



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



GEISE CAMILA DE ARAUJO RIBEIRO

**INULINASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS
DO SEMIÁRIDO BAIANO: ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO E
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FRUTOSE E FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

Feira de Santana, BA
2014

GEISE CAMILA DE ARAUJO RIBEIRO

**INULINASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS
DO SEMIÁRIDO BAIANO: ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO E
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FRUTOSE E FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis.

Feira de Santana, BA
2014

GEISE CAMILA DE ARAUJO RIBEIRO

INULINASES PRODUZIDAS POR LEVEDURAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO
BAIANO: ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
FRUTOSE E FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Banca Examinadora em 18 de Dezembro de 2014.

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Aparecida Assis
Orientadora/UEFS

Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida
Membro Convidado/UEFS

Prof^ª. Dr^ª. Clícia Maria de Jesus Benevides
Membro Convidado/UNEB

Feira de Santana, BA
2014

À minha mãe, por todo amor, carinho, apoio,
exemplo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as bênçãos e proteção durante a minha caminhada e por ter me dado paz e vontade para persistir, mesmo quando parecia não fazer sentido.

À minha mãe, **Marlene**, pelo amor, dedicação, exemplo, ensinamentos, amizade e por ser a luz da minha vida.

À minha avó querida, **Marta**, por ter ajudado na minha criação e por ter me ensinado o louvor a Deus, a humildade e o respeito ao próximo.

Às minhas tias, **Marly e Mari**, pela amizade, companheirismo, carinho e amor.

À professora **Sandra**, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com pesquisa científica e pela orientação e dedicação.

Aos **professores**, pelos ensinamentos e contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional, em especial, ao professor **Hugo Brandão**, devido apoio e disponibilização quando solicitado e pela colaboração para desenvolvimento desse trabalho.

Aos **colegas**, em especial Dayse Alessandra, pela colaboração e dedicação.

À **Universidade Estadual de Feira de Santana** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por me fornecerem estrutura e apoiar financeiramente nas pesquisas.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)

RESUMO

A exploração de espécies de micro-organismos da região semiárida tem se tornado uma alternativa viável para a indústria, destacando-se leveduras produtoras de inulinases, que podem ser aplicadas na produção de frutose e fruto-oligossacarídeos, a partir da hidrólise da inulina. O presente trabalho teve como tema o estudo da imobilização de enzimas inulinases produzidas por leveduras do semiárido baiano, sendo o objetivo geral estudar a aplicação de inulinases imobilizadas na produção de concentrados de frutose e fruto-oligossacarídeos. As linhagens de leveduras *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) e *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) foram obtidas da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A imobilização foi realizada utilizando-se como suporte casca de ovo, celite, Immobeads®, Sepabeads® e sílica, sendo os resultados analisados com auxílio do programa *Origin* versão 8.5.1. A imobilização de inulinase nos suportes sólidos demonstrou ser uma técnica viável, uma vez que não inativou a enzima, apresentando a maior atividade nas amostras de inulinase de CCMB 306 imobilizada em celite em meio orgânico. Na otimização da produção de fruto-oligossacarídeos obteve-se a maior concentração de produto nas amostras com concentração de inulina de 25% e tempo de reação de 16 h. Em conclusão, a aplicação de enzimas inulinases obtidas através de micro-organismos presentes no semiárido na hidrólise da inulina é de significativa importância para o desenvolvimento biotecnológico da região, sendo interessante a otimização dos métodos de imobilização e seleção adequada dos suportes a serem utilizados para obtenção de melhores resultados.

Palavras-chave: Inulina. Inulinase. Frutose. Fruto-oligossacarídeos. Imobilização.

ABSTRACT

The exploration of the microorganisms species semiarid region has become a viable alternative for the industry, especially producing yeast inulinases which can be applied in the production of fructo-oligosaccharides and fructose from the hydrolysis of inulin. This work had as its theme the study of the immobilization inulinases enzymes produced by yeasts of the semiarid region of Bahia, with the overall objective of the work is to study the application of inulinases immobilized in the production of concentrated fructose and fructo-oligosaccharides. The strains of yeast *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) and *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) were obtained from the Culture Collection of Microorganisms of Bahia (CCMB), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Immobilization was performed using as support eggshell, celite, Immobeads®, Sepabeads® and silica, and the results analyzed using the Origin version 8.5.1 program. Immobilization in solid supports inulinase shown to be a viable technique, since the non-inactivated enzyme, showing increased activity in the inulinase CCMB 306 samples immobilized on celite in organic medium. Optimization of fructo-oligosaccharides production was achieved the highest concentration of product in samples with inulin concentration of 25% and time of reaction 16 h. In conclusion, the application of inulinases enzymes produced by micro-organisms of the semiarid in the hydrolysis of inulin is of significant importance for biotechnology development in the region.

Keywords: Inulin. Inulinase. Fructose. Fructo-oligosaccharides. Immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquemática da formação de ligação peptídica entre aminoácidos	18
Figura 2	Níveis estruturais de organização de enzimas	18
Figura 3	Estruturas secundárias de enzimas: estruturas α -hélice e folha β -pregueada	19
Figura 4	Estrutura cristalina de endoinulinase de <i>Aspergillus ficuum</i>	22
Figura 5	Estrutura química da inulina	26
Figura 6	Estrutura química dos FOS (A) 1-questose, (B) nistose e (C) 1-frutofuranosil nistose	28
Figura 7	Métodos para imobilização de enzimas	35
Figura 8	Hexágono regular demonstrando Planejamento Doehlert para síntese de FOS	44
Figura 9	Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	45
Figura 10	Concentração de proteína total (mg/mL) estimada para enzima inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	47
Figura 11	Relação da atividade da enzima inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g	48
Figura 12	Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	49
Figura 13	Concentração de proteína total da enzima inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	51
Figura 14	Relação da atividade da enzima inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g	52
Figura 15	Cromatograma padrão de frutose	53
Figura 16	Cromatograma do padrão 1-questose	54
Figura 17	Cromatograma do padrão nistose	54
Figura 18	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase (extrato bruto) de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	55
Figura 19	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) quando imobilizada em casca de ovo	56
Figura 20	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) quando imobilizada em casca de ovo com glutaraldeído	57
Figura 21	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) quando imobilizada em celite em meio aquoso	58
Figura 22	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) quando imobilizada em celite em meio orgânico	59
Figura 23	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) quando imobilizada em Immobeads®	60

Figura 24	Cromatograma dos produtos formados na produção de FOS por inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) usando como substrato inulina 25% (p/v)	61
Figura 25	Gráfico de superfície de resposta na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	62
Figura 26	Gráfico de superfície de área na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	63
Figura 27	Gráfico de Pareto da produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	63
Figura 28	Gráfico de superfície de resposta da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	65
Figura 29	Gráfico de superfície de área na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	66
Figura 30	Gráfico de Pareto da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	66
Figura 31	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase (extrato bruto) de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	68
Figura 32	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> quando imobilizada em casca de ovo	69
Figura 33	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604) quando imobilizada em casca de ovo com glutaraldeído	70
Figura 34	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604) quando imobilizada em celite em meio aquoso	71
Figura 35	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604) quando imobilizada em celite em meio orgânico	72
Figura 36	Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> quando imobilizada em Immobeads®	73
Figura 37	Gráfico de superfície de resposta na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	74
Figura 38	Gráfico de superfície de área na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	75
Figura 39	Gráfico de Pareto da produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	75

(CCMB 604)

Figura 40	Gráfico de superfície de resposta da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	77
Figura 41	Gráfico de superfície de área na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	78
Figura 42	Gráfico de Pareto da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Planejamento Doehlert para otimização da síntese de fruto-oligossacarídeos	44
Tabela 2	Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	46
Tabela 3	Concentração de proteína total da enzima inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	47
Tabela 4	Relação da atividade da enzima inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g	48
Tabela 5	Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	50
Tabela 6	Concentração de proteína total da enzima inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	51
Tabela 7	Relação da atividade da enzima inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g	52
Tabela 8	Planejamento Doehlert para otimização da produção de 1-questose na hidrólise de inulina por inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	61
Tabela 9	Análise da variância na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	64
Tabela 10	Planejamento Doehlert para otimização da produção de nistose na hidrólise de inulina por inulinase de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	64
Tabela 11	Análise da variância na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	67
Tabela 12	Planejamento Doehlert para otimização da produção de 1-questose na hidrólise de inulina por inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	74
Tabela 13	Análise da variância na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	76
Tabela 14	Planejamento Doehlert para otimização da produção de nistose na hidrólise de inulina por inulinase de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	77
Tabela 15	Análise da variância na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	ENZIMAS	17
3.2	INULINASES	21
3.3	LEVEDURAS	24
3.4	INULINA E FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	25
3.5	FRUTOSE	29
3.6	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	31
3.6.1	Suportes para imobilização	32
3.6.2	Métodos de imobilização	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	OBTENÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA SELECIONADAS	38
4.2	PREPARO DO INÓCULO E OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	38
4.3	IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INULINASE EM DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS	38
4.3.1	Imobilização da enzima inulinase em casca de ovo por adsorção	38
4.3.2	Imobilização da enzima inulinase em casca de ovo por ligação covalente cruzada	39
4.3.3	Imobilização da enzima inulinase em celite por adsorção em meio aquoso	39
4.3.4	Imobilização da enzima inulinase em celite por adsorção em meio orgânico	39
4.3.5	Imobilização da enzima inulinase em Immobeads®	40
4.3.6	Imobilização da enzima inulinase em Sepabeads® por ligação covalente	40
4.3.7	Imobilização da enzima inulinase em Sepabeads® por ligação covalente cruzada	40
4.3.8	Imobilização da enzima inulinase em sílica por ligação covalente	41
4.4	PRODUÇÃO DE FRUTOSE	41
4.4.1	Produção de frutose por inulinase livre (extrato bruto)	41
4.4.2	Produção de frutose por inulinase imobilizada e determinação da taxa de imobilização	42
4.4.3	Dosagem de proteína total da enzima livre e imobilizada	42
4.5	PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	43
4.5.1	Síntese de fruto-oligossacarídeos	43
4.5.2	Identificação dos produtos obtidos	43
4.5.3	Análise quantitativa por otimização da produção de fruto-oligossacarídeos	43
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	IMOBILIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE FRUTOSE	45

5.1.1	Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	45
5.1.2	Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	49
5.2	PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	53
5.2.1	Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	53
5.2.1.1	Análise qualitativa	53
5.2.1.2	Análise quantitativa	60
5.2.2	Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	67
5.2.2.1	Análise qualitativa	67
5.2.2.2	Análise quantitativa	73
6	DISCUSSÃO	80
6.1	IMOBILIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE FRUTOSE	80
6.1.1	Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	80
6.1.2	Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	83
6.2	PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	86
6.2.1	Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Pseudozyma sp.</i> (CCMB 306)	86
6.2.2	Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (CCMB 604)	87
7	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXOS	96
	ANEXO A – CURVA PADRÃO DE 1-QUESTOSE	96
	ANEXO B – CURVA PADRÃO DE NISTOSE	97

1 INTRODUÇÃO

O semiárido baiano é uma região que possui características naturais altamente heterogêneas, o que propicia a apresentação de uma expressiva biodiversidade, incluindo micro-organismos que são fonte potencial de enzimas de interesse industrial. A exploração de espécies da região semiárida tem se tornado uma alternativa viável para a indústria, podendo contribuir para o desenvolvimento científico e biotecnológico, bem como a sustentabilidade da região.

Dentre as espécies da região semiárida que possuem aplicabilidade industrial destacam-se as leveduras produtoras de enzimas inulinases, que podem ser aplicadas em processos industriais, como na produção de frutose e fruto-oligossacarídeos, a partir da hidrólise da inulina, um carboidrato constituído por unidades de frutose ligadas a uma unidade de glicose.

A utilização da frutose na indústria alimentícia tem crescido de forma acentuada devido diversas características desse carboidrato, como, por exemplo, seu poder adoçante superior ao da sacarose, sua maior solubilidade em água quando comparada a outros açúcares, e por ser tolerada por pacientes portadores de diabetes, uma vez que não necessita da ação da insulina para ser metabolizado.

Os fruto-oligossacarídeos também são produtos de grande interesse industrial, devido serem aplicados em diversos produtos alimentícios, seja como adjuvante, adoçante ou substituto de gordura em produtos light.

No entanto, para obter-se frutose e fruto-oligossacarídeos a partir da aplicação da inulinase, é necessária a seleção adequada de micro-organismos produtores dessa enzima e dos métodos e procedimentos que devem ser realizados para esse fim.

Como as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores relacionados ao meio no qual ocorre a reação, para que a atividade da inulinase seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-la da interação com o meio, sendo a imobilização em suportes sólidos uma forma eficaz de proteger e melhorar a estabilidade da amostra enzimática durante o processo catalisado pela mesma.

Dessa forma, o trabalho apresentado teve como tema o estudo da imobilização de enzimas inulinases produzidas por leveduras do semiárido baiano, propondo selecionar os métodos e suportes a serem utilizados na imobilização e aplicar a enzima imobilizada na produção de concentrados de frutose e fruto-oligossacarídeos. Constituiu-se como problema da pesquisa como imobilizar enzimas inulinases produzidas por leveduras isoladas do

semiárido baiano para que as mesmas sejam aplicadas na produção industrial de concentrados de frutose e fruto-oligossacarídeos. O objetivo geral do trabalho foi estudar a aplicação de inulinases imobilizadas na produção de concentrados de frutose e fruto-oligossacarídeos.

Esperou-se que os resultados deste trabalho possam determinar quais suportes e métodos de imobilização podem ser aplicados a inulinase de forma eficaz, para que os mesmos possam ser aplicados na produção industrial de frutose e fruto-oligossacarídeos a partir da hidrólise da inulina pela inulinase imobilizada, propiciando, assim, o uso industrial de produtos obtidos de recursos da região semiárida, a fim de contribuir para o conhecimento da biodiversidade e o aproveitamento do potencial biotecnológico da região.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a aplicação de inulinases imobilizadas na produção de concentrados de frutose e fruto-oligossacarídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a enzima inulinase a partir de leveduras *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) e *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) isoladas do semiárido baiano.
- Imobilizar a enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) e *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) em suportes sólidos, selecionando os métodos de imobilização e suportes adequados.
- Aplicar as enzimas imobilizadas na produção de concentrados de frutose e determinar a dosagem de açúcares redutores obtida.
- Aplicar a enzima imobilizada na produção de fruto-oligossacarídeos, identificar e determinar a quantidade de produto formado durante o processo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENZIMAS

Diversas reações químicas são mediadas pela presença de catalisadores, substâncias capazes de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada ao fim do processo. A catálise destaca-se entre as diversas funções das proteínas, uma vez que, na ausência da mesma, a maioria das reações em sistemas biológicos para produção de produtos essenciais a manutenção e desenvolvimento desses organismos não se realizaria ou ocorreria de forma lenta. Com exceção de alguns RNAs (ribozimas) que são catalisadores durante seu próprio processamento, os catalisadores biológicos são as enzimas, extremamente eficientes e de alta regiosseletividade e estereosseletividade (CAMPBELL; FARRELL, 2007; DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; TORRES, 2001).

As enzimas são proteínas complexas presentes em células de seres vivos, tais como, plantas, fungos e bactérias. Essas proteínas controlam várias funções vitais incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de acelerar a reação dos processos bioquímicos, tornando-os mais eficiente. A atividade catalítica de uma enzima depende da integridade da sua conformação protéica nativa, sendo as estruturas protéicas fundamentais para que a enzima desempenhe sua função (LEHNINGER *et al*, 2002; MAKINO, 2004).

De acordo Torres (2001), sendo proteínas globulares, as enzimas são compostas por aminoácidos ligados uns aos outros por meio da ligação peptídica estabelecida entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente, formando uma longa cadeia (Figura 1).

Para desencadear sua atividade catalítica, muitas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além dos seus resíduos de aminoácidos. Entretanto, algumas enzimas necessitam da presença de pequenas moléculas inorgânicas ou orgânicas que são essenciais à sua atividade, denominadas, respectivamente, cofatores e coenzimas. Ao ligar-se ao cofator ou a coenzima, a enzima forma um complexo e torna-se cataliticamente ativa, passando a ser denominada holoenzima. A estrutura não protéica (cofator ou coenzima) da holoenzima é denominada grupo prostético, sendo a estrutura protéica denominada apoenzima ou apoproteína (CAMPBELL; FARRELL, 2007; LEHNINGER *et al*, 2002; TORRES, 2001).

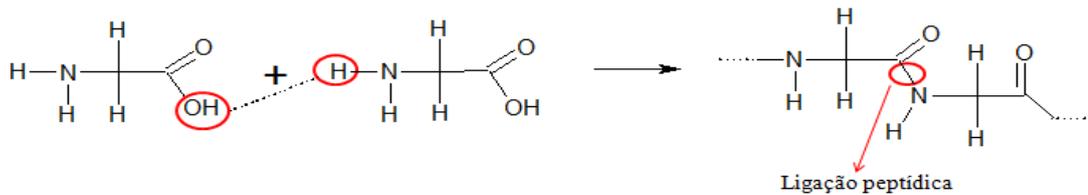


Figura 1: Esquemática da formação de ligação peptídica entre aminoácidos.

A estrutura de uma enzima é dividida em quatro níveis de organização, conforme demonstrado na Figura 2. Cada enzima é caracterizada pelo número de aminoácidos componentes de sua cadeia e a ordem em que eles se encontram, compondo essa organização a estrutura primária da enzima. A estrutura primária descreve o número de aminoácidos, a espécie, a sequência e a localização das pontes dissulfeto (cistina) de uma cadeia polipeptídica. A estrutura é estabilizada pelas ligações peptídicas e pontes dissulfeto. As ligações peptídicas têm caráter parcial de dupla ligação, impedindo a rotação livre em torno do carbono da carbonila e o nitrogênio da ligação peptídica, no entanto, as ligações entre os carbonos α e os grupos α -amino ou α -carboxila podem rotacionar livremente, permitindo que a cadeia polipeptídica assumam diferentes conformações (CAMPBELL; FARRELL, 2007; TORRES, 2001).

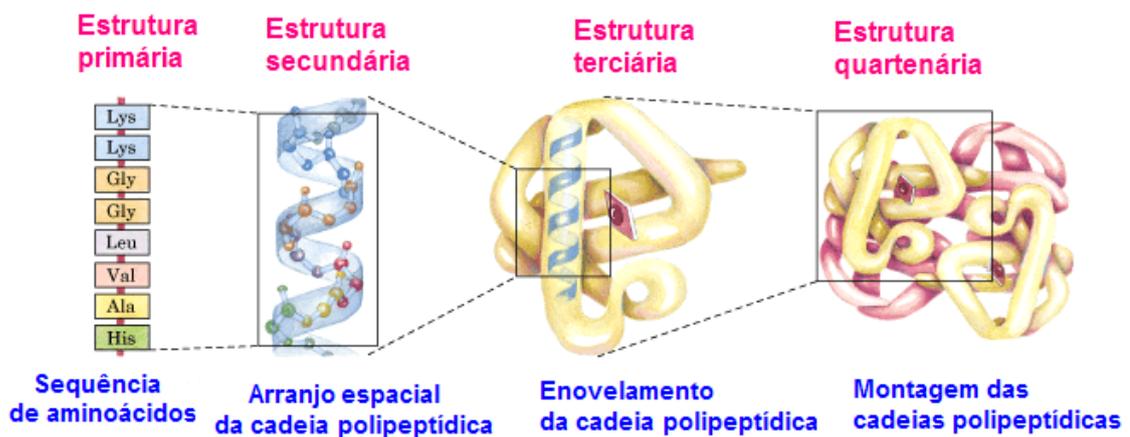


Figura 2: Níveis estruturais de organização de enzimas.

Fonte: LEOPOLDO, 2010.

Segundo Torres (2001), a estrutura secundária das enzimas é formada pelo arranjo tridimensional dos aminoácidos, formando dobramentos regulares estabilizados por pontes de hidrogênio entre o oxigênio carbonil de uma ligação peptídica e o hidrogênio amina de uma ligação peptídica próxima. Dependendo da organização desses arranjos, a estrutura secundária pode ser denominada α -hélice ou folha β -pregueada. As enzimas apresentam em sua

conformação espacial apenas uma dessas estruturas ou parte da cadeia organizada em estrutura α -hélice e parte em estrutura β -pregueada, além de regiões de conformação irregular (Figura 3).

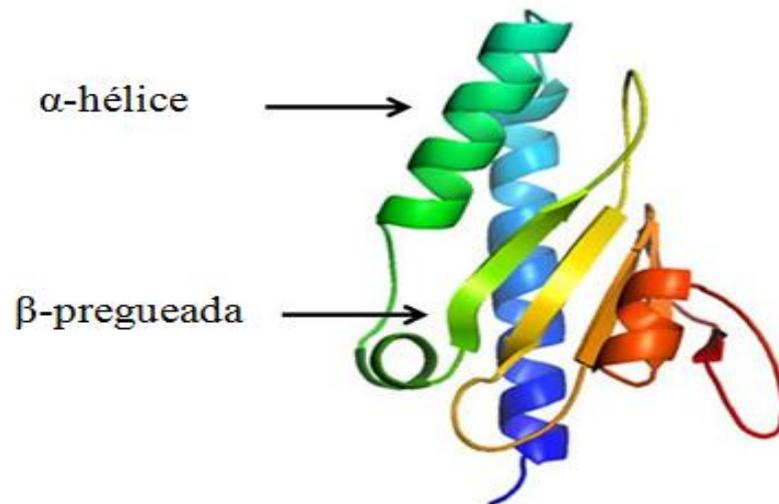


Figura 3: Estruturas secundárias de enzimas: estruturas α -hélice e folha β -pregueada.
Fonte: EBERLIN, 2009.

Na estrutura α -hélice, a molécula polipeptídica se apresenta como uma hélice, formando uma estrutura espiral que consiste em um esqueleto polipeptídico central no qual as ligações de hidrogênio ocorrem entre os oxigênios da carbonila e hidrogênios da amida com ligação peptídica que compõem esse esqueleto, envolvendo apenas uma cadeia polipeptídica. Na estrutura folha β -pregueada, por sua vez, as ligações de hidrogênio ocorrem entre grupos de uma ou mais cadeias polipeptídicas adjacentes, perpendicularmente ao esqueleto polipeptídico central, sendo formadas entre segmentos distintos da cadeia protéica (CHAMPE *et al*, 1997; TORRES, 2001).

