333, 1970. In: ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in Kluyveromyces Yeasts**. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- KIM, K.C. **J. Korean Agric. Chem. Soc.**, v.18, p.42-51, 1975a. In: VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. **Fermentation Process, Properties and Applications**. Advances in Applied Microbiology, v.29, p.139-176, 1983.
- KIM, K.C. **J. Korean Agric. Chem., Soc.** v.18, p.177-182, 1975b. In: VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. **Fermentation Process, Properties and Applications**. Advances in Applied Microbiology, v.29, p.139-176, 1983.

- KIM, C.H. & RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, v.11, n.3, p.201-206, 1989.
- KIM, DONG-MAN & KIM, HAK-SUNG, Continuous production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and Inulinase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p.336-342, 1992.
- KIM, MI-KYUNG; KIM, YOUNG HO; KIM, BYUNG IM; BYUN, SI MYUNG, UHM, TAI-BOONG. Thermal stability of an acidic inulinase from *Scytalidium acidophilum*. **Biotechnology Letters**, v.16, n.9, p.9650-966, 1994.
- LALOUX, OLIVIER. **Caractérisation moléculaire du gene d'inulinase de *K. marxianus* var. marxianus et étude de ses relations avec diverses  $\beta$ -fructosidase fonctionnellement apparentées**, Namur: Facultés Universitaire N.D. de la Paix, 175p. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Facultés Universitaire N.D. de la Paix. 1992.
- LAMPEN, J.O. External enzymes of yeasts: their nature and formation. Antonie van Leeuwenhoek **J. Microbiol. Serol.**, v.43, p.1-18, 1968. In: ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in *Kluyveromyces* Yeasts**. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- LE DUY, A. & ZAJIC, J.E. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a point: Applied to Growth and Product Formation. **Biotechnol. Bioeng.**, v.25, p.805-810, 1973.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from Four Yeasts. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.21, p.271-274, 1988.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.54, p.311-315, 1992.
- MUKHERJEE, K. & SENGUPTA, S. The production of constitutive invertase and inulinase by the mushroom *Panaeolus papillonaceus* in submerged culture. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p.773-777, 1985.
- NAKAMURA, T.; HOASHI, S.; NAKATSU, S. Culture Conditions for Inulinase Production by *Aspergillus*. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v.52, n.3, p.105-110, 1978.
- NEGORO, H. & KITO, E. Purification and Enzymatic Properties of Intracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Candida kefyr*. **J. Ferment. Technol.**, v.51, n.2, p.103-110, 1973 a.
- NEGORO, H. & KITO, E.  $\beta$ -fructofuranosidase from *Candida kefyr*. **J. Ferment. Technol.**, v.51, n.2, p.96-102, 1973 b.

- ONODERA, S. & SHIOMI, N. Purification and Substrate Specificity of endo-Type Inulinase from *Penicillium purpurogenum*. **Agric. Biol. Chem.**, v.52, n.10, p.2569-2576, 1988.
- PAREKH, S. & MARGARITIS, A. Inulinase ( $\beta$ -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.446-448, 1985.
- PAREKH, S. & MARGARITIS, A. Production of Inulinase ( $\beta$ -Fructan Fructanohydrolase) by *Kluyveromyces marxianus*. **Agric. Biol. Chem.**, v.50, n.4, p.1085-1087, 1986.
- PASSADOR-GURGEL, G.; FURLAN, S.A.; MELLER, J.K.; JONAS, R. Application of a Microtitre Reader System to the Screening of Inulinase Producing Yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.158-161, 1996.
- PESSOA JUNIOR, A.; VITOLO, M.; HUSTEDT, H. Use of  $K_L a$  as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.37-38, 1996. (in press).
- POREP, H.; HOFF, M.V.; FURLAN, S.A.; GERN, R.M.M.; MERKLE, R.; JONAS, R. Utilização do sistema "Microtiter Reader" para diferenciar a localização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus*. . **X SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações**. Santos, SP, 7-11 nov, 1993 a. Abstract Book p.89.
- POREP, H.; FRITZSCHE, S.; FURLAN, S.A.; HOFF, M.V.; LIETH, I.; SCHNEIDER, A.L.S.; JONAS, R. The Microtiter - System: a Screening System for New Enzymes and Microbes. **3<sup>er</sup> Congresso Latino Americano Y Nacional de Biotecnologia**. Santiago, Chile, 16-19 nov, 1993 b. Abstract Book p168.
- POREP, H.; SCHNEIDER, A.L.S.; FURLAN, S.A.; GERN, R.M.M.; MERKLE, R.; JONAS, R. Utilização do Sistema "Microtiter Reader" na Seleção de Meios de Cultura. **X SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações**. Santos, SP, 7-11 nov, 1993 c. Abstract Book p.89.
- ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; VAN DER BAAN, A.; SCHEFFERS, A.; VAN DIJKEN, J. Production, Distribution and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.5, p.1131-1137, 1988.
- ROUWENHORST, R.J. **Production and Localization of Inulinases in *Kluyveromyces* Yeasts**. Delft: Delft University of Technology, 149p. Tese de Doutorado. Department of Microbiology and Enzymology, Delft University of Technology, 1990.
- RUMESSEM, J.J.; Fructose and Related Food Carbohydrates. Sources, Intake, Absorption, and Clinical Implications. **Scand J. Gastroenterol.**, v.27, p.819-828, 1992.
- SCHIWECK, H. Crystalline Fructose: Production, Specifications and Physiological Properties - an overview. **International Conference 'Sweeteners, Carbohydrate and Low Calorie'**, 22-25 set, Los Angeles, 1988.