A conformação tridimensional que a molécula protéica assume em solução é descrita pela estrutura terciária, formada por ligações entre os grupos R dos aminoácidos. Essas ligações promovem na molécula dobramentos, o que leva a forma geral globular das enzimas. As interações químicas que estabelecem e mantêm a estrutura terciária das enzimas são formadas entre as cadeias laterais dos aminoácidos, sendo as principais as interações hidrofóbicas, as interações eletrostáticas, as ligações não covalentes e as ligações de hidrogênio (CHAMPE *et al*, 1997; TORRES, 2001).

A estrutura quaternária, por sua vez, é formada a partir da organização presente nas proteínas compostas por mais de uma cadeia polipeptídica, descrevendo quantos e quais monômeros compõem a molécula e como eles estão associados. As interações que podem

ocorrer entre as cadeias polipeptídicas para formação da estrutura quaternária são, em geral, atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CAMPBELL; FARRELL, 2007; TORRES, 2001).

As enzimas são classificadas de acordo as reações que catalisam como: (1) hidrolases, quando realizam reações de hidrólise, rompendo ligações pela adição de moléculas de água; (2) isomerases, quando atuam transferindo grupos dentro da mesma molécula, formando isômeros; (3) liases, quando atuam adicionando ou removendo grupos para romper ou formar ligações duplas, respectivamente; (4) ligases, quando promovem a formação de ligações entre grupos químicos pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação; (5) oxidorreduções, que atuam transferindo elétrons entre moléculas; e (6) transferases, que atuam transferindo grupos funcionais entre moléculas (LEHNINGER *et al*, 2002).

As enzimas possuem uma região denominada sítio ativo, onde ocorre a catálise enzimática. A superfície do sítio ativo é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato por ligações não covalentes (interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas) e catalisam a sua transformação. Somente uma pequena porção do substrato onde ocorre transformação está ligada à enzima e a especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo de átomos no sítio ativo (SANTOS, 2010).

A ligação da enzima ao substrato pode ser explicada com base em dois modelos: (1) o modelo chave-fechadura e (2) o modelo do ajuste induzido. O primeiro descreve que a formação do complexo enzima-substrato ocorre devido à semelhança entre o formato do substrato e do sítio ativo, sugerindo que o substrato liga-se na enzima em um ponto da molécula cujo formato complementa o seu. No entanto, o modelo chave-fechadura não considera a flexibilidade conformacional que a molécula enzimática possui, sendo considerado obsoleto. O segundo modelo descrito para justificar a ligação da enzima ao substrato é o modelo do ajuste induzido. Esse modelo descreve que ocorre uma mudança conformacional na enzima devido à ligação do substrato a mesma (CAMPBELL; FARRELL, 2007; CHAMPE *et al*, 1997).

A ligação da enzima ao substrato promove um aumento na velocidade da reação catalisada por essa enzima devido à diminuição da energia livre de ativação (ΔG^{o+}), definida como a energia necessária para que a reação se inicie ou a energia necessária para levar os reagentes ao estado de transição, no qual os átomos encontram-se com energia e conformação adequadas para que ocorra a formação dos produtos. Ou seja, a presença do catalisador diminui a quantidade de energia necessária para que a reação ocorra e haja formação dos

produtos. No estado de transição, o substrato interage com os átomos com os quais deve reagir dando origem aos produtos devido ao rompimento e formação de ligações na molécula. À medida que o produto é formado, o mesmo desprende-se da enzima, que permanece com concentração inalterada durante todo o processo (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

A dosagem da atividade enzimática é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substrato. A velocidade da reação é, então, medida e expressa em Unidade Internacional de Atividade (UA), que é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de pH e temperatura (TORRES, 2001).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações em processos industriais, devido à sua alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e o fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves, além de não constituírem risco de contaminação ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004).

3.2 INULINASES

Quando se fala do semiárido baiano, geralmente, é feita a associação da região à fome, pobreza e seca. Entretanto, essa região do nordeste brasileiro possui características naturais altamente heterogêneas, o que propicia a apresentação de expressiva biodiversidade, incluindo micro-organismos que são fonte potencial de enzimas de interesse industrial. Dentre as enzimas que podem ser obtidas a partir de micro-organismos da região semiárida baiana, destacam-se as inulinases.

As enzimas inulinases (Figura 4) são 2,1- β -D frutano frutanolidase (EC 3.2.1.7.) que podem ser aplicadas na produção de xaropes com alta concentração de frutose, os quais têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia. As inulinases podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que contém inulina. Entretanto, as quantidades de inulinase obtidas não são suficientes para serem exploradas comercialmente, sendo, por isso, preferencial a obtenção dessa enzima a partir de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras, sendo este último o de maior aplicabilidade industrial (ASTOLFI, 2010; PESSONI *et al*, 2004; TREICHEL, 2004).

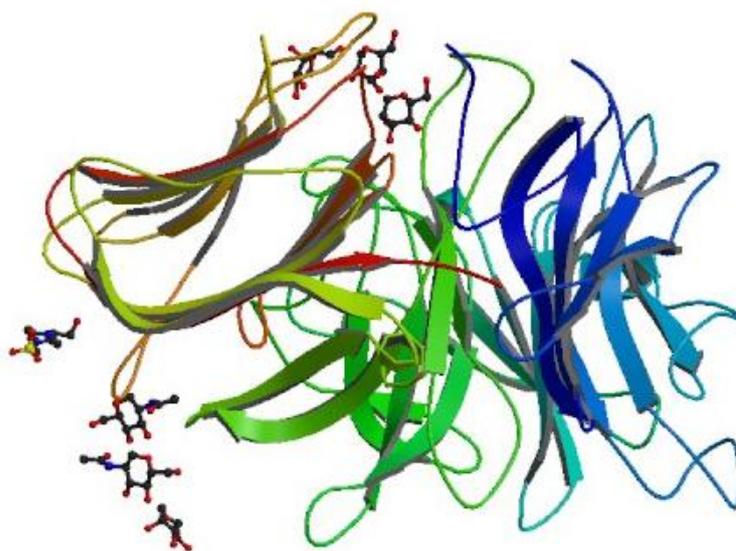


Figura 4: Estrutura cristalina de endoinulinase de *Aspergillus ficuum*.
Fonte: POUYEZ *et al*, 2012.

As inulinases obtidas a partir de micro-organismos são classificadas de acordo com seu modo de ação em exoinulinases (2,1- β -D-frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.80) ou endoinulinases (β -D-frutano-frutanohidrolase; EC 3.2.1.7). As exoinulinases são específicas para a hidrólise de inulina e atuam rompendo as ligações entre as unidades de frutose para a produção de oligossacarídeos. As exoinulinases podem hidrolisar completamente a inulina, produzindo concentrado de frutose com cerca de 95% de pureza, em uma única etapa enzimática (ASTOLFI, 2010; PESSONI *et al*, 2004).

As endoinulinases atuam de forma randômica sobre o acoplamento interno na molécula de inulina, quebrando a molécula em diferentes pontos da cadeia, em uma única etapa enzimática, produzindo inulo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização, tendo inulotriose, inulo-tetraose e inulo-pentaose como produtos principais (ASTOLFI, 2010; GERN *et al*, 2000).

O uso de inulinases obtidas a partir de micro-organismos tem sido proposto como a abordagem mais promissora para a obtenção de frutose e fruto-oligossacarídeos a partir de inulina por apresentar vantagens quando comparada a hidrólise ácida da inulina, na qual ocorre a formação de anidridos difrutose, que, apesar de não terem capacidade edulcorante, causam cores indesejáveis ao produto final, tornando-se um método inadequado para a produção de frutose. Além disso, acredita-se que ocorra um sinergismo entre a ação das endo e exoinulinases, sendo a frutose obtida mais facilmente do que quando empregados outros métodos. No entanto, não é possível determinar se as enzimas coexistem, assim como não é

possível separar as duas enzimas completamente por métodos convencionais, uma vez que as mesmas possuem propriedades similares (ASTOLFI, 2010; TREICHEL, 2004).

A enzima inulinase também possui condições físico-químicas que a torna atrativa para a indústria, como, por exemplo, sua estabilidade em valores de pH baixo e altas temperaturas, características essas que proporcionam menor risco de contaminação microbiana (MAKINO, 2004).

A atividade da inulinase pode ser influenciada pelo valor de temperatura e pH do meio de reação. Um aumento na temperatura de reação pode resultar no aumento da velocidade da mesma, até um pico de velocidade ser atingido. Esse aumento na velocidade de reação ocorre devido o aumento no número de moléculas com energia suficiente para promover a reação (TORRES, 2001).

Aumentos adicionais de temperatura resultam na diminuição da velocidade de reação. Isso ocorre porque, sendo a enzima uma proteína, ela tende a perder atividade quanto maior for a temperatura devido à sua desnaturação, o que implica em diminuição da atividade. Dessa forma, torna-se necessário a determinação da temperatura máxima na qual ocorre a velocidade máxima da reação, denominada temperatura ótima (TORRES, 2001; TREICHEL, 2004).

Em relação ao pH, observa-se que a maioria das enzimas apresenta um valor para o qual sua atividade é máxima, ou seja, a velocidade de reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor. A influência do pH sobre a atividade enzimática ocorre devido a presença de grupos ionizáveis de aminoácidos presentes na molécula da enzima, podendo esses grupos apresentarem-se protonados ou não, dependendo do pH do meio. Os grupos ionizáveis presentes no sítio ativo devem possuir uma carga particular para que a enzima possa ligar-se adequadamente ao substrato. Ou seja, a enzima cataliticamente ativa só existe em um estado particular de ionização, podendo ser uma fração maior ou menor da concentração total da enzima em um determinado pH (TREICHEL, 2004).

Valores extremos de pH podem causar desnaturação irreversível da enzima, devido a perda da estrutura pela ruptura, além de favorecer a ocorrência de ionização do substrato ou estado de ionização da enzima, afetando a conformação das moléculas e impedindo a ligação ao substrato. Pode-se observar ainda que, em alguns casos, o pH no qual a enzima atinge a sua máxima atividade pode não coincidir com o pH no qual se observa a sua máxima estabilidade. Em geral, as enzimas são ativas numa faixa limitada de pH e para cada enzima existe um pH ótimo ou uma faixa ótima de atividade (TORRES, 2001; TREICHEL, 2004).

As inulinasas podem ser produzidas em escala industrial a partir de diversos micro-organismos, no entanto, o uso de leveduras apresenta grande vantagem sobre fungos filamentosos e bactérias em relação ao potencial de controle do processo.

3.3 LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares não filamentosos, caracteristicamente esféricas, ovais ou elípticas, podendo ainda apresentar-se alongadas. Sobre meio ágar formam colônias lisas e brilhantes, semelhantes às colônias bacterianas. No entanto, as leveduras podem ser facilmente diferenciadas das bactérias por suas propriedades morfológicas e maiores dimensões, que variam consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade, entre outros fatores (GUIMARÃES, 2005; PEIXOTO, 2006; PELCZAR JR *et al*, 1997).

Não possuem flagelo nem outros meios de locomoção. Cada espécie de levedura possui forma característica, no entanto, a forma da levedura não é indício para identificação de espécies e nem a variedade de formas em um mesmo cultivo pode ser considerado contaminação do mesmo (GUIMARÃES, 2005; PELCZAR JR *et al*, 1997).

As leveduras reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou fissão binária. Algumas podem produzir brotos que não se separam, formando pseudomicélio. São anaeróbios facultativos, podendo utilizar oxigênio ou outro componente orgânico como aceptor final de elétrons. Na presença de oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente, metabolizando carboidratos a dióxido de carbono e água. Quando em ambiente anaeróbico, as leveduras, por sua vez, fermentam os carboidratos, produzindo etanol e dióxido de carbono. Essa versatilidade permite a esses micro-organismos sobreviver em diversas condições ambientais (OLIVEIRA *et al*, 2009; PELCZAR JR *et al*, 1997; TORTORA *et al*, 2000).

Quanto à composição química, as leveduras apresentam 68-83% de água, além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, entre outros. Assim como as bactérias, em um meio de cultivo as leveduras absorvem nutrientes, sendo essa absorção auxiliada por enzimas secretadas no meio que quebram as moléculas orgânicas em porções menores que podem ser transportadas com maior facilidade para o interior da célula. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (GUIMARÃES, 2005; PELCZAR JR *et al*, 1997).

As leveduras podem crescer em meio de cultivo simples contendo carboidrato, fonte de nitrogênio, orgânico ou inorgânico, e alguns minerais, em temperatura ótima entre 25 a 30°C e pH de 4 a 7. No entanto, algumas espécies necessitam de meios mais complexos

contendo vitaminas e grande variedade de compostos orgânicos providos por peptona e extrato de carne. As leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol (GUIMARÃES, 2005; PELCZAR JR *et al*, 1997).

As leveduras têm sido amplamente utilizadas na produção de enzimas como as inulinases, sendo as inulinases de leveduras mais estudadas aquelas produzidas pelo gênero *Kluyveromyces*, descrito como o micro-organismo mais promissor na produção desta enzima. No entanto, a inulinase pode ser produzida por uma ampla gama de espécie de leveduras (ASTOLFI, 2010). Em estudo realizado por Lima *et al* (2009), foram analisadas 33 espécies de leveduras e cepas de leveduras, observando-se atividade de inulinase em 27 destas. Dentre as espécies estudadas, a que obteve maior atividade específica com menor quantidade de biomassa foi a *Pseudozyma sp.* (CCMB 300), obtendo-se 73,79 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/min.

A produção de inulinases a partir de leveduras tem sido amplamente estudada, estando entre os principais parâmetros discutidos sobre este processo a composição do meio de cultura para a produção da enzima, principalmente no que se refere à fonte de carbono e nitrogênio. As fontes de carbono mais utilizadas para a produção de inulinase são a inulina e a sacarose, e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, vitaminas e nutrientes inorgânicos (ASTOLFI, 2010; MAKINO, 2004; SILVA-SANTISTEBAN, 2006).

3.4 INULINA E FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

A inulina é um carboidrato do grupo de polissacarídeos chamado frutanos, constituída por uma cadeia principal de unidades de frutose com uma unidade de glicose, conforme demonstrado na Figura 5. A fórmula geral da estrutura química da inulina pode ser descrita como GF_n , onde G representa a molécula de glicose, F as moléculas de frutose e n o número de unidades de frutose presente na molécula (HAULY; MOSCATTO, 2002; NOGUEIRA, 2002).

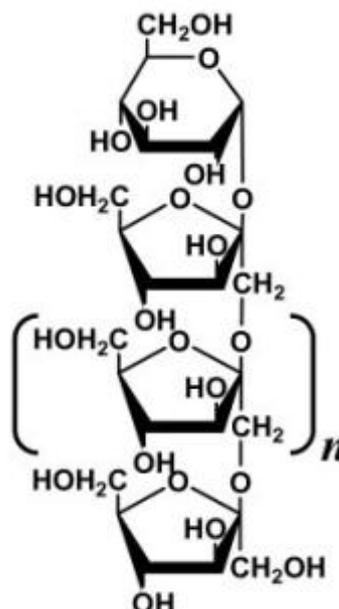


Figura 5: Estrutura química da inulina.
Fonte: UENO, 2011.

As unidades de frutose na molécula da inulina são mantidas entre si por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1). A molécula de glicose está presente na porção inicial de cada cadeia linear de frutose, a qual é unida por uma ligação tipo (α 1 – β 2), semelhante a molécula de sacarose (ASTOLFI, 2010).

A inulina é um carboidrato de reserva presente em mais de 30.000 produtos vegetais, sendo amplamente encontrada na natureza. A concentração de inulina em cada espécie vegetal depende da variedade, do tempo decorrido desde a colheita até a utilização desta e das condições de estocagem. Dentre os vegetais que produzem a inulina, destacam-se as raízes de chicória (*Cichorium intybus* L.) e de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.), sendo encontrada inulina também em alho, aspargo, cebola, dália e yacon (APOLINÁRIO *et al*, 2014; HAULY; MOSCATTO, 2002; OLIVEIRA *et al*, 2004).

No alho, a concentração de inulina encontrada é entre 22-40%, da matéria seca, enquanto que o aspargo contém cerca de 30% de inulina nas raízes. Na cebola, a concentração de inulina pode chegar a até 50% da matéria seca. Em alcachofra de Jerusalém, chicória, dália e yacon as concentrações de inulina podem chegar até 20% do peso fresco. Além dos vegetais, alguns cereais podem conter inulina, como o trigo, a cevada e o centeio, com concentrações variando entre 1-4% (HAULY; MOSCATTO, 2002).

A biossíntese de frutanos ocorre quando a fotossíntese excede a demanda e a sacarose atinge um nível crítico na planta. A biossíntese é catalisada por três diferentes classes de enzimas: sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (EC 2.4.1.99) (1-SST), frutano:frutano 1–

frutossiltransferase (EC2.4.1.100) (1-FFT) e frutano exohidrolase (EC 3.2.1.153) (FEH). A inulina é sintetizada a partir de uma molécula inicial de sacarose, o que explica a presença de apenas uma unidade de glicose na sua cadeia. As enzimas transferases, então, transferem frutose de outras moléculas de sacarose para realizar a polimerização. Assim como a concentração de frutano na planta, o grau de polimerização da inulina depende de fatores tais como a espécie vegetal, o clima e condições de cultivo e o tempo de armazenamento após a colheita (APOLINÁRIO *et al*, 2014; CHI *et al*, 2011).

Ao sofrer hidrólise, ácida ou enzimática, a inulina produz fruto-oligossacarídeos e xarope de frutose, possuindo uma grande variedade de aplicações alimentares e farmacêuticas, além de poder ser aplicada em processos industriais como matéria-prima renovável para a produção de bioetanol (APOLINÁRIO *et al*, 2014; CHI *et al*, 2011).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são definidos como polímeros de D-frutose ligados a uma molécula de glicose. São também denominados oligofrutoses ou frutanos, sendo a inulina integrante desse grupo. No entanto, a inulina pode ser diferenciada dos demais FOS pelo número de unidades de frutose presentes na sua molécula. A inulina possui, em média, 30 unidades de frutose ligadas à molécula de glicose (podendo chegar a 60 unidades de frutose), enquanto os demais frutanos possuem 2 a 9 unidades de frutose (MAKINO, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2004).

A hidrólise ácida ou enzimática da inulina produz oligômeros lineares estruturalmente designados GF_n , constituídos por glicose e frutose, e F_m , constituída apenas por frutose, onde m e n representam o número de unidades frutofuranosil obtidas. GF_n e F_m têm propriedades físico-químicas semelhantes, no entanto, os produtos tipo F_m são redutores, enquanto os GF_n são não-redutores. Convencionou-se denominar FOS os oligômeros de frutose compostos por unidades GF_2 , GF_3 e GF_4 (Figura 6), respectivamente nomeados como 1-questose, nistose e 1-frutofuranosil nistose (HAULY; MOSCATTO, 2002; YUN, 1996).

Os FOS possuem propriedades funcionais e físico-químicas que aumentam a vida útil e perfil de sabor de vários produtos alimentares, como barras de cereais, sorvetes, geleias *light*, balas e chocolates, sendo produtos de interesse de indústrias alimentícias e de bebidas.

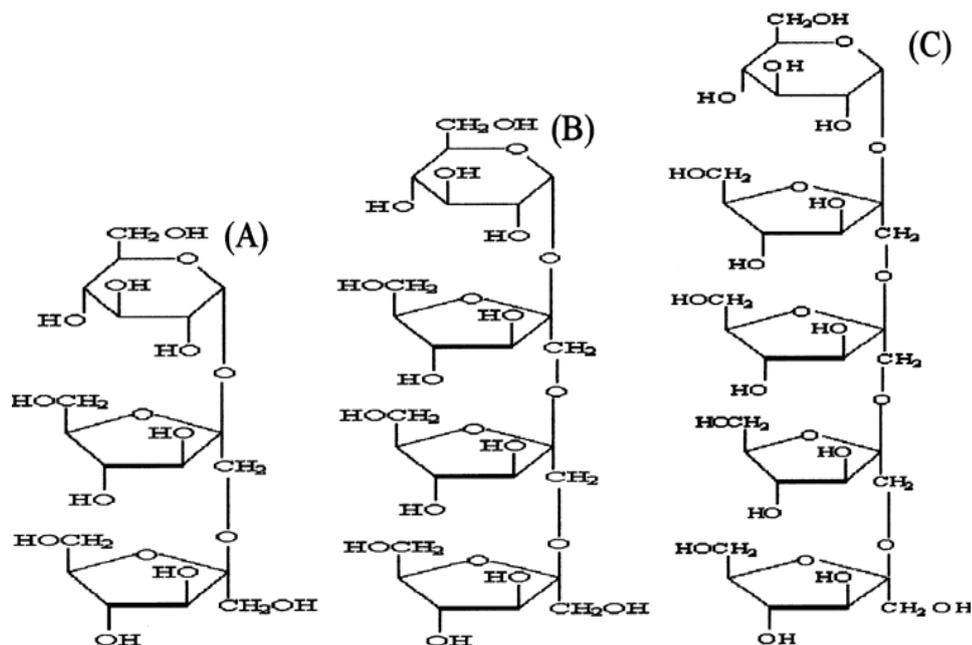


Figura 6: Estrutura química dos FOS (A) 1-questose, (B) nistose e (C) 1-frutofuranosil nistose.
Fonte: PASSOS; PARK, 2003.

As propriedades funcionais e físico-químicas dos FOS estão relacionadas ao grau de polimerização de frutose na molécula, bem como a presença de ramificações na mesma. Por exemplo, um FOS de cadeia curta é muito mais solúvel e mais doce quando comparado a inulina nativa e de cadeia longa, devido suas propriedades estarem relacionadas às de outros açúcares, como a sacarose. No entanto, os FOS possuem menor teor calórico que a sacarose, podendo ser utilizados em produtos dietéticos, substituindo parcial ou totalmente a sacarose na composição dos mesmos (APOLINÁRIO *et al*, 2014).

A inulina, por sua vez, é um frutano de cadeia longa que possui menor poder adoçante, menor solubilidade e maior viscosidade quando em solução. A solubilidade da inulina varia em função da temperatura da água, sendo de aproximadamente 6% a 10 °C e de 35% a 90°C, tendo capacidade de ligação de água de 2:1, ou seja, duas moléculas de água para cada molécula de inulina. Em solução, esse frutano reduz o ponto de congelamento da água e aumenta o ponto de fusão, tendo sua funcionalidade baseada em seu efeito sobre soluções aquosas a vários níveis de sólidos (APOLINÁRIO *et al*, 2014; HAULY; MOSCATTO, 2002).

À medida que a concentração de inulina aumenta, a viscosidade aumenta gradativamente. Quando o nível de inulina alcança 30% de sólidos em solução aquosa, a combinação inulina-água inicia a gelificação. Neste nível, o gel é formado sob resfriamento por 30 a 60 minutos e assemelha-se a textura de gorduras. Quando o nível de inulina aumenta,

o gel precisa de menos tempo para ser formado, sendo praticamente instantâneo quando o nível de sólidos em solução está entre 40 – 45% (APOLINÁRIO *et al*, 2014; HAULY; MOSCATTO, 2002).

Devido essa característica menos solúvel e mais viscosa, a inulina forma microcristais quando dissolvida em água ou leite, que podem interagir para formar uma textura suave e cremosa no produto, proporcionando ao paladar sensação semelhante à gordura, sendo adequada para emprego em produtos com teor de gordura reduzido (APOLINÁRIO *et al*, 2014).

Além de suas propriedades físico-químicas, os FOS apresentam propriedades fisiológicas que os tornam compostos de grande interesse para aplicação na indústria alimentícia. Como não são degradados pelo organismo humano, atravessam o intestino delgado sem serem absorvidos. No intestino grosso, são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microflora intestinal, sendo empregados para enriquecer com fibras produtos alimentares (ASTOLFI, 2010; MAKINO, 2004).

Dessa forma, os FOS podem ser empregados para encorpar produtos lácteos e melhorar a umectância de produtos de panificação, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, fornecer crocância a biscoitos de baixo teor de gordura, agir como um aglutinante em barras nutricionais de granola, enriquecer o teor de fibras em alimentos, e em substituição a sacarose, combinando-se a adoçantes de alta intensidade e mascarando o sabor residual de aspartame (HAULY; MOSCATTO, 2002).

3.5 FRUTOSE

A frutose, também denominada D-frutose ou levulose, é um monossacarídeo com ampla distribuição na natureza, tendo sido isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar. É encontrada na natureza na sua forma livre, principalmente em frutas e mel, sendo considerado o mais doce dos açúcares simples (LEHNINGER *et al*, 2002).

Sua utilização na indústria de alimentos e bebidas vem crescendo de forma acentuada devido ao seu poder adoçante, cerca de 70% superior ao da sacarose. Além disso, a frutose não apresenta problemas de cristalização como a sacarose, possui maior solubilidade em água, quando comparada a outros açúcares, e é tolerada por pacientes portadores de diabetes (PESSONI *et al*, 2004).

Apesar de ser metabolizada sem a necessidade de ação da insulina e de promover redução dos níveis de glicemia no sangue, alguns autores são contrários ao uso de frutose por

portadores de diabetes. Os mesmos consideram que o emprego descontrolado da frutose resultaria em glicose e seu polímero, o glicogênio, ocasionando aumento na glicemia. No entanto, quando utilizada de maneira adequada, esse fator causa pouca interferência nos níveis de glicose sanguínea, tornando a frutose uma alternativa como adoçante para portadores de diabetes (BARREIROS *et al*, 2005).

Devido a essas propriedades, a frutose foi rapidamente integrada ao mercado de bebidas, panificação, conservas, geleias e laticínios. É ainda empregada em sua forma cristalina na indústria farmacêutica, pré-misturas de bolos e produtos especiais (ESTELLER *et al*, 2004). Além de ser encontrada livre na natureza, a frutose pode ser obtida a partir da hidrólise da sacarose e de polímeros como os fruto-oligossacarídeos e a inulina.

De acordo Pessoa-Jr e Vitolo (1999), o processo utilizado para produção industrial de frutose é realizado mediante uma transformação enzimática que resulta na isomerização da glicose, a partir do amido, utilizando uma sequência de três enzimas. Nesse processo, são obtidos xaropes de frutose a partir da hidrólise ácida do amido de milho, incluindo a ação de enzimas como α -amilases e amiloglicosidases, utilizadas para melhorar o rendimento da reação.

A isomerização da glicose ocorre através da ação de glicose-isomerases, obtendo-se uma mistura equimolar de frutose e glicose. Após a obtenção do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido), a separação da frutose é realizada em colunas cromatográficas, produzindo-se xaropes com 42-90% de frutose, denominados como “*high fructose corn syrup*” (HFCS). Esse processo é considerado longo, tornando necessária a obtenção de uma via alternativa para produção de xaropes de frutose (ASTOLFI, 2010; PESSOA-JR; VITOLO, 1999).

A frutose também pode ser obtida pela reação de hidrólise da sacarose utilizando a enzima invertase, na qual também se obtém um açúcar invertido. A hidrólise da sacarose utilizando-se a invertase produz além de glicose e frutose outros cinco produtos intermediários, que são separados por cromatografia de troca iônica. Essa reação deve ser realizada a temperatura em torno de 30 a 35°C, para evitar a formação de intermediários ou derivados, como o hidroximetilfurfural (HMF), polímeros, ácido fórmico, entre outros (LOURENÇO, 2004). Assim, pode-se expressar a importância da aplicação da inulina e das enzimas inulinases no processo de produção de xaropes de frutose.

A frutose é obtida a partir da inulina mediante a despolimerização pela atividade de exoinulinases ou por endoinulinases. A hidrólise realizada pela inulinase apresenta vantagens em relação a outros métodos de obtenção da frutose por produzir um concentrado de frutose

com cerca de 95% de pureza. Além disso, não apresenta inconvenientes como no processo de hidrólise ácida, que provoca propriedades indesejáveis no xarope obtido, como sabores ou odores residuais e coloração escura, devido à caramelização de açúcares (ASTOLFI, 2010; PESSONI *et al*, 2004).

3.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais de grande escala é limitada pelo seu alto custo de produção e baixa estabilidade no armazenamento. Durante as reações catalisadas pelas enzimas, a estabilidade da mesma pode diminuir devido mudanças no pH e na temperatura, causando alterações conformacionais que provocam redução da sua atividade catalítica. Uma vez que as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, para que a atividade da enzima frente ao substrato seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004). Uma forma eficaz de evitar que a enzima seja afetada durante o processo e perca sua atividade e/ou estabilidade é a imobilização.

A imobilização consiste no confinamento da enzima a uma fase (matriz ou suporte) constituída por polímeros inertes ou materiais inorgânicos insolúveis. Essa técnica tem sido amplamente empregada, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras, tendo como principal objetivo obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, promovendo um aumento na atividade catalítica da enzima em comparação à sua forma livre. No entanto, as interações entre enzima e suporte podem causar alterações conformacionais na molécula da enzima que podem inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da mesma (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; PRADELLA, 2001; SANTOS, 2010; VIEIRA, 2009).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em relação às enzimas na sua forma livre, conforme Carvalho *et al* (2006), Pradella (2001) e Santos (2010) são:

(1) possibilidade de aproveitar a atividade catalítica por um maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo, podendo o catalisador ser aplicado em processos contínuos;

(2) facilidade em separar o catalisador do produto da reação, já que a enzima imobilizada não é solúvel no meio da reação, e está retida no interior do biorreator, sendo o

substrato não convertido e o produto retirado sem contaminação do biocatalisador, o que propicia a reutilização da enzima;

(3) redução do volume de reação, uma vez que a enzima imobilizada e retida no biorreator permite alta concentração enzimática em menor volume de reator;

(4) alteração, em alguns casos, das propriedades catalíticas da enzima em relação a sua forma solúvel, como, por exemplo, aumento da estabilidade ao pH e à temperatura, e redução dos efeitos de inibição pelo substrato e produto que são removidos continuamente do biorreator.

Dentre as desvantagens que a imobilização pode apresentar, destacam-se a possibilidade de diminuição da atividade da enzima, devido à dificuldade de acessibilidade do substrato a mesma, uma vez que a enzima tem sua mobilidade restringida pela ligação ao suporte, a limitação do acesso do substrato ao sítio ativo, causada pela presença do suporte sólido, acúmulo de produto próximo ao sítio ativo, fator que pode alterar a cinética da reação devido redução da velocidade de reação ou alteração do pH no microambiente da enzima (VIEIRA, 2009).

3.6.1 Suportes para imobilização

Em um processo de imobilização de enzimas, um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para fixação da mesma, devendo ser analisadas na seleção do suporte para uma determinada aplicação as suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração. A escolha do suporte dependerá, basicamente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada, fatores esses que só podem ser determinados empiricamente (SANTOS, 2010; VITOLLO, 2001).

Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema suporte-enzima seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática. Além disso, um suporte ideal deve abranger características como inércia, força física, estabilidade, regenerabilidade, capacidade de aumentar a especificidade e/ou atividade da enzima e reduzir a inibição pelo produto, a adsorção não específica e a contaminação microbiana. O suporte sólido deve possuir grupos funcionais específicos na sua superfície que possam interagir com os grupamentos residuais da enzima para que ocorra a formação do complexo enzima-suporte (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; DATTA *et al.*, 2013).

Segundo Vieira (2009), o suporte para imobilização deve apresentar propriedades tais como resistência mecânica, uma vez que o uso contínuo do sistema imobilizado, algumas vezes, requer filtração, centrifugação e agitação; estabilidade térmica, pois dependendo do seu coeficiente de expansão, podem sofrer distorção e modificar a conformação da enzima, seja pela expansão ou contração quando submetido a variações de temperatura; e insolubilidade, para evitar a liberação da enzima do suporte e a contaminação do produto provocada pelo suporte dissolvido e pela enzima.

Quanto a composição química, os suportes são classificados em inorgânicos (minerais e fabricados) e orgânicos (naturais e sintéticos). São suportes utilizados em imobilização de enzimas celite, sílica, celulose, ágar, quitina, quitosana, albumina, colágeno, vidro, cerâmica, alginato de sódio, entre outros (VIEIRA, 2009; VITOLLO, 2001).

A sílica é um dos suportes mais comumente utilizado em estudos de imobilização de enzimas, devido suas características vantajosas, como aplicação de área de superfície bem desenvolvido, alta estabilidade térmica e resistência química, alta disponibilidade e baixo custo, quando comparado a outros polímeros (JESIONOWSKI *et al*, 2014).

O suporte utilizado na imobilização pode afetar a partição de substratos, produtos e água na mistura reacional, influenciando indiretamente na propriedade catalítica da enzima. Os efeitos do suporte sobre a partição de água no sistema podem ser interpretados por meio de medições de adesão dos suportes a água. Sendo a celite um composto de baixa polaridade, o mesmo possui uma baixa adesão a água, tornando-se viável o seu emprego na imobilização de enzimas (CASTRO *et al*, 1999).

A celite, também denominada diatomita ou terra de diatomáceas, é um suporte composto principalmente de SiO_2 , cuja estrutura consiste de um vacúolo interno com uma rede de poros interligados através de sua parede de SiO_2 , além de alguns outros óxidos inorgânicos. Altamente porosa, tem sido utilizada para a imobilização de enzimas, uma vez que possui baixo custo, baixa polaridade e grande área de adesão, e fornece resistência contra alta temperatura ou pH, uréia, detergentes e solventes orgânicos (PACE *et al*, 2010; DATTA *et al*, 2013).

Dentre os suportes encontrados no mercado, pode-se destacar os polímeros macroporosos de acrílico, como Immobeads® e Sepabeads®, constituídos por macroporos de matriz polimérica esféricas de acrílico contendo grupos funcionais em sua superfície, podendo esses grupos funcionais ser grupos epóxido, grupos amino, entre outros (PERALTA, 2010).

O Immobeads® 150 é um polímero constituído por macroporos de matriz polimérica esféricas de acrílico, cuja superfície possui uma densa monocamada de grupos epóxido

reativos e estáveis, os quais se ligam a diferentes resíduos de aminoácidos na enzima de forma estável sob brandas condições experimentais. Este tipo de suportes é especialmente concebido para ter uma baixa limitação de difusão, permitindo a imobilização de enzimas com elevadas atividades específicas. Suportes com grupos epóxido ativados são capazes de formar ligações covalentes muito estáveis com diferentes resíduos de aminoácidos da enzima, sendo a imobilização geralmente realizada em duas etapas: (1) adsorção física entre as moléculas de enzima e o suporte e (2) reação covalente entre a proteína e os grupos epoxi adsorvidos. O Sepabeads® EC-OD consiste em uma matriz polimérica de esferas de acrílico cujo grupo funcional é octadecílico, sendo um suporte altamente ativo e de matriz rígida (PERALTA, 2010).

Suportes alternativos obtidos de resíduos industriais também são utilizados na imobilização de enzimas, como, por exemplo, casca de ovo de galinha na imobilização de catalase (CHATTERJEE *et al*, 1990) e de pectinesterase (NIGHOJKAR *et al*, 1995), que podem ser obtidos de indústrias alimentícias.

A casca de ovo é uma fonte rica de minerais, constituída por uma rede de fibras de proteína associadas com cristais de carbonato de cálcio (96% do peso da casca), carbonato de magnésio (1%) e fosfato de cálcio (1%), além de substâncias orgânicas e água. O carbonato de cálcio é o principal constituinte do invólucro, consistindo em um cristal amorfo que ocorre naturalmente na forma de calcite (cristal hexagonal), com baixa solubilidade em água (13 mg/L, a 18 °C). A casca do ovo tem duas membranas internas, que consiste de uma mistura de proteínas e glicoproteínas (OLIVEIRA *et al*, 2013).

3.6.2 Métodos de imobilização

A escolha de um método de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais relacionados às necessidades da reação. Conforme descrito no esquema da Figura 7, a imobilização pode ser realizada através da ligação da enzima a suportes sólidos insolúveis, seja por adsorção ou ligação covalente da enzima ao suporte sólido insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, por confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; SANTOS, 2010; VIEIRA, 2009).

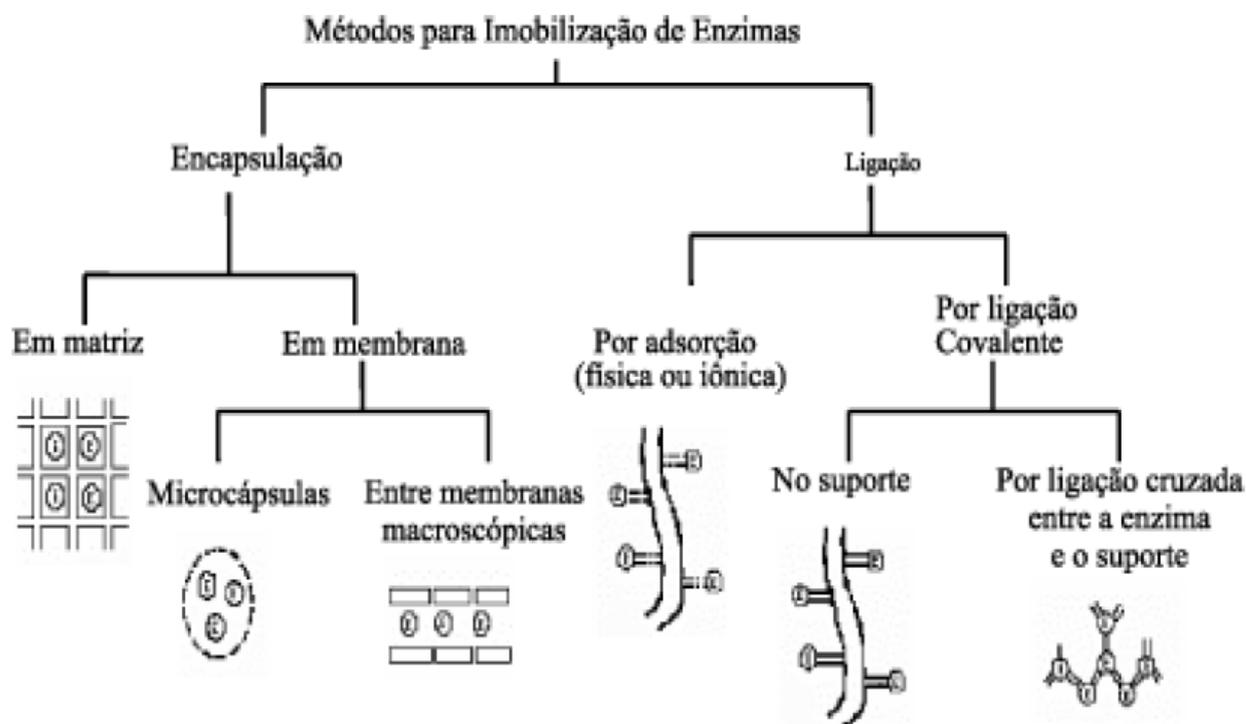


Figura 7: Métodos para imobilização de enzimas.

Fonte: DALLA-VECCHIA *et al*, 2004.

O método de imobilização por meio de adsorção ocorre através de ligações eletrostáticas, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras, que são estabelecidas entre grupamentos de cargas opostas presentes nas moléculas da enzima e do suporte. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (CARVALHO *et al*, 2006; DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; VITOLO, 2001).

A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas é um método simples e barato, sendo a principal desvantagem a vulnerabilidade de perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte dependem de vários parâmetros, como, por exemplo, tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do suporte e, principalmente, a porosidade e tamanho dos poros, uma vez que a enzima é adsorvida no interior dos mesmos (CARVALHO *et al*, 2006; VIEIRA, 2009).

A eficiência do método de imobilização por adsorção depende também da concentração da enzima, pois a quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (DALLA-

VECCHIA *et al*, 2004). A principal desvantagem deste método é o fato da adsorção na superfície não ser específica, podendo incluir outras proteínas e substâncias presentes na solução que irão competir com a enzima, podendo diminuir a taxa de ligação da mesma ao suporte, reduzindo o rendimento da imobilização (VIEIRA, 2009).

No entanto, a imobilização por adsorção apresenta a grande vantagem de ser um método simples e de baixo custo que possibilita a manutenção da conformação da enzima e do seu sítio ativo, uma vez que não ocorrem ligações entre enzima e suporte que provoquem mudanças conformacionais do sítio ativo, obtendo-se um sistema imobilizado com atividade semelhante a da enzima livre (VIEIRA, 2009).

A estabilidade da imobilização por adsorção pode ser melhorada através da formação de ligações covalentes cruzadas, usando-se um reagente reticulante, como o glutaraldeído. Esse método envolve a modificação química de um grupamento da enzima ou do suporte, devido a ligação do agente reticulante ao mesmo através de ligação covalente (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004).

Nesse método, o glutaraldeído é empregado como reagente reticulante, a fim de facilitar a ligação da enzima ao suporte, uma vez que promove a formação de ligações covalentes cruzadas em grupos reativos na superfície da enzima com grupos da molécula de glutaraldeído, resultando em estabilização do catalisador devido restrição da mobilidade de sua superfície e a criação de uma barreira resistente ao ataque de substâncias presentes no meio reacional, o que facilita a imobilização e evita a dessorção da enzima, melhorando a estabilidade do sistema enzima-suporte (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; VIEIRA, 2009).

Na imobilização por ligação covalente, a enzima é ligada ao suporte sólido inerte mediante ligações químicas covalentes entre aminogrupamentos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte, como grupos -CHO, -NCS, entre outros. A ligação entre enzima e suporte deve envolver grupamentos que não sejam essenciais para a atividade catalítica da enzima, devendo esse tipo de imobilização não afetar o sítio ativo (VIEIRA, 2009; VITOLO, 2001).

Neste método, utiliza-se um metal de transição como ativador da superfície do suporte, tornando possível o acoplamento direto da enzima. A imobilização por ligação covalente também é um método simples de preparação. No entanto, esse método resulta em uma interação enzima-suporte mais forte do que a que ocorre na imobilização por adsorção, mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica (CARVALHO *et al*, 2006; VIEIRA, 2009).

A ativação do grupo ligante é realizada no suporte com a finalidade de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima. Em alguns casos, os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos e para obter preparações mais ativas e estáveis, sendo normalmente utilizado para esse fim glutaraldeído (VIEIRA, 2009). As reações são realizadas em meio aquoso, à temperatura em torno de 0 a 25°C e pH próximo a neutralidade, sendo a escolha das condições dependente da estabilidade e características da enzima e do suporte (VITOLLO, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA SELECIONADAS

As linhagens de leveduras *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) e *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) foram obtidas da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As leveduras foram mantidas em meio ágar YM, contido em placas de cultura, sendo o meio composto por extrato de levedura 3% (p/v), extrato de malte 3% (p/v), peptona 5% (p/v), glicose 10% (p/v) e ágar 20% (p/v), pH 6,2. Os meios foram incubados em estufa a 28,0°C, por 48 h.

4.2 PREPARO DO INÓCULO E OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

As leveduras crescidas no meio ágar YM foram diluídas em solução salina estéril e 10% (v/v) do crescimento diluído foi inoculado em frascos contendo o meio mineral, composto por extrato de levedura, 0,1 g; glicose, 1,0 g; (NH₄)₂SO₄, 0,3 g; KH₂PO₄, 0,45g; MgSO₄, 0,025g; CaCl₂, 0,025 g; H₂O 100 mL, pH 5,0 (PATCHING; ROSE, 1969).

O inóculo foi levado a fermentação, realizada utilizando-se uma incubadora do tipo *shaker*, sob agitação de 150 rpm, 28°C, por 48 h. O fermentado foi centrifugado (10000 rpm, 10 min, a 4°C) e o extrato bruto enzimático sobrenadante armazenado em tampão acetato 0,05M, pH 5,5.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INULINASE EM DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS

O extrato enzimático de inulinase foi imobilizado utilizando-se como suportes casca de ovo, celite, Immobeads®, Sepabeads® e sílica, utilizando diferentes métodos de imobilização.

4.3.1 Imobilização da enzima inulinase em casca de ovo por adsorção

Para imobilização da inulinase em casca de ovo, inicialmente pedaços de casca de ovo branco de galinha foram cozidos em água durante 30 minutos, lavados 5 vezes com acetona e secos em estufa a 55,5°C, conforme metodologia descrita por Chatterjee *et al* (1990) e

Nighojkar *et al* (1995). Em seguida, o material seco foi triturado e peneirado em tamis de 100 mesh, para obtenção de partículas de pó fino.