- SNYDER, H.E. & PHAFF, H.J. Studies on a  $\beta$ -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. **Journal of Microbiol. Serol.**, v.26, p.433-452, 1960.
- STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.; PAINTER, L. P.R. eds. **The Microbial World**. 5<sup>th</sup> Ed. Prentice - Hall, New Jersey, 689p. 1986.
- TSANG, W.T. & GROOTWASSINK, W.D. Extraordinarily rapid appearance of a  $\beta$ -fructofuranosidase (exo-inulase)-hyperproducing Mutant in Continuous Culture of *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.679-688, 1988.
- UHM, T.B.; BYUN, S.M.; KWON, Y.J.; HAN, S.B.; RYU, K.S. *Biotechnology Letters*, v.9, p.287-290, 1987. In: KIM, MI-KYUNG; KIM, YOUNG HO; KIM, BYUNG IM; BYUN, SI MYUNG, UHM, TAI-BOONG. Thermal stability of an acidic inulinase from *Scytalidium acidophilum*. **Biotechnology Letters**, v.16, n.9, p.9650-966, 1994.
- VAN DIJKEN, J.P. & SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugar by yeasts. **FEMS Microbiolgy Review**, v.32, p.199-224, 1986.
- VAN DIJKEN, J.P.; HENSING, M.; SCHEFFERS, W.A.; ROUWENHORST, R.J.; VERBAKEL, J.M.A. Physiology of *Kluyveromyces marxianus* in relation to production of extracellular proteins. **Fourth Meeting on Biology of Kluyveromyces**, 21-22 sept, Dusseldorf, 1991.
- VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. Fermentation Process, Properties and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.139-176, 1983.
- VUKOV, K.; ERDÉLYI, M.; PICHLER-MAGYAR, E. Preparation of pure inulin and various inulin-containing products from Jerusalem Artichoke for human consumption and for diagnostic use. p.341-345. In: FUCHS, A. **Inulin and Inulin-containing crops**. Studies in Plant Science, 3. Ed. Elsevier.1993.
- VULLO, D.L.; COTO, C.E.; SENERIZ, F. Characteristics of an Inulinase Produced by *Bacillus subtilis* 430A, a Strain Isolated from the Rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby) **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8, p.2392-2394, 1991.
- WISE, W.S. **J.Gen.Microbiol.**, v.5, p.167, 1951. In: RAINER, B.W. **Determination of Volumetric Oxygen Transfer Coefficient  $K_{La}$  in Bioreactors**. Chem. Biochem. Eng., v.4, n.4, p.185-196, 1990.
- WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. Fructans of higher plants. *Polysaccharide Chemistry*, p.276-291, 1953. In: VERACHVERT, H. & DE MOT, R. **Yeast, Biotechnology and Biocatalysis**, v.5. Catholic University of Leuven, Belgium, 1989, 521p.
- WHITE, J. Fructose Syrup: Production, Properties and Applications. In: SCHENCK, F. W. & HEBEDA, R.E. **Starch Hydrolysis Products. Worldwide Technology, Production and Applications**. USA. 1992, 650p.

XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Inulinase from *Chrysosporium pannorum*. **J. Ferment. Technol.**, v.66, n.5, p.553-558, 1988.

ZITTAN, L. Enzymatic Hydrolysis of Inulin - An Alternative Way to Fructose Production. **Starch**, v.33, n.11, p.373-377, 1981.