A 0,4 g de casca de ovo triturada foi adicionado 2 mL de solução de inulinase (extrato bruto), agitando-se a 100 rpm por 12 h, a 12°C. Após esse período, o sobrenadante foi reservado para posterior análise de proteína total e a enzima imobilizada lavada com tampão acetato de sódio (pH 5,5) para retirada de resíduos e aplicada na hidrólise da inulina.

4.3.2 Imobilização da enzima inulinase em casca de ovo por ligação covalente cruzada

Nesse procedimento, a solução de enzima inulinase foi adsorvida em casca de ovo triturada, conforme descrito no procedimento anterior, deixando-se sob agitação por 2 h. Em seguida, foi adicionado glutaraldeído, lentamente, sob agitação, até uma concentração final de 1,2% (v/v), sendo incubadas as amostras sob agitação a 100 rpm, a 12°C, por 10 h, conforme Chatterjee *et al* (1990) e Nighojkar *et al* (1995). Em seguida, o sobrenadante foi reservado para posterior análise de proteína total e a enzima imobilizada lavada com tampão acetato de sódio (pH 5,5) para retirada de resíduos e aplicada na hidrólise da inulina.

4.3.3 Imobilização da enzima inulinase em celite por adsorção em meio aquoso

A inulinase foi imobilizada por adsorção em celite, conforme metodologia empregada por Castro *et al* (1999), utilizando tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,5) como um meio de imobilização. Para tal, 2,0 mL de solução de inulinase foram adicionados a 0,5 g de celite, deixando-se sob agitação a 100 rpm durante 2 h à temperatura ambiente (27-28°C).

Após este período, 2,0 mL de tampão acetato de sódio foram adicionados à mistura de enzima e suporte e deixada em repouso durante 30 min. Coletou-se, então, o sobrenadante e a inulinase imobilizada foi lavada três vezes com tampão acetato de sódio e aplicada na hidrólise da inulina.

4.3.4 Imobilização da enzima inulinase em celite por adsorção em meio orgânico

A inulinase foi imobilizada por adsorção em celite, conforme metodologia descrita por Castro *et al* (1999), utilizando-se como meio de imobilização acetona (meio orgânico). Dessa forma, 2,0 mL de solução de inulinase foram adicionados a 0,5 g de celite, deixando-se sob agitação a 100 rpm durante 2 h à temperatura ambiente (27-28°C).

Após este período, 2,0 mL de acetona foram adicionados à mistura de enzima e suporte e deixada em repouso durante 30 min. Coletou-se, então, o sobrenadante e a inulinase imobilizada foi lavada três vezes com acetona e aplicada na hidrólise da inulina.

4.3.5 Imobilização da enzima inulinase em Immobeads®

Na imobilização de inulinase em Immobeads®, o procedimento foi realizado conforme metodologia descrita por Peralta (2010), adicionando-se a 0,05 g de suporte a 2,5 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,5), agitando-se suavemente.

Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de solução de inulinase, levando-se a agitação, a 100 rpm, por 24 h a 28°C. Coletou-se o sobrenadante e a inulinase imobilizada foi lavada com água destilada para posterior aplicação na hidrólise da inulina.

4.3.6 Imobilização da enzima inulinase em Sepabeads® por ligação covalente

Para a imobilização covalente de inulinase a Sepabeads®, empregou-se metodologia descrita por Bayraktar *et al* (2011), condicionando-se 0,5 g de suporte com tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,5) durante 1 h à temperatura ambiente (27-28°C). O suporte foi separado do tampão por centrifugação a 4000 rpm, por 5 min. Em seguida, 5,0 ml de solução de glutaraldeído 0,25% (v/v) foi adicionada ao suporte e mantida sob agitação a 100 rpm durante 1 hora a 28°C. Após reação, a suspensão foi filtrada e lavada extensivamente com tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,5).

Foi, então, adicionado 0,650 ml de solução de inulinase e 0,650 ml de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,5) ao suporte, deixando-se sob agitação, a 100 rpm, a 28°C, por 20 h. Os conjugados de enzima imobilizada foram lavados com tampão acetato de sódio, a fim de remover os conjugados de proteínas não ligadas, reservando-se o sobrenadante para posterior análise de proteína total e a inulinase imobilizada para aplicação na hidrólise da inulina.

4.3.7 Imobilização da enzima inulinase em Sepabeads® por ligação covalente cruzada

Para a imobilização de inulinase por ligação cruzada, inicialmente, o suporte foi condicionado com tampão acetato de sódio, conforme descrito no procedimento anterior (item 3.3.6). Em seguida, foram adicionados 0,25 ml de solução de inulinase a 0,2 g de suporte,

sendo a suspensão mantida sob agitação a 100 rpm durante 3 h, a 28°C para adsorção de enzima ao suporte.

Concluído o tempo de reação, adicionou-se 2,0 ml de solução de glutaraldeído 0,25% (v/v) e incubado durante 1 h a 28°C. A suspensão foi, então, lavada com tampão acetato de sódio, reservando-se o sobrenadante para posterior análise de proteína total e a inulinase imobilizada para aplicação na hidrólise da inulina.

4.3.8 Imobilização da enzima inulinase em sílica por ligação covalente

Para imobilização da inulinase em sílica, 0,1 g do suporte foi inicialmente suspenso em tampão acetato (pH 5,5; 0,05 M), adicionando-se glutaraldeído 2%, conforme metodologia adaptada de Tavares *et al* (2013), deixando-se reagir por 2 h a temperatura ambiente (27-28°C). Em seguida, lavou-se o suporte com água destilada por três vezes, para retirada de resíduos, e secou-se o suporte ativado em estufa a 55,5°C por 24 h.

Adicionou-se, então, 1,0 mL de solução de inulinase, deixando-se sob agitação, a 100 rpm, por 24 h, a 12°C. O sobrenadante foi coletado e reservado para posterior análise de proteínas totais e a enzima imobilizada foi lavada com solução de tampão acetato de sódio e reservada para posterior aplicação na hidrólise da inulina.

4.4 PRODUÇÃO DE FRUTOSE

4.4.1 Produção de frutose por inulinase livre (extrato bruto)

A frutose foi obtida pela hidrólise enzimática da inulina, quantificando-se a produção pela dosagem de açúcares redutores formados, utilizando-se o método DNS descrito por Miller (1959). Para tal, adicionou-se 900 µL de 2% (0,02 g/mL) de inulina em tampão acetato (0,05 M; pH 5,5) a 100 µL de solução do extrato enzimático. As amostras foram incubadas a temperatura de 50°C durante 15 min.

Após a incubação, foi adicionado 1 mL de reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e incubou-se as amostras a temperatura de 100°C durante 10 min. Em seguida, foi adicionado ao meio reacional 10 mL de água destilada e procedidas as leituras de absorbância com auxílio de espectrofotômetro UV/VIS modelo *Varian*, com comprimento de onda a 540 nm, para posterior dosagem de açúcares redutores e determinação da atividade enzimática.

Os ensaios foram realizados em triplicata e o ensaio em branco foi realizado substituindo-se no meio reacional a solução enzimática por 100 µL de tampão acetato.

4.4.2 Produção de frutose por inulinase imobilizada e determinação da taxa de imobilização

A produção de frutose pelas enzimas imobilizadas em suportes sólidos foi realizada conforme Miller (1959), adicionando-se às inulinases imobilizadas solução de substrato inulina (2%) em tampão acetato 0,05 M e pH 5,5 e incubando-se as amostras a 50°C, por 15 min. Em seguida, coletou-se 1 mL do produto formado e adicionou-se a 1 mL de 3,5-DNS, incubando-se as amostras a temperatura de 100°C, durante 10 min. Decorrido o período para reação, foi adicionado 10 mL de água destilada e realizadas as leituras em espectrofotômetro UV/VIS modelo *Varian*, com comprimento de onda a 540 nm, para posterior dosagem de açúcares redutores e determinação da atividade enzimática.

A taxa de imobilização descreve a relação entre a atividade da enzima imobilizada e a quantidade de suporte utilizada para imobilização, sendo calculada através da Equação 1, onde a Atividade (UA) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de produto por minuto.

$$\text{Taxa de Imobilização} = \frac{\text{Atividade Enzimática (UA)}}{\text{Massa do suporte sólido (g)}} \quad (\text{Equação 1})$$

4.4.3 Dosagem de proteína total da enzima livre e imobilizada

A dosagem de proteína total conforme o método descrito por Bradford (1976), adicionando-se 100 µL de amostra enzimática (para enzima livre) ou de sobrenadante de imobilização (para enzima imobilizada) a 5,0 mL de reagente Bradford diluído a 15%, deixando-se a temperatura ambiente por 5 min. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro com absorvância a 595 nm e quantificou-se a proteína total presente no sobrenadante.

4.5 PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

4.5.1 Síntese de fruto-oligossacarídeos

A síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS) foi realizada em tubos de ensaio com volume total de 10 mL, utilizando-se as enzimas inulinases imobilizadas nos suportes sólidos casca de ovo, casca de ovo com glutaraldeído, celite em meio aquoso (tampão acetato) celite em meio orgânico (acetona) e Immobeads®, conforme metodologia descrita por Silva *et al* (2013), adicionando-se em tubos de ensaio 2,5 mL de solução de substrato inulina (20%, p/v) em tampão acetato 0,05 M (pH 5,5) e enzima inulinase (5%, p/v), incubando-se as amostras por 24 h, a 50°C. Após síntese, coletou-se o sobrenadante de reação, filtrou-se os mesmos em microfiltros de 0,22 µm e realizou-se as análises do produto obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.5.2 Identificação dos produtos obtidos

A identificação e quantificação dos FOS obtidos foram realizadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), adaptando-se metodologias descritas em Kuhn *et al* (2013), Nguyen *et al* (1999) e Silva *et al* (2013). Utilizou-se detector de índice de refração, coluna de fase reversa NH₂, volume de injeção de 20 µL com taxa de fluxo de 1,25 mL/min e fase móvel acetronitrila/hidróxido de amônia 0,04% (70:30), mantendo-se a temperatura do detector e da coluna a 35°C. A identificação de cada um dos FOS foi realizada construindo-se uma curva de calibração com padrões de frutose, 1-questose e nistose, obtidos da Sigma-Aldrich.

4.5.3 Análise quantitativa por otimização da produção de fruto-oligossacarídeos

A otimização da síntese de FOS foi realizada utilizando-se o planejamento experimental Doehlert ou Matriz Doehlert para duas variáveis, formado por um ponto central e seis pontos adicionais, formando um hexágono regular (Figura 8), sendo o ponto central repetido 3 vezes, totalizando o número de 9 experimentos, conforme Doehlert (1970). Os parâmetros avaliados foram a concentração de substrato, analisada em 5 níveis, e o tempo de reação, analisado em 3 níveis, estando os valores correspondentes a cada nível descritos na Tabela 1.

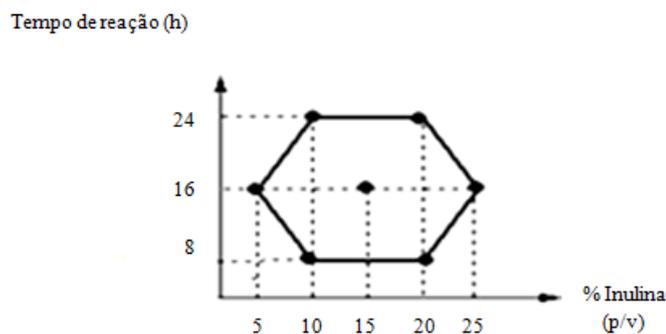


Figura 8: Hexágono Regular demonstrando Planejamento Doehlert para síntese de FOS.

Tabela 1: Planejamento Doehlert para otimização da síntese de fruto-oligosacarídeos.

N° do experimento	Concentração de Inulina (%)	Tempo de Reação (h)
1	10 (-0,5)	24 (+0,866)
2	20 (+0,5)	24 (+0,866)
3	5 (-1,0)	16 (0,0)
4	15 (0,0)	16 (0,0)
5	15 (0,0)	16 (0,0)
6	15 (0,0)	16 (0,0)
7	25 (+1)	16 (0,0)
8	10 (-0,5)	8 (-0,866)
9	20 (+0,5)	8 (-0,866)

A síntese de FOS foi realizada utilizando-se enzima inulinase imobilizada em celite em meio orgânico (acetona), adicionando-se em tubos de ensaio com volume total de 10 mL contendo a inulinase imobilizada (5%, p/v) o volume de 2,5 mL da solução de substrato inulina, nas concentrações descritas no planejamento experimental. As amostras foram incubadas a 50°C em agitador *shaker* para síntese dos FOS, sendo o tempo de reação de acordo planejamento experimental. Os sobrenadantes de reação foram coletados e filtrados em microfiltros de 0,22 μm para posterior realização das análises do produto obtido por CLAE.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste F, através do programa *Statistic* versão 7.0, e pela análise das médias e desvio padrão, através do programa *Origin* versão 8.5.1.

5 RESULTADOS

5.1 IMOBILIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE FRUTOSE

5.1.1 Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306)

A enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) foi imobilizada nos suportes casca de ovo, celite, Immobeads®, Sepabeads® e sílica. Após o procedimento de imobilização, realizou-se a dosagem de açúcar redutor, conforme Miller (1959). A dosagem da atividade enzimática foi avaliada pela velocidade da reação, medida e expressa em Unidade Internacional de Atividade (UA), que corresponde a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto.

A Figura 9 mostra a atividade enzimática da inulinase, sendo demonstradas na Tabela 2 as médias e desvios padrão para atividade enzimática da enzima livre, dos sobrenadantes de imobilização e da enzima imobilizada.

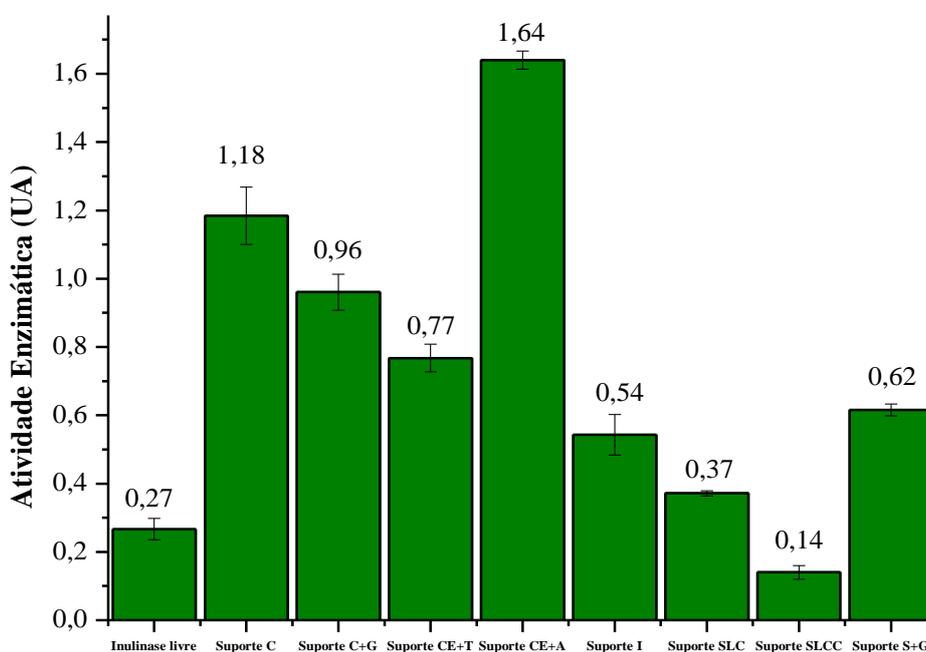


Figura 9: Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).
 Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Tabela 2: Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

	Atividade do sobrenadante (UA)			Atividade da enzima imobilizada (UA)		
	Média	Desvio Padrão	p	Média	Desvio Padrão	p
Inulinase livre	0,26669	0,03092	0,00445	-	-	-
Inulinase imobilizada Em C	0,19667	0,08403	0,18679	1,18446	0,04418	0,01679
Inulinase imobilizada Em C+G	0,05635	0,05286	0,37288	0,96036	0,08960	0,00289
Inulinase imobilizada Em CE+T	0,39389	0,04071	0,00354	0,76770	0,01499	0,00879
Inulinase imobilizada Em CE+A	0,97106	0,02643	0,01225	1,63991	0,08248	0,00084
Inulinase imobilizada Em I	0,14655	0,05930	0,05048	0,54323	0,09531	0,01011
Inulinase imobilizada em SLC	0,19583	0,00773	0,00052	0,37139	0,04329	0,00450
Inulinase imobilizada em SLCC	0,21666	0,01992	0,00280	0,14004	0,09626	0,28803
Inulinase imobilizada em S+G	0,51161	0,01702	0,00037	0,61557	0,01225	0,00013

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

A concentração de proteína total para enzima imobilizada (CPTI) foi estimada através da subtração da concentração de proteína total da enzima livre (CPTL) pela concentração de proteína total no sobrenadante de imobilização (CPTS), conforme Equação 2, sendo a dosagem de proteína total realizada conforme Bradford (1976), utilizando-se como padrão soro de albumina bovina. A Figura 10 mostra as concentrações de proteína, em mg/mL, sendo demonstrados nas Tabela 3os valores das médias e desvio padrão.

$$CPTI = CPTL - CPTS \quad (\text{Equação 2})$$

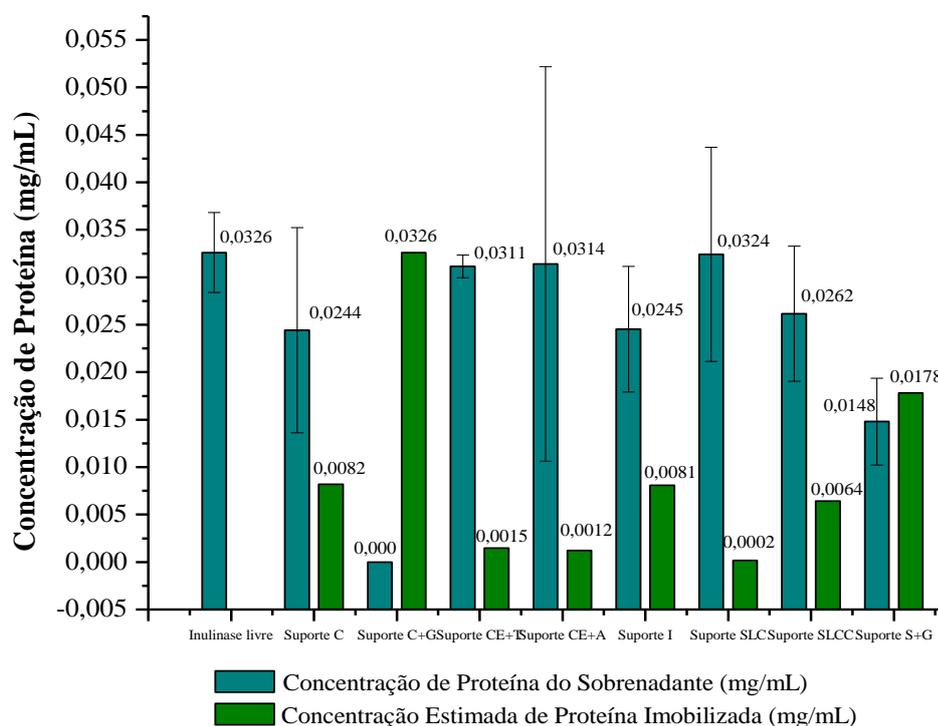


Figura 10: Concentração de proteína total (mg/mL) estimada para enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Tabela 3: Concentração de proteína total da enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

	Concentração de proteína total no sobrenadante (mg/mL)		p	Concentração de proteína total estimada para inulinase imobilizada (mg/mL)
	Média	Desvio Padrão		
Inulinase livre	0,03260	0,00421	0,00552	-
Inulinase imobilizada Em C	0,02441	0,01081	0,05954	0,00819
Inulinase imobilizada Em C+G	0,00000	0,00000	0,00000	0,0326
Inulinase imobilizada Em CE+T	0,03114	0,0012	0,0174	0,00146
Inulinase imobilizada Em CE+A	0,03139	0,02079	0,12043	0,00121
Inulinase imobilizada Em I	0,02453	0,00661	0,02337	0,00807
Inulinase imobilizada em SLC	0,03242	0,01127	0,15343	0,00018
Inulinase imobilizada em SLCC	0,02616	0,00713	0,02391	0,00644
Inulinase imobilizada em S+G	0,01480	0,00457	0,03028	0,01780

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Na Figura 11, pode-se observar a atividade da enzima imobilizada em relação a quantidade de suporte, em UA/g. Essa relação descreve a taxa de imobilização da enzima. As médias e desvios padrão para os valores são demonstrados na Tabela 4.

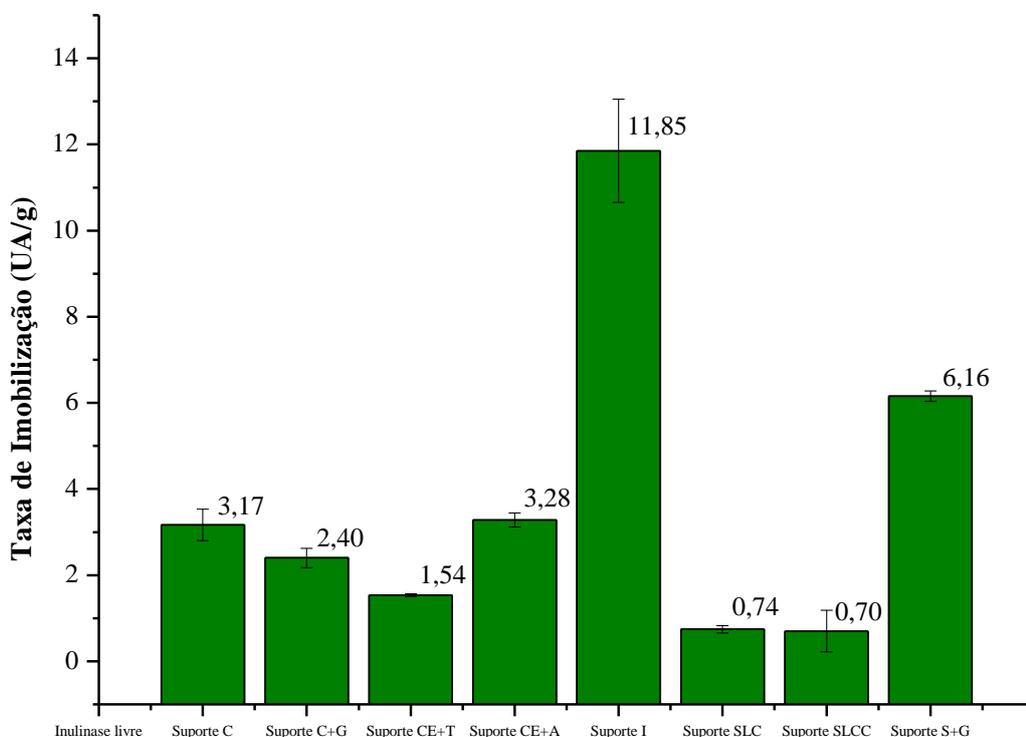


Figura 11: Relação da atividade da enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g.

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Tabela 4: Relação da atividade da enzima inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g.

	Média	Desvio Padrão	p
Inulinase imobilizada Em C	3,16666	0,36441	0,00439
Inulinase imobilizada Em C+G	2,40091	0,22400	0,00289
Inulinase imobilizada Em CE+T	1,53539	0,02998	0,00879
Inulinase imobilizada Em CE+A	3,27982	0,16496	0,00084
Inulinase imobilizada Em I	11,85020	1,19931	0,04548
Inulinase imobilizada em SLC	0,74278	0,08659	0,00450
Inulinase imobilizada em SLCC	0,70019	0,48130	0,28803
Inulinase imobilizada em S+G	6,15571	0,12253	0,00013
Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.			

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

5.1.2 Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604)

A enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) foi imobilizada nos suportes casca de ovo, celite, Immobeads®, Sepabeads® e sílica, empregando-se métodos de imobilização por adsorção, por ligação covalente e por ligação covalente cruzada. A dosagem de açúcar redutor foi realizada conforme Miller (1959), sendo a atividade enzimática avaliada como a velocidade da reação, medida e expressa em Unidade Internacional de Atividade (UA), que corresponde a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto.

A Figura 12 mostra a atividade enzimática da inulinase, sendo demonstradas na Tabela 5 as médias e desvios padrão para atividade enzimática da enzima livre, dos sobrenadantes de imobilização e da enzima imobilizada.

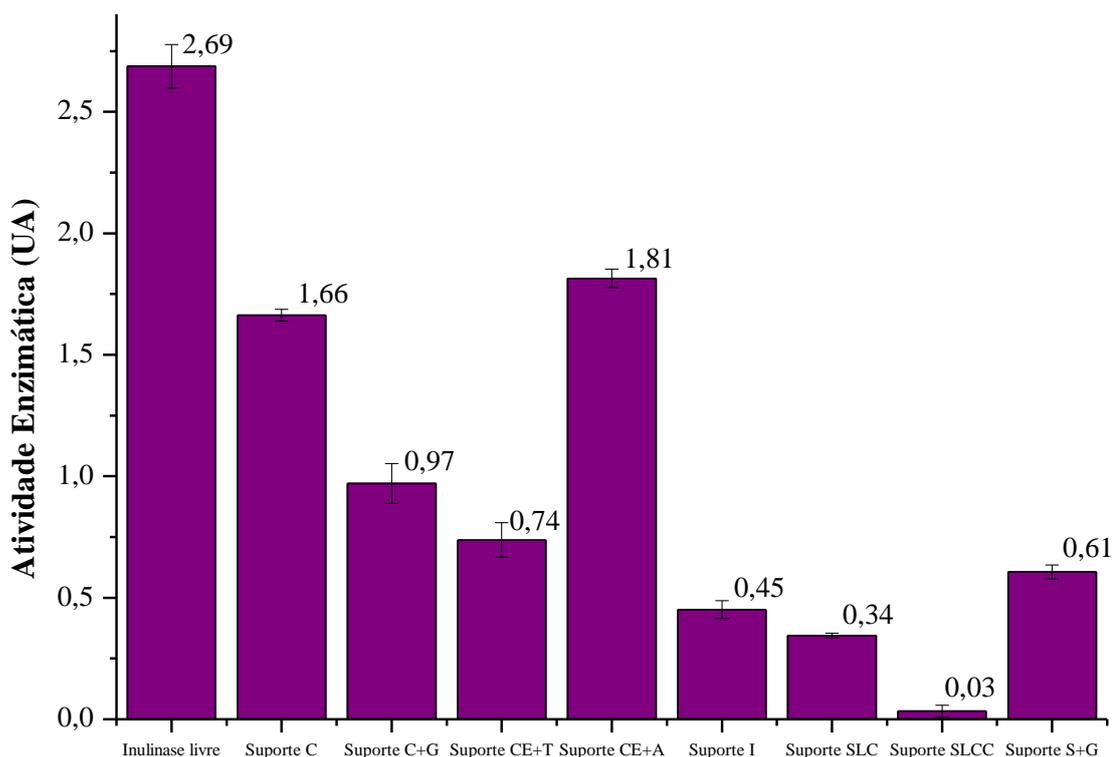


Figura 12: Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).
 Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Tabela 5: Atividade enzimática da enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

	Atividade do sobrenadante (UA)			Atividade da enzima imobilizada (UA)		
	Média	Desvio Padrão	p	Média	Desvio Padrão	p
Inulinase livre	2,68713	0,08994	0,00037	-	-	-
Inulinase imobilizada Em C	2,53519	0,02446	0,00434	1,66288	0,02328	0,00630
Inulinase imobilizada Em C+G	2,19681	0,08245	0,01689	0,97041	0,04212	0,00063
Inulinase imobilizada Em CE+T	1,44371	0,07086	0,00080	0,73776	0,03917	0,00094
Inulinase imobilizada Em CE+A	1,93068	0,03827	0,00892	1,81435	0,06138	0,00038
Inulinase imobilizada Em I	0,44782	0,03701	0,00227	0,45117	0,02625	0,00113
Inulinase imobilizada em SLC	0,89267	0,01024	0,00004	0,34405	0,01787	0,00090
Inulinase imobilizada em SLCC	0,39240	0,02422	0,00127	0,03292	0,05701	0,42265
Inulinase imobilizada em S+G	2,60864	0,02843	0,00004	0,60571	0,09479	0,00806
Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.						

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

A concentração de proteína total para enzima imobilizada foi estimada através da subtração da concentração de proteína total da enzima livre pela concentração de proteína total no sobrenadante de imobilização, sendo a dosagem de proteína total realizada conforme Bradford (1976), utilizando-se como padrão soro de albumina bovina. A Figura 13 mostra as concentrações de proteína, em mg/mL, sendo demonstrados na Tabela 6 os valores das médias e desvio padrão.

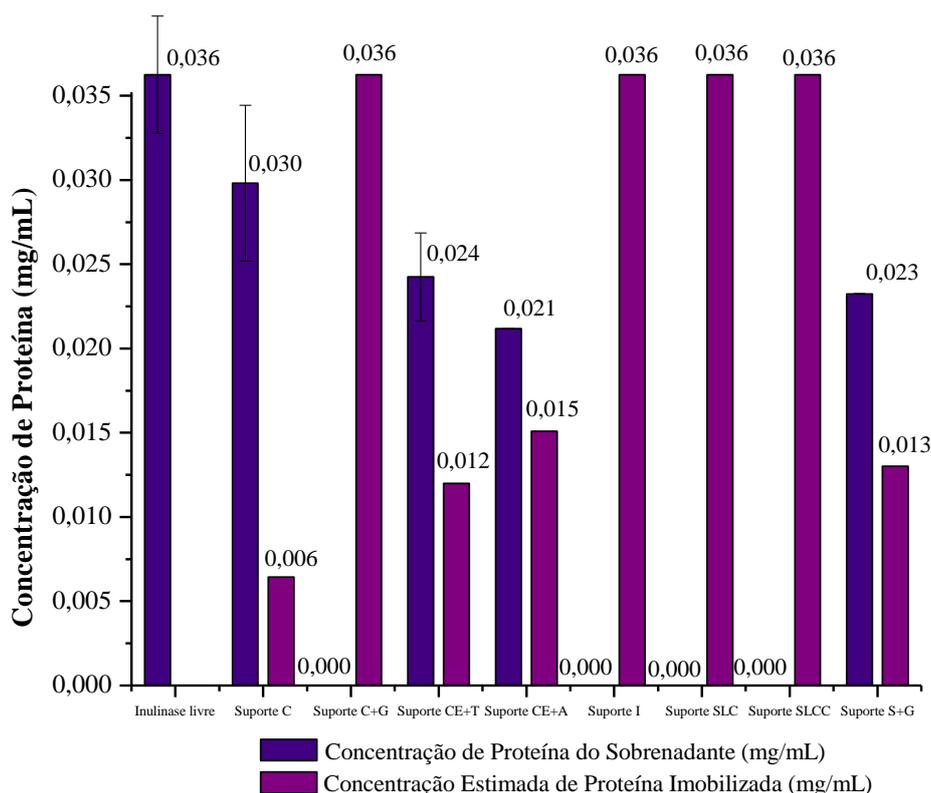


Figura 13: Concentração de proteína total da enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Tabela 6: Concentração de proteína total da enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

	Concentração de proteína total no sobrenadante (mg/mL)		p	Concentração de proteína total estimada para inulinase imobilizada (mg/mL)
	Média	Desvio Padrão		
Inulinase livre	0,03625	0,00348	0,00305	-
Inulinase imobilizada Em C	0,02981	0,00462	0,00792	0,00644
Inulinase imobilizada Em C+G	0,00000	0,00000	0,00000	0,03625
Inulinase imobilizada Em CE+T	0,02425	0,00260	0,00381	0,01200
Inulinase imobilizada Em CE+A	0,02117	0,00001	0,00000	0,01508
Inulinase imobilizada Em I	0,00000	0,00000	0,00000	0,03625
Inulinase imobilizada em SLC	0,00000	0,00000	0,00000	0,03625
Inulinase imobilizada em SLCC	0,00000	0,00000	0,00000	0,03625
Inulinase imobilizada em S+G	0,02324	0,00001	0,00000	0,01301

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

A taxa de imobilização da inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) quando imobilizada em suportes sólidos é descrita na Figura 14, sendo as médias e desvios padrão para os valores encontrados demonstrados na Tabela 7.

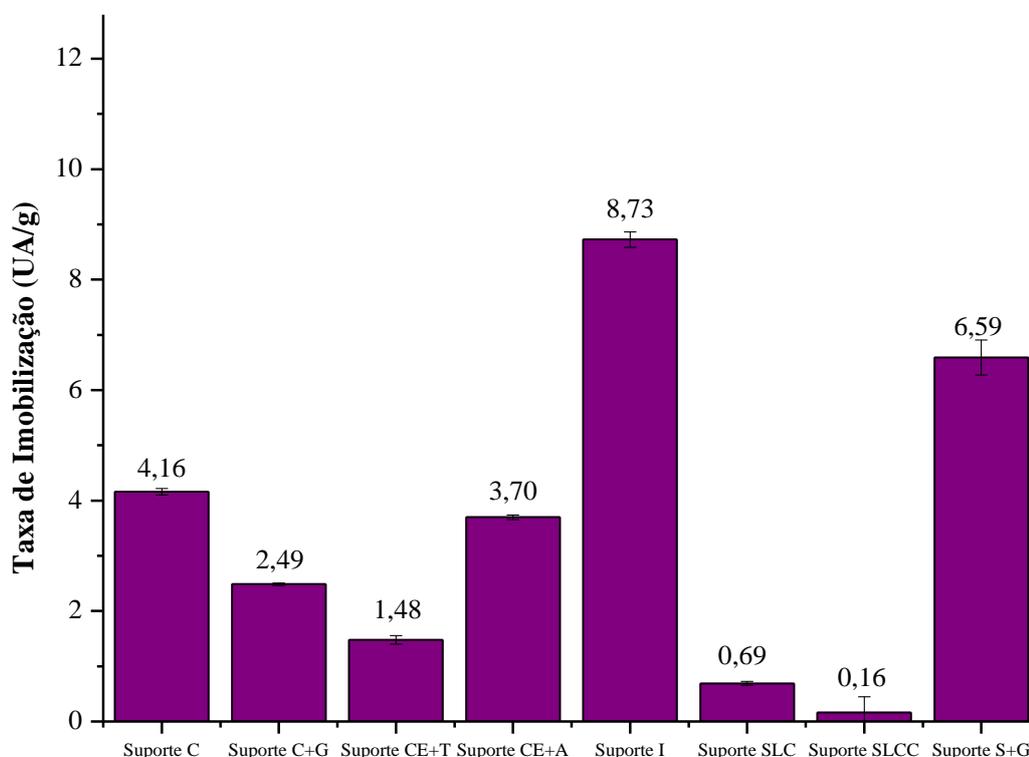


Figura 14: Relação da atividade da enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g.

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

Tabela 7: Relação da atividade da enzima inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) imobilizada com a quantidade de suporte utilizada (Taxa de imobilização), em UA/g.

	Média	Desvio Padrão	p
Inulinase imobilizada Em C	4,15720	0,05819	0,00630
Inulinase imobilizada Em C+G	2,48623	0,02071	0,00375
Inulinase imobilizada Em CE+T	1,47551	0,07834	0,00094
Inulinase imobilizada Em CE+A	3,69733	0,04340	0,00528
Inulinase imobilizada Em I	8,72586	0,14202	0,00733
Inulinase imobilizada em SLC	0,68810	0,03573	0,00090
Inulinase imobilizada em SLCC	0,16459	0,28507	0,42265
Inulinase imobilizada em S+G	6,58903	0,31561	0,02155

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Legenda: Enzima inulinase imobilizada em: C (Casca de ovo); C+G (Casca de ovo+glutaraldeído); CE+T (Celite+tampão); CE+A (Celite+acetona); I (Immobeads®); SLC (Sepabeads® por ligação covalente); SLCC (Sepabeads por ligação covalente cruzada); S+G (Sílica+glutaraldeído).

5.2 PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

5.2.1 Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306)

5.2.1.1 Análise qualitativa

A síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS) foi realizada pela hidrólise da inulina por inulinase livre (extrato bruto solúvel) e pela inulinase imobilizada nos suportes sólidos. As amostras foram analisadas qualitativamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), identificando-se os produtos formados, com base nos cromatograma dos padrões frutose (Figura 15), 1-questose (Figura 16) e nistose (Figura 17).

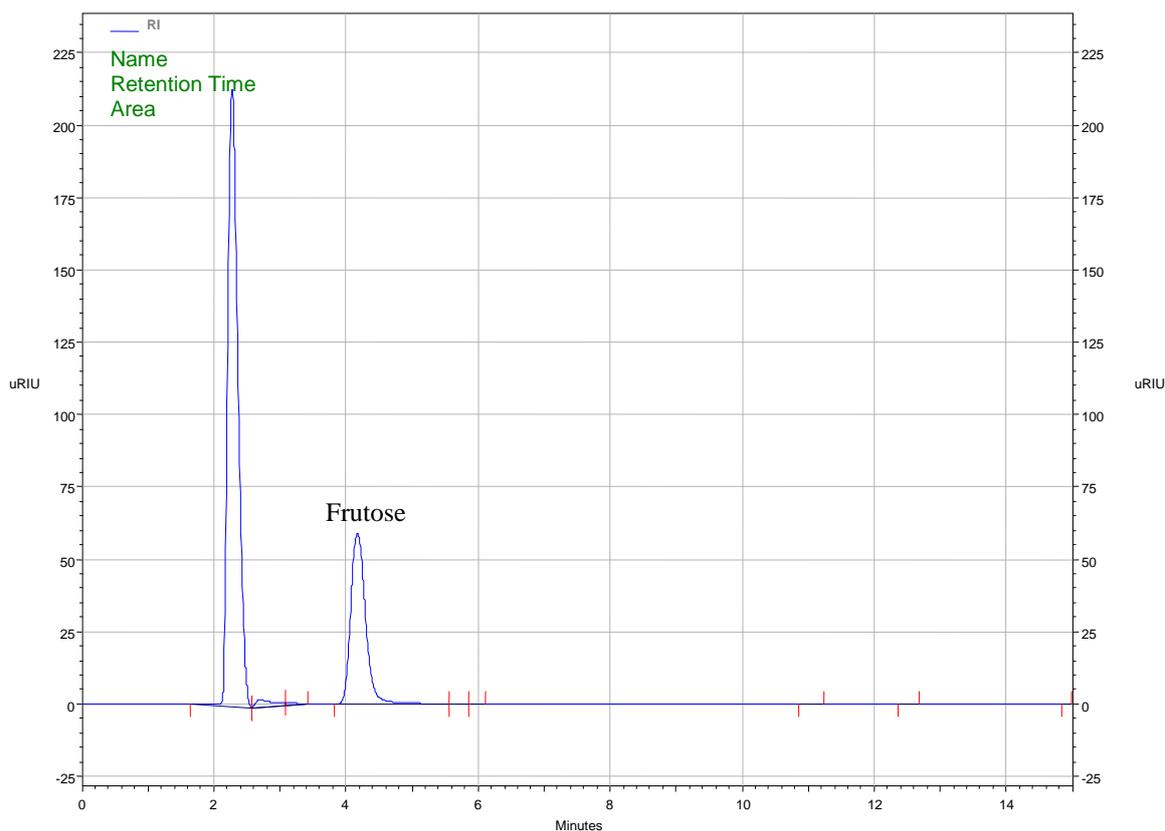


Figura 15: Cromatograma do padrão frutose.

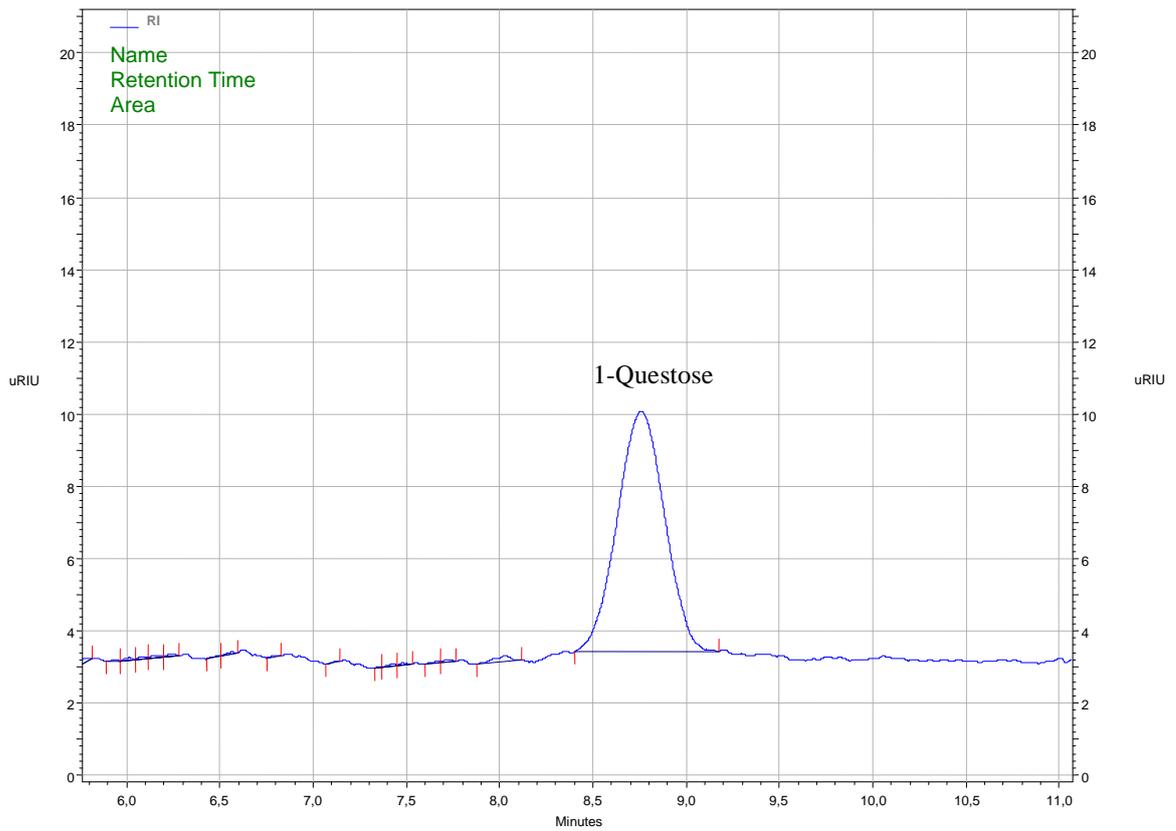


Figura 16: Cromatograma do padrão 1-questose.

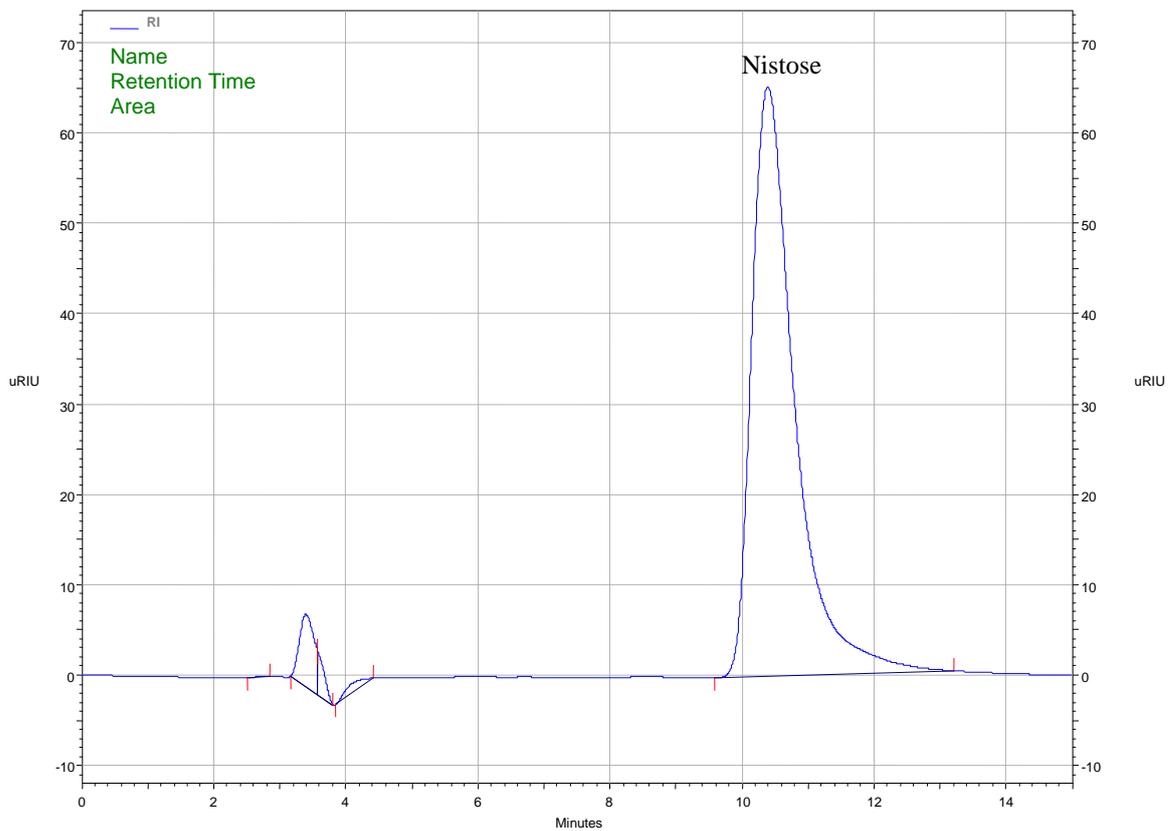


Figura 17: Cromatograma do padrão nistose.

Na Figura 18, observa-se os produtos formados pela síntese de FOS por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

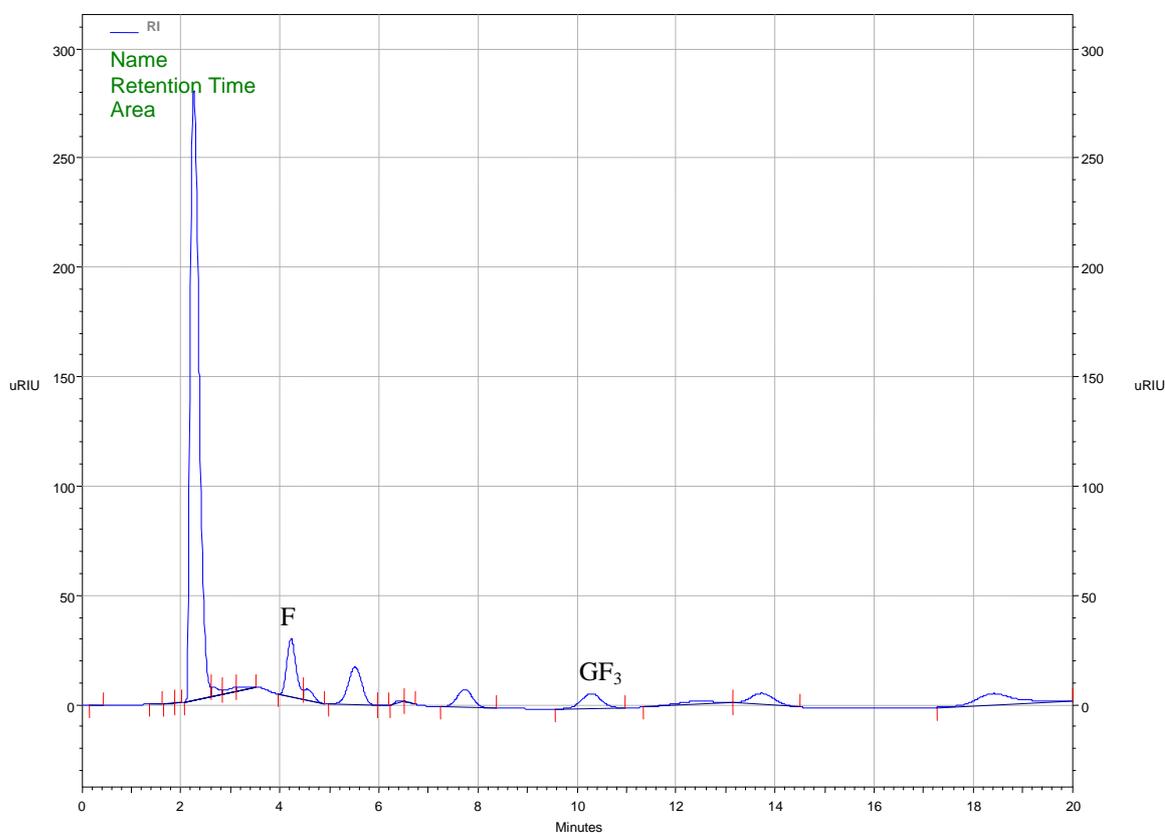


Figura 18: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase (extrato bruto) de *Pseudozyma sp.*(CCMB 306).
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

Avaliando-se os cromatogramas das amostras com inulinase imobilizada, observou-se a produção de FOS pela inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) quando a enzima foi imobilizada em casca de ovo (Figura 19), casca de ovo ativado com glutaraldeído (Figura 20), celite em meio aquoso (Figura 21), celite em meio orgânico (Figura 22), e Immobeads® (Figura 23).

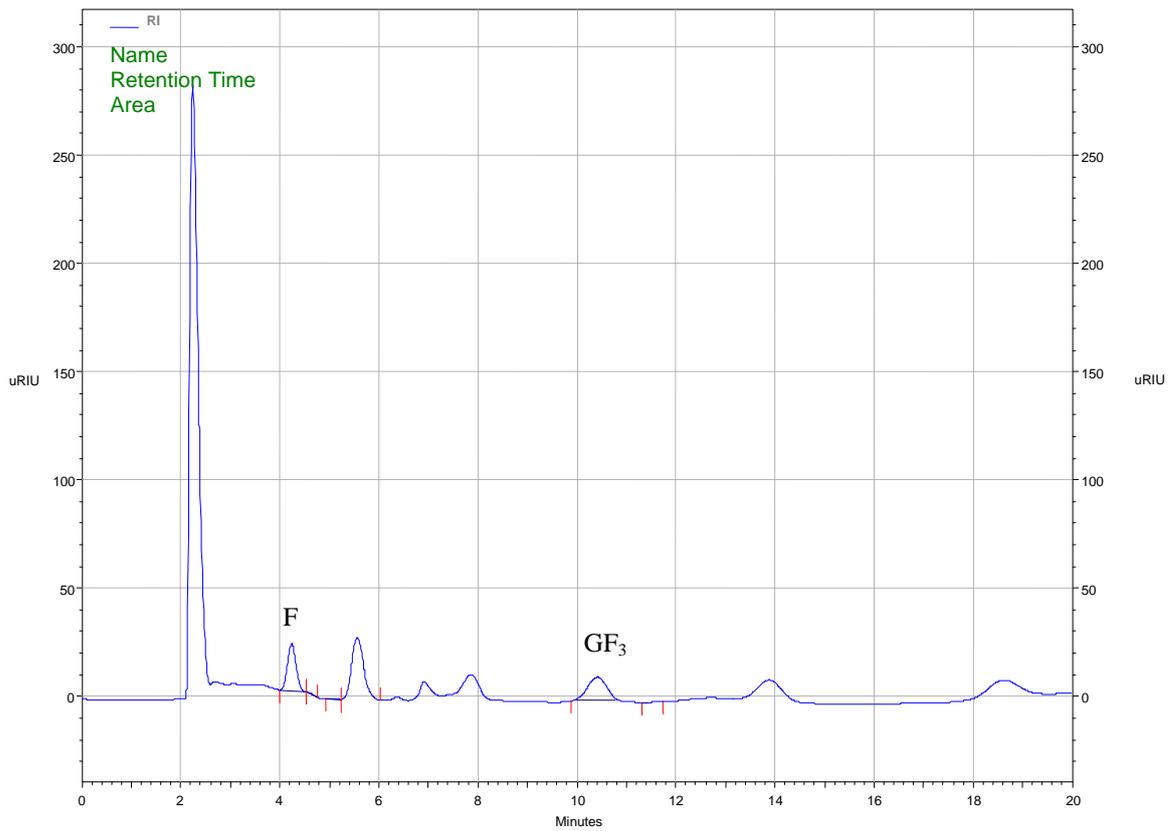


Figura 19: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Pseudozyma sp.*(CCMB 306) quando imobilizada em casca de ovo.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

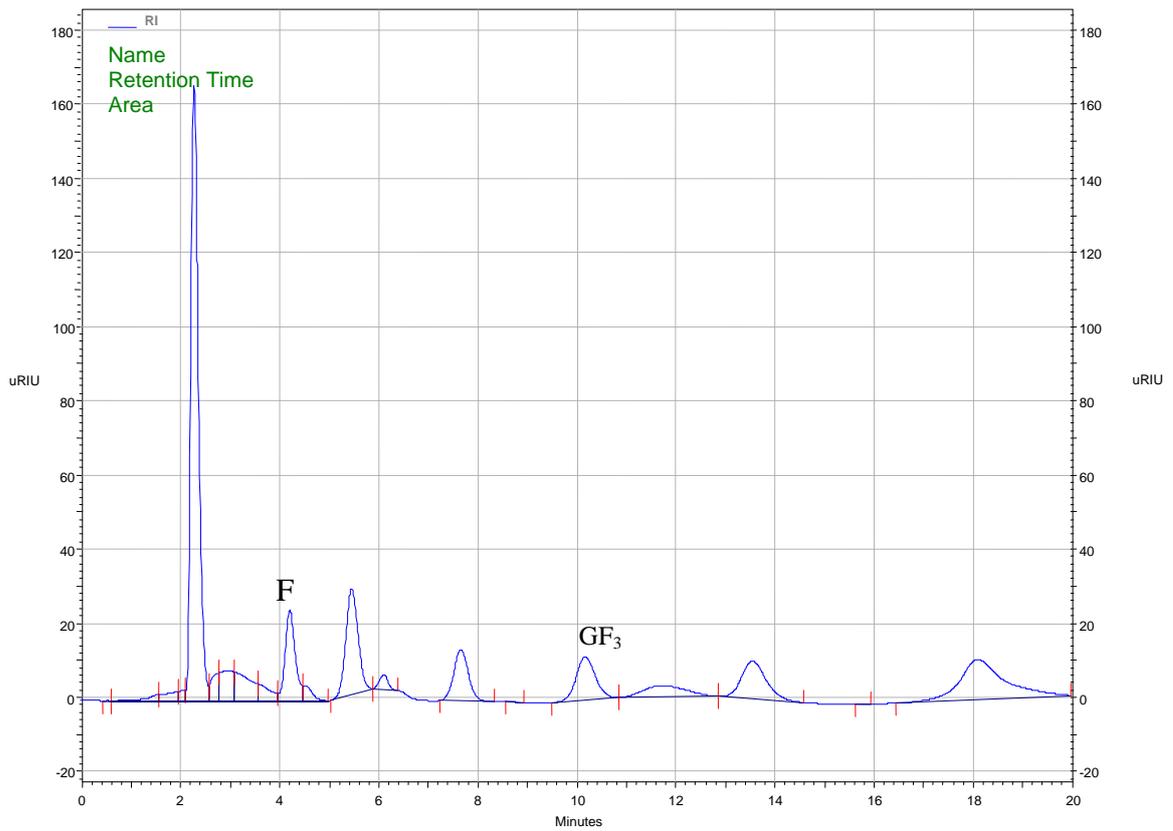


Figura 20: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Pseudozyma sp.*(CCMB 306) quando immobilizada em casca de ovo com glutaraldeído.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

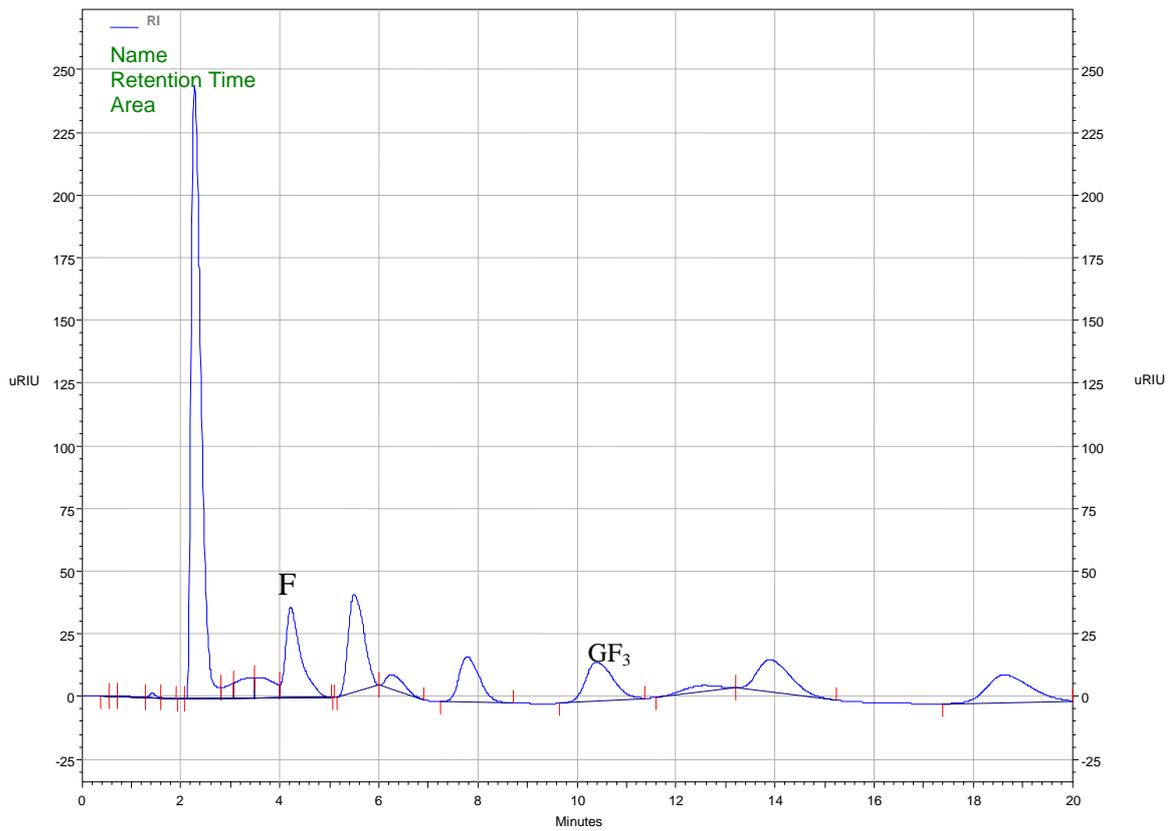


Figura 21: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) quando imobilizada em celite em meio aquoso.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

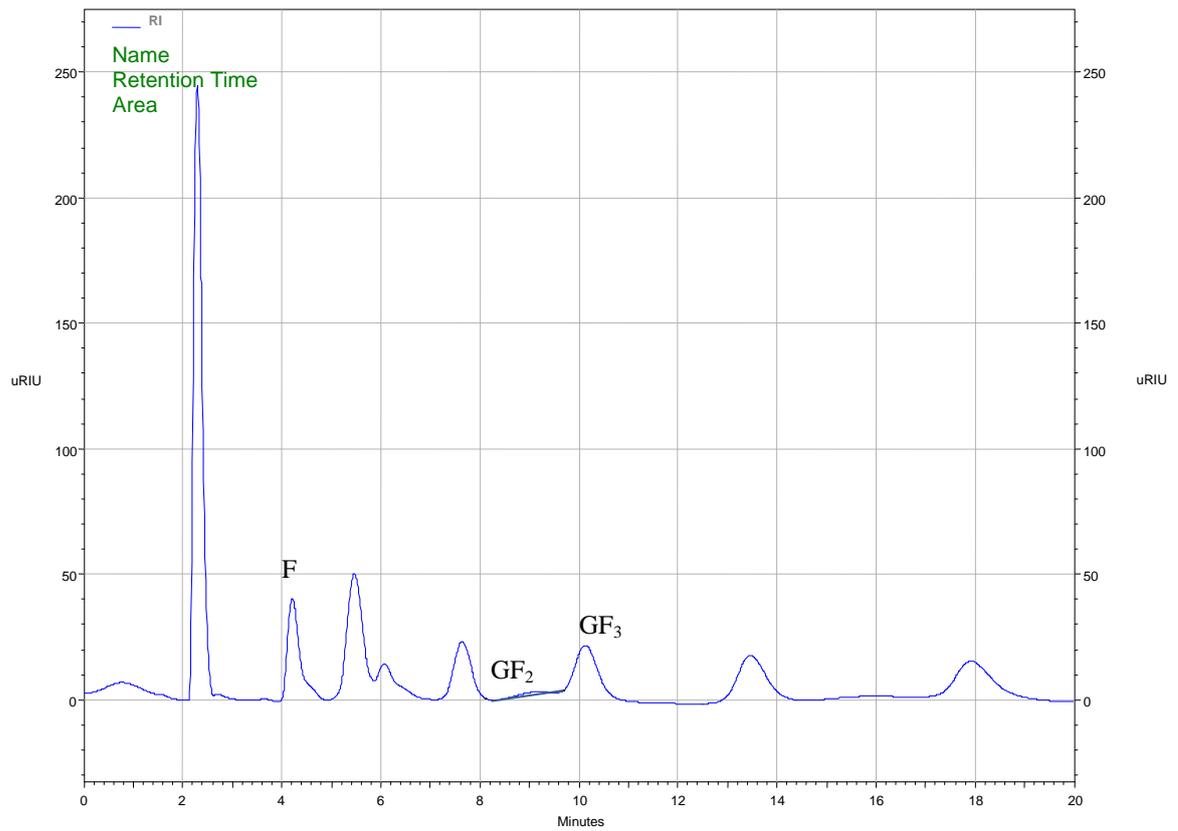


Figura 22: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) quando imobilizada em celite em meio orgânico.
Legenda: (A) frutose; (GF₂) 1-questose e (GF₃) nistose.

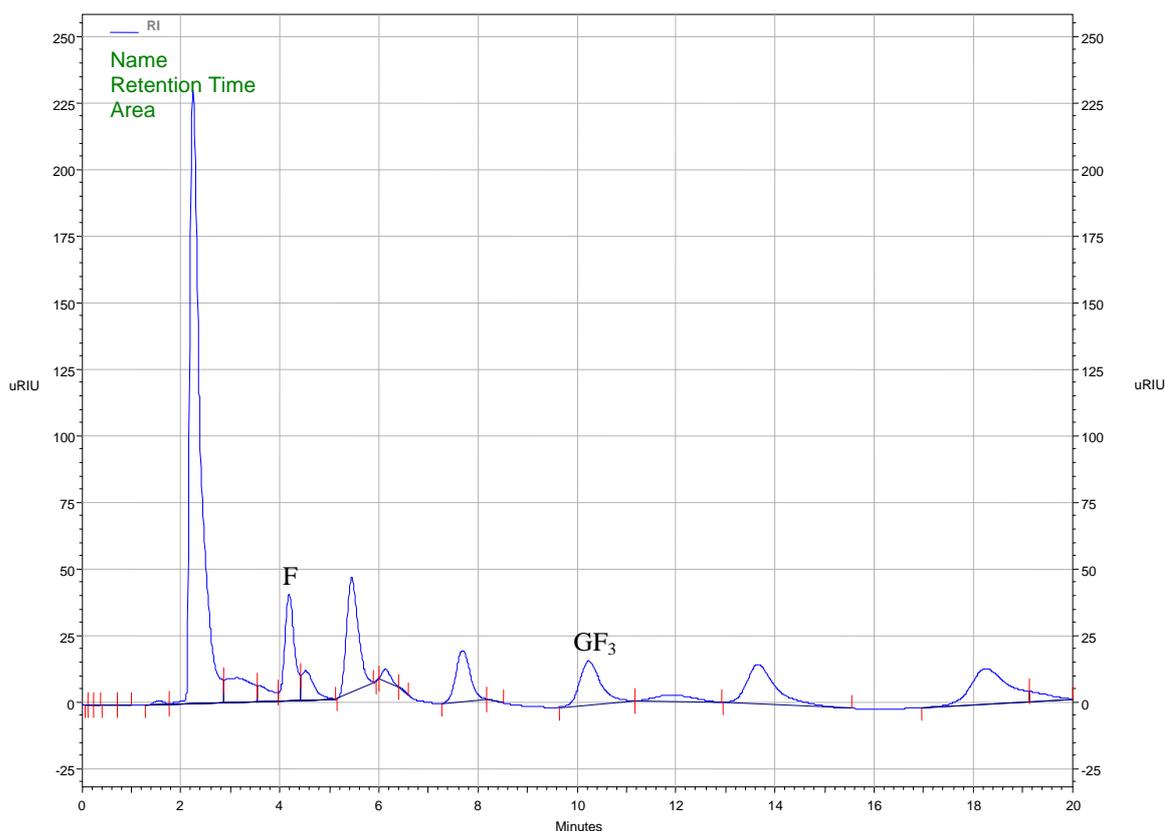


Figura 23: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Pseudozyma sp.*(CCMB 306) quando imobilizada em Immobeads®.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

5.2.1.2 Análise quantitativa

A análise quantitativa dos FOS 1-questose e nistose foi realizada com auxílio do planejamento experimental Doehlert, quantificando-se o produto formado na hidrólise de inulina por inulinase imobilizada em celite em meio aquoso (acetona). Para tal, inicialmente construiu-se um planejamento experimental, obtendo-se as variáveis para concentração de substrato inulina (5, 10, 15, 20 e 25%, p/v) e tempo de reação (8, 16 e 24 h).

Realizou-se a imobilização da inulinase em celite em meio orgânico (acetona) e aplicou-se a enzima imobilizada na hidrólise de inulina, analisando-se os produtos obtidos por CLAE. As curvas padrão de 1-questose e nistose utilizadas para quantificação do produto obtido podem ser observadas nos Anexos A e B, respectivamente.

Na Tabela 8, mostra-se os resultados obtidos na síntese de FOS 1-questose por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) quando imobilizada em celite em meio orgânico. Observou-se que a maior concentração de FOS foi obtida no ponto E5, com inulina

a 25% e tempo de reação de 16 h. O cromatograma obtido nesse ponto é demonstrado na Figura 24.

Tabela 8: Planejamento Doehlert para otimização da produção de 1-questose na hidrólise de inulina por inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

Experimento	Concentração de Inulina (% p/v)	Tempo de Reação (h)	Concentração de FOS 1-questose (mg/mL)
E1	10 (-0,5)	24 (+0,866)	186,4086
E2	20 (+0,5)	24 (+0,866)	456,1644
E3	5 (-1,0)	16 (0,0)	116,4623
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	325,9921
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	316,8957
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	316,3752
E5	25 (+1)	16 (0,0)	631,0787
E6	10 (-0,5)	8 (-0,866)	199,0855
E7	20 (+0,5)	8 (-0,866)	395,4141

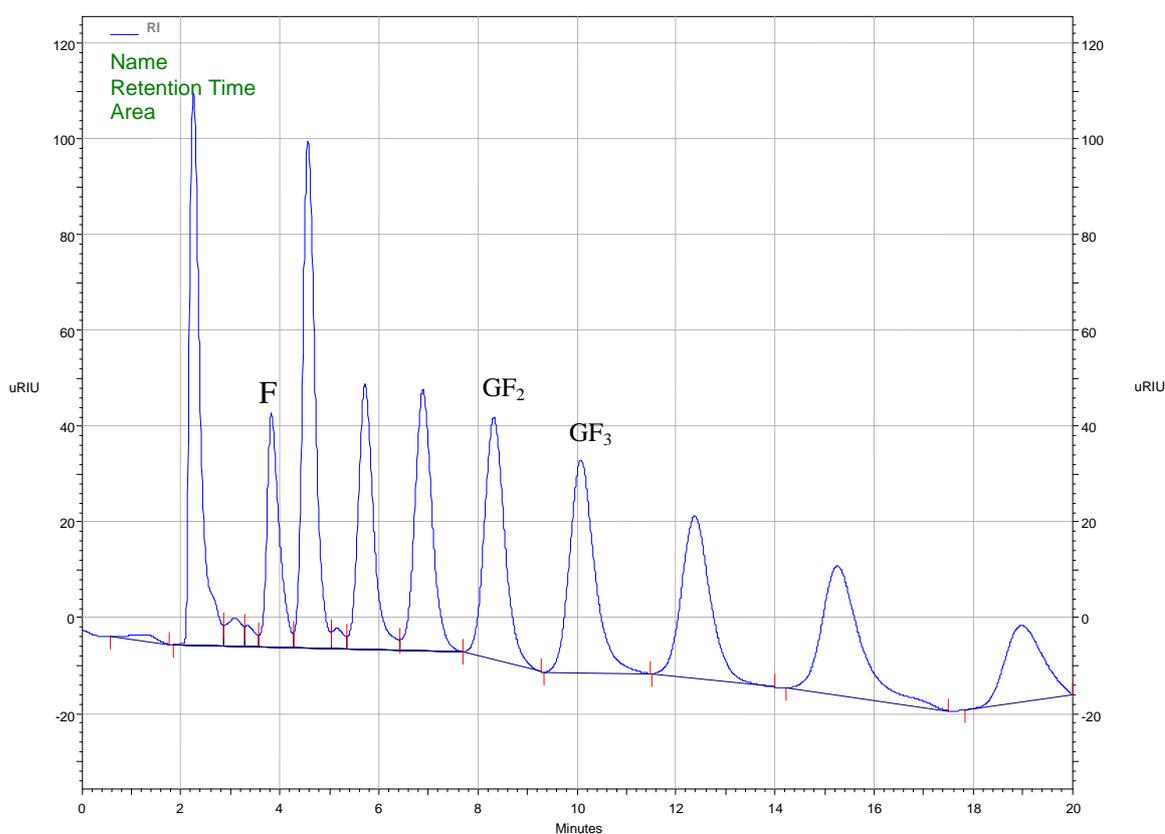


Figura 24: Cromatograma dos produtos formados na produção de FOS por inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) usando como substrato inulina 25% (p/v).

Legenda: (F) frutose; (GF₂) 1-questose e (GF₃) nistose.

Com auxílio do programa *Statistica*, versão 7.0 obteve-se os gráficos de superfície de resposta (Figura 25) e de área (Figura 26), nos quais se pode observar a influência da concentração das variáveis independentes.

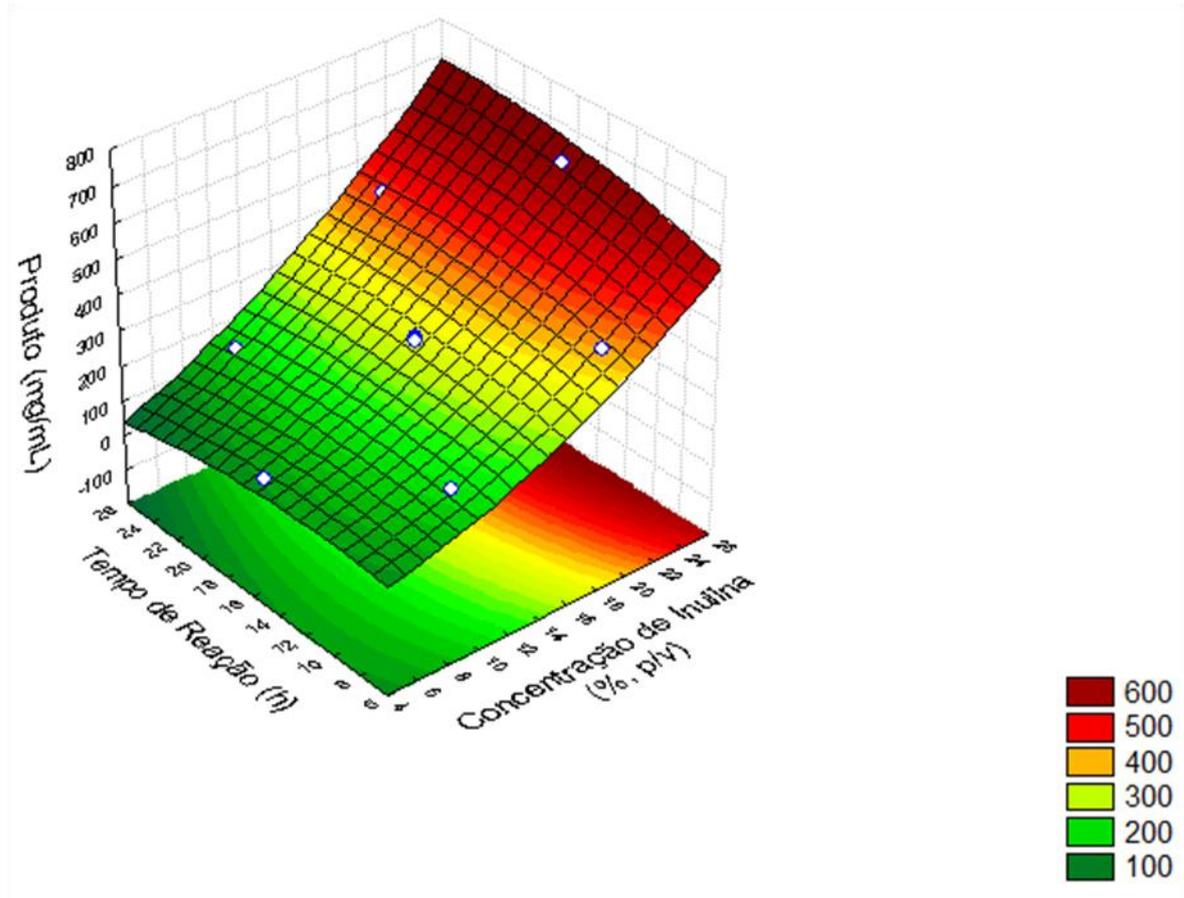


Figura 25: Gráfico de superfície de resposta na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

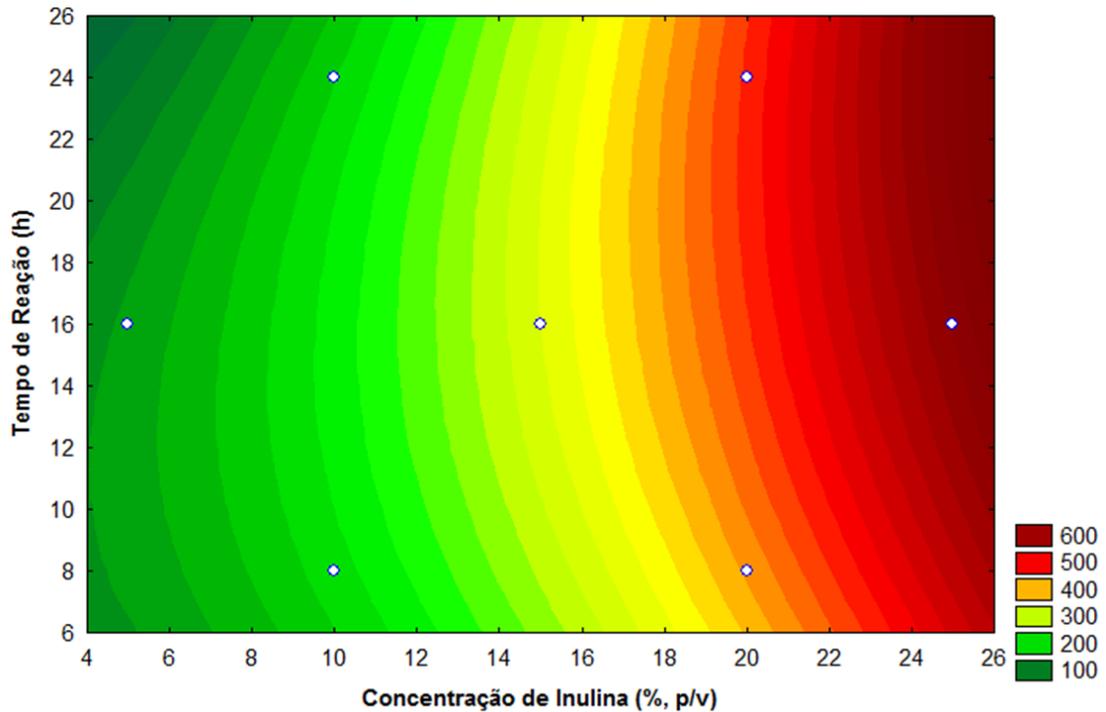


Figura 26: Gráfico de superfície de área na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

O gráfico de Pareto (Figura 27) demonstra a influência das variáveis em estudo sobre as respostas obtidas, sendo os efeitos padronizados em $p = 0,05$. Nesse gráfico, todos os efeitos localizados à direita da linha tracejada são considerados significativos.

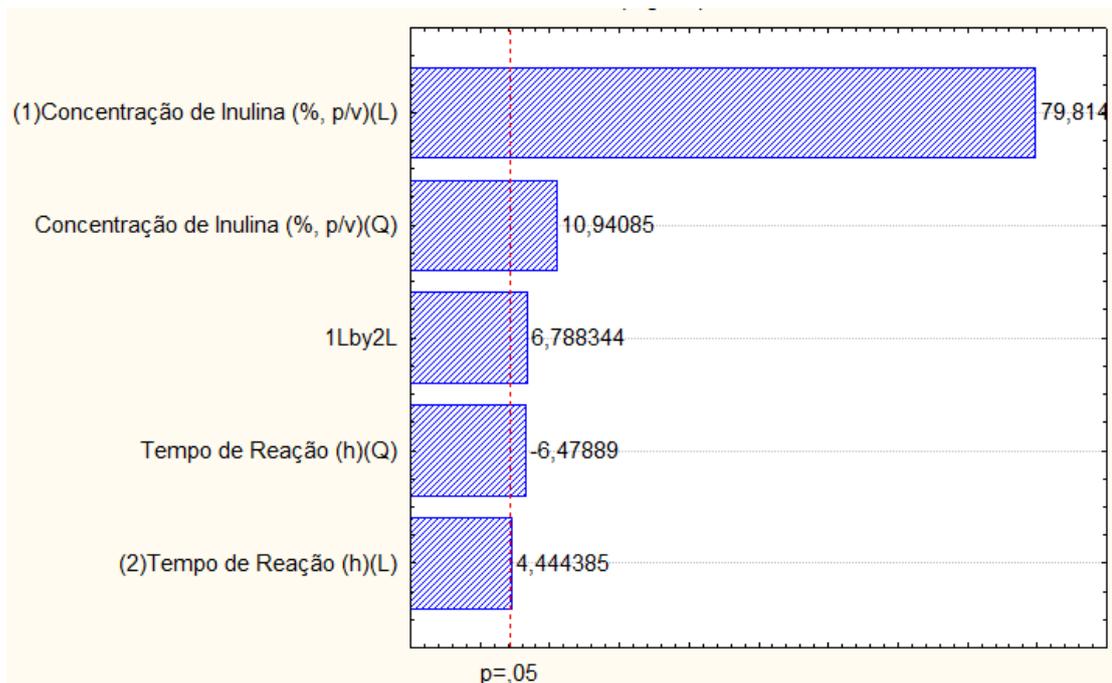


Figura 27: Gráfico de Pareto da produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

A análise de variância (ANOVA) encontrada para otimização da produção do FOS 1-questose é observada na Tabela 9, tendo obtido-se valor de F igual a 258, 12, valor maior que o tabelado (9,01), sendo o R² de 0,99768.

Tabela 9: Análise da variância na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	194046,834205	5	38809,36684	258,1208802	9,01
Resíduo	451,060373	3	150,3534577		
Falta de ajuste	392,560399	1	392,560399	13,4208742	0,000399
Puro erro	58,499974	2	29,249987		
SQ total	194497,894578	8			

Legenda: SQ= Soma quadrática; GL = Graus de liberdade; e MQ = Média quadrática.

A Equação 3 obtida ilustra a relação destas duas variáveis e a atividade da enzima (UA), onde 1Q é a resposta obtida (concentração de 1-questose em mg/mL) CI é Concentração de Inulina em % (p/v) e TR é o Tempo de Reação em horas.

$$1Q = 57,60460 + 1,37438 \times (CI) + 0,54016 \times (CI)^2 + 6,613606 \times (TR) - 0,37484 \times (TR)^2 + 0,45892 \times (CI) (TR) \quad (\text{Equação 3})$$

Na síntese do FOS nistose, obteve-se os resultados demonstrados na Tabela 10, sendo as maiores concentrações de nistose obtidas na hidrólise de inulina a 25 % (p/v), obtendo-se 10,15 mg/mL de nistose num tempo de reação de 16 h.

Tabela 10: Planejamento Doehlert para otimização da produção de nistose na hidrólise de inulina por inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

Experimento	Concentração de Inulina (% p/v)	Tempo de Reação (h)	Concentração de FOS nistose (mg/mL)
E1	10 (-0,5)	24 (+0,866)	3,516074086
E2	20 (+0,5)	24 (+0,866)	7,542902707
E3	5 (-1,0)	16 (0,0)	1,768765659
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	5,361219444
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	4,980708686
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	5,279069648
E5	25 (+1)	16 (0,0)	10,15246181
E6	10 (-0,5)	8 (-0,866)	3,384287699
E7	20 (+0,5)	8 (-0,866)	7,144498956

Os gráficos de superfície de resposta e de área são mostrados nas Figuras 28 e 29, respectivamente. Na Figura 30, pode-se analisar o gráfico de Pareto, no qual se pode observar a influência da concentração das variáveis independentes.

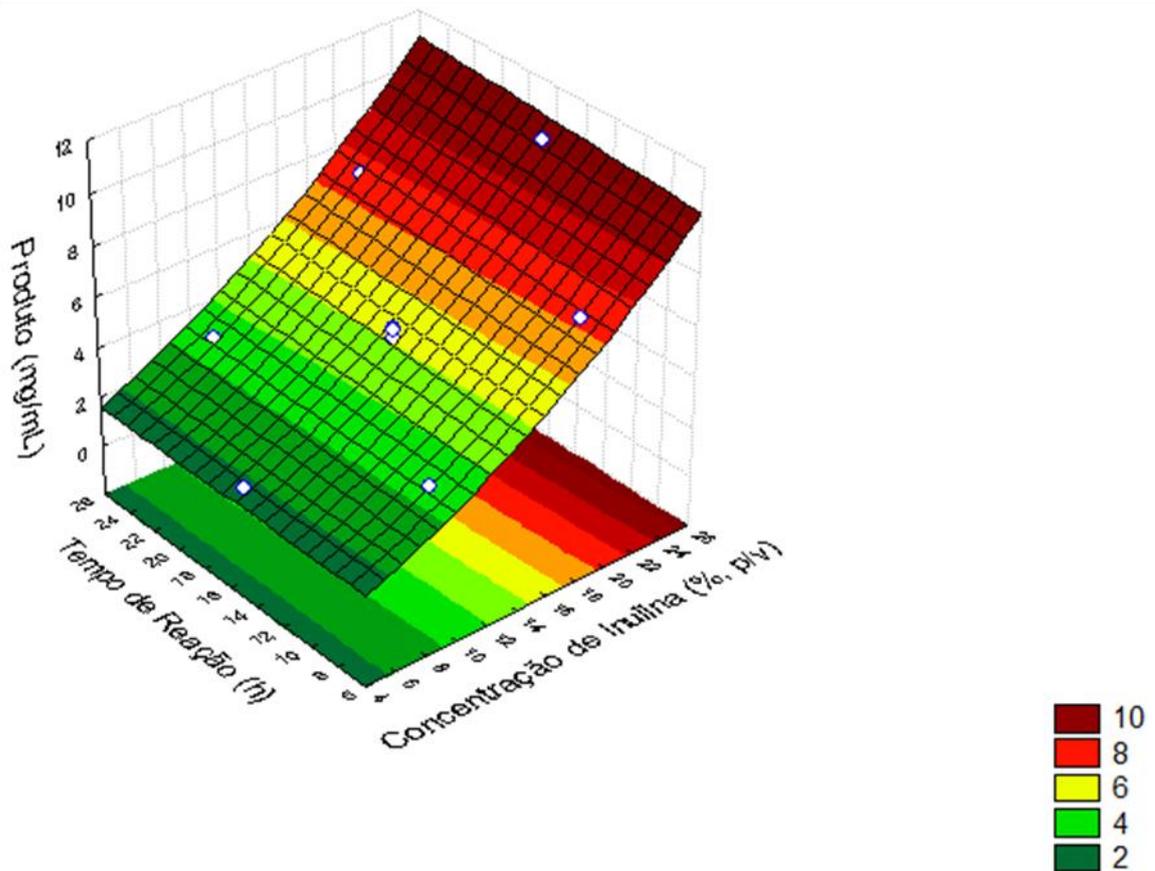


Figura 28: Gráfico de superfície de resposta da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

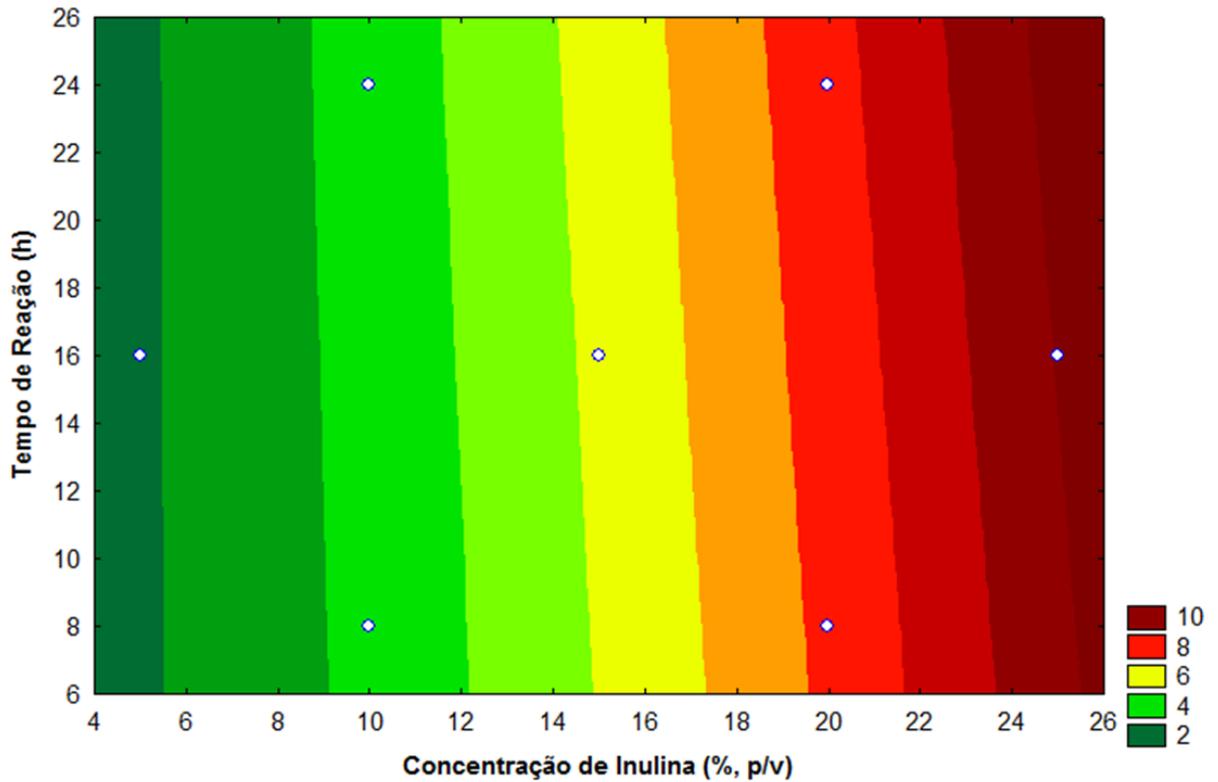


Figura 29: Gráfico de superfície de área na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

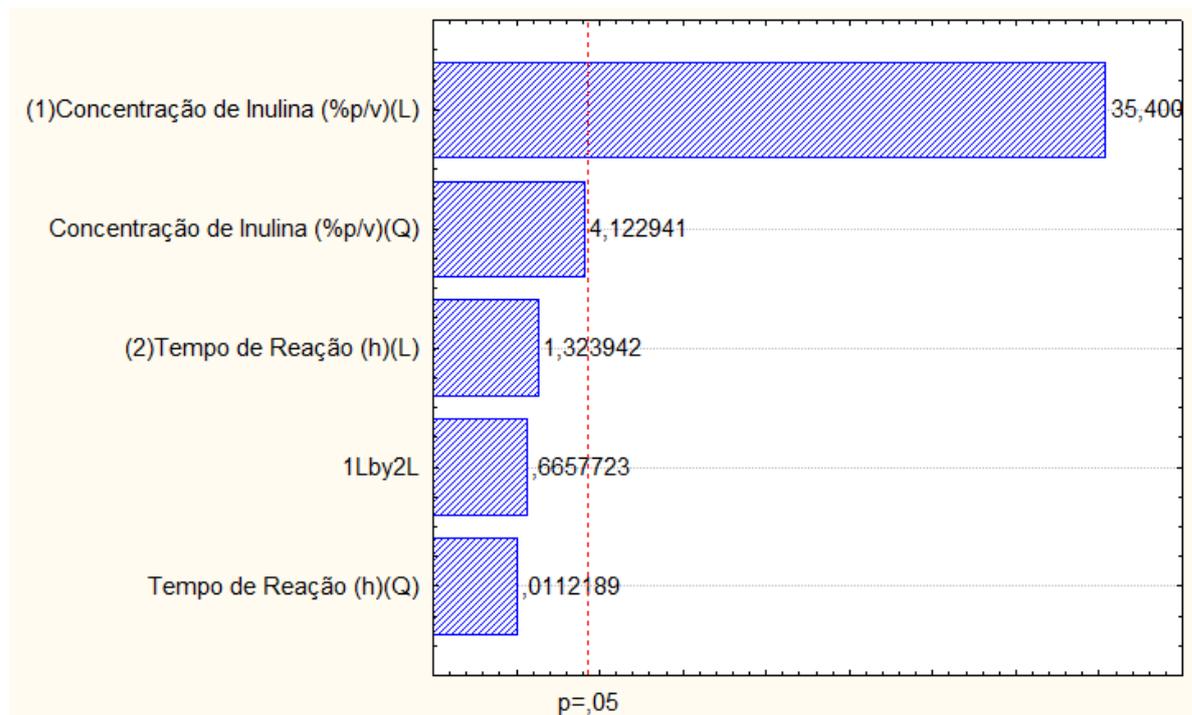


Figura 30: Gráfico de Pareto da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

A análise de variância encontrada para otimização da produção do FOS nistose é demonstrada na Tabela 11, sendo encontrado F calculado de 219,50 e R^2 de 0,99727.

Tabela 11: Análise da variância na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	51,040543	5	10,20810852	219,5000314	9,01
Resíduo	0,139519	3	0,046506182		
Falta de ajuste	0,05933	1	0,05933	1,479897726	0,000399
Puro erro	0,08019	2	0,04009		
SQ total	51,18006	8			

Legenda: SQ = Soma quadrática; GL = Graus de liberdade; e MQ = Média quadrática.

A Equação 4 obtida ilustra a relação destas duas variáveis e a atividade da enzima (UA), onde N é a resposta obtida (concentração de nistose em mg/mL) CI é Concentração de Inulina em % (p/v) e TR é o Tempo de Reação em horas.

$$N = 0,90500 + 0,15649 \times (CI) + 0,00753 \times (CI)^2 - 0,00919 \times (TR) + 0,00002 \times (TR)^2 + 0,00166 \times (CI) (TR) \quad (\text{Equação 4})$$

5.2.2 Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604)

5.2.2.1 Análise qualitativa

Para inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604), observou-se a produção de FOS pela análise dos produtos obtidos na hidrólise de inulina por inulinase livre (Figura 31) e inulinase imobilizada em casca de ovo (Figura 32), casca de ovo ativado com glutaraldeído (Figura 33), celite em meio aquoso (Figura 34), celite em meio orgânico (Figura 35) e Immobeads® (Figura 36).

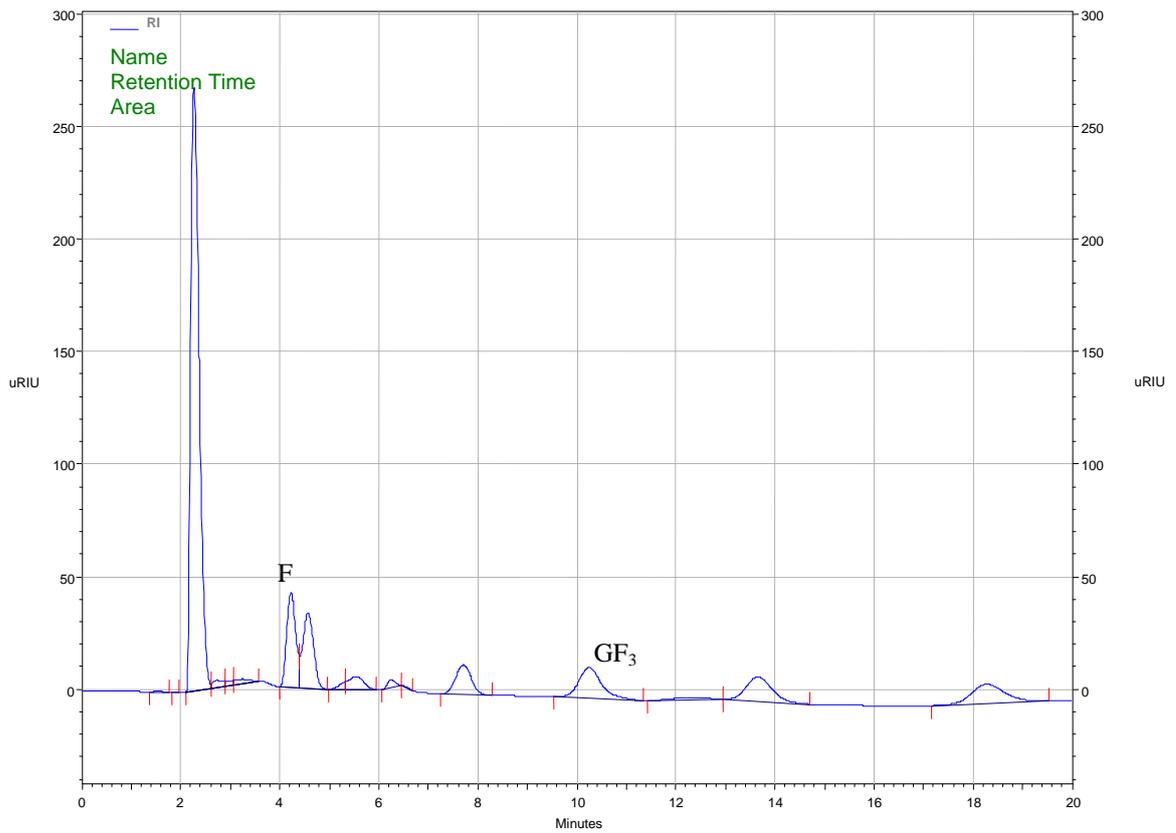


Figura 31: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase (extrato bruto) de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

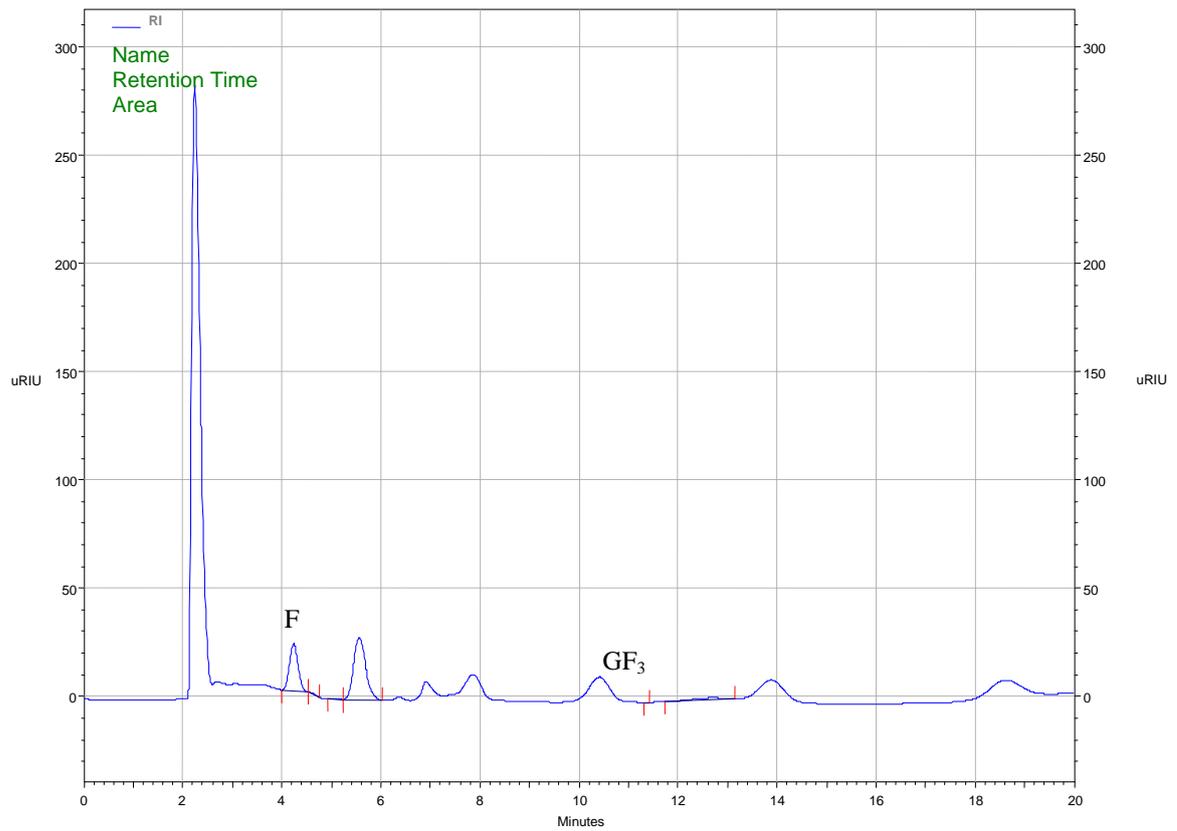


Figura 32: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) quando imobilizada em casca de ovo.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

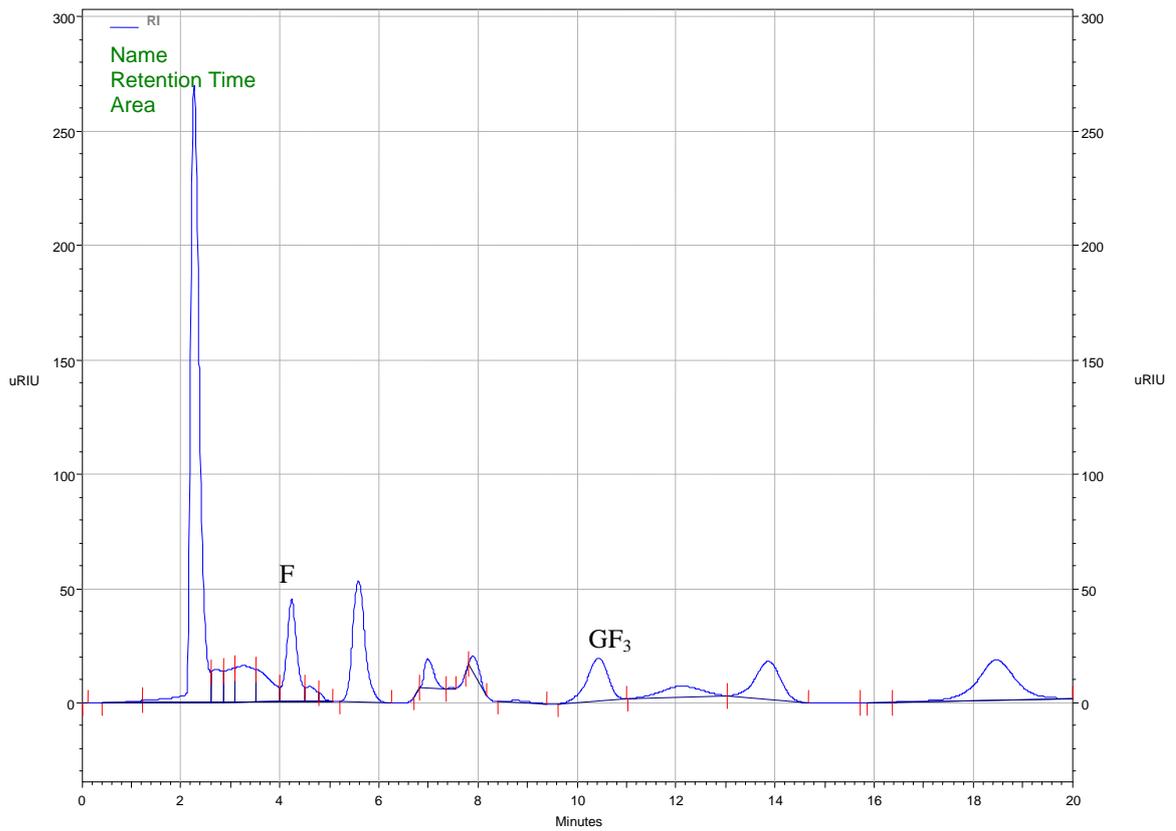


Figura 33: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) quando imobilizada em casca de ovo com glutaraldeído.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

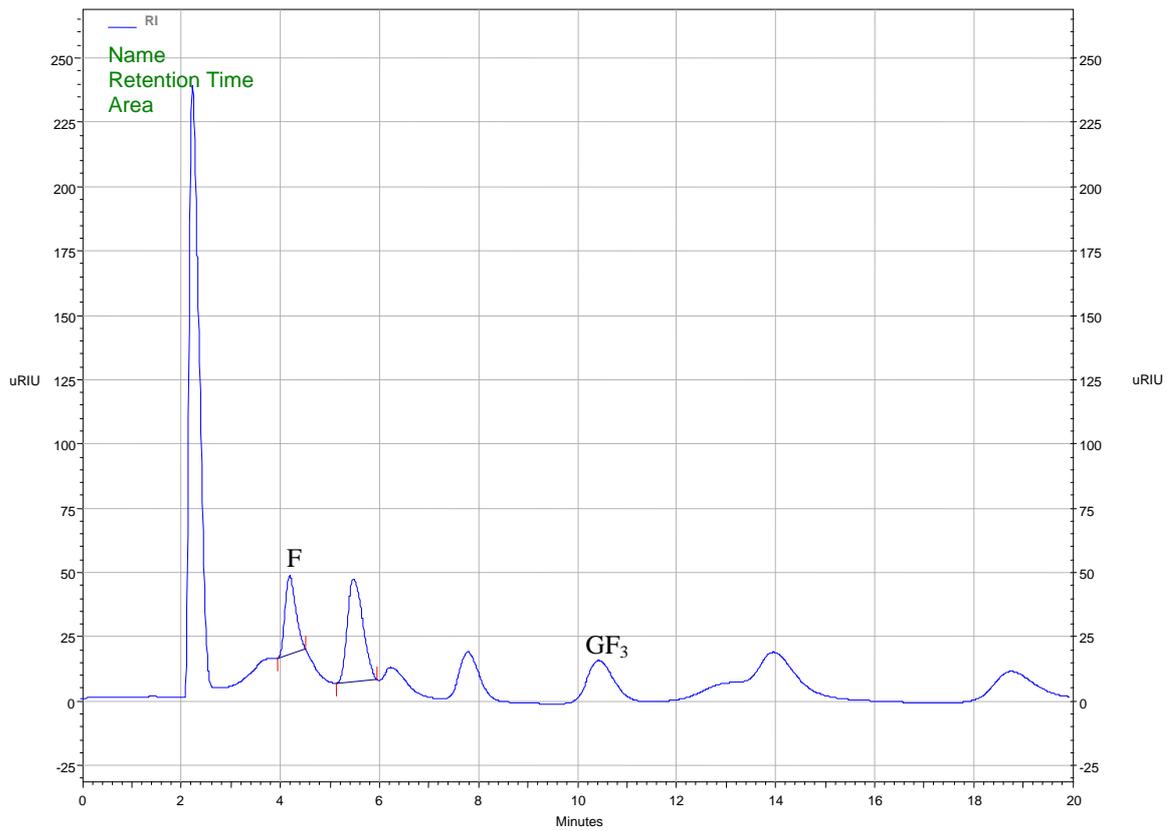


Figura 34: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) quando imobilizada em celite em meio aquoso.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

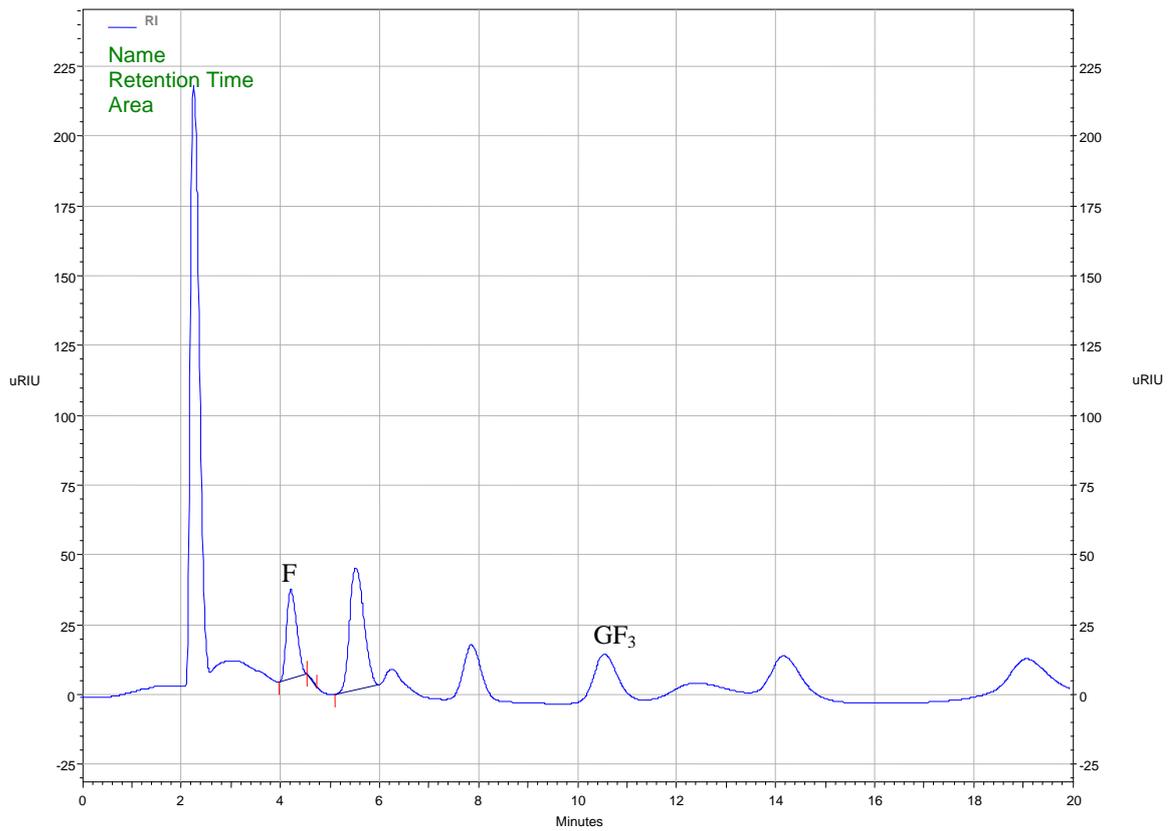


Figura 35: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) quando imobilizada em celite em meio orgânico.
Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

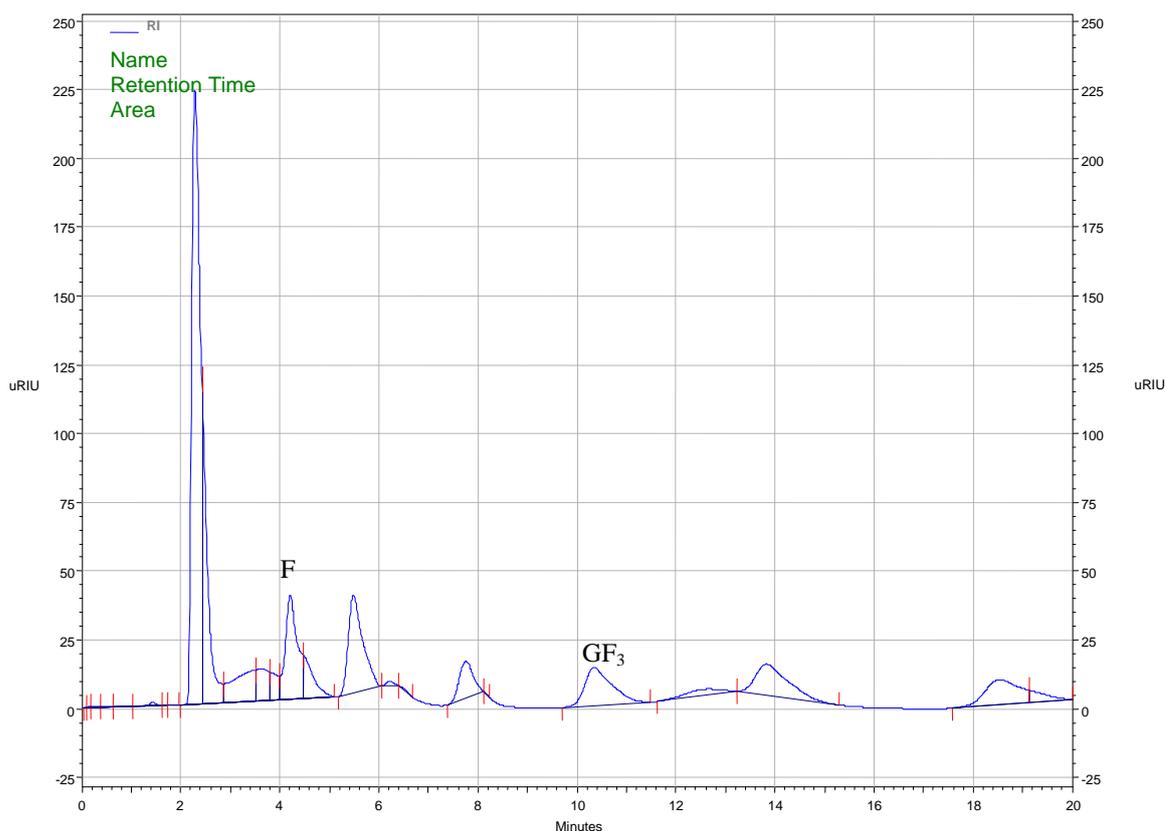


Figura 36: Produtos formados na síntese de FOS por hidrólise da inulina pela inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) quando imobilizada em Immobeads®.
 Legenda: (F) frutose e (GF₃) nistose.

5.2.2.2 Análise quantitativa

As análises quantitativas dos FOS 1-questose e nistose foram realizadas com auxílio do planejamento experimental Doehlert, quantificando-se o produto formado na hidrólise de inulina por inulinase imobilizada em celite em meio aquoso (acetona). O planejamento experimental foi construído obtendo-se as variáveis para concentração de substrato inulina (5, 10, 15, 20 e 25%, p/v) e tempo de reação (8, 16 e 24 h).

Analisando-se os produtos obtidos na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604), obteve-se os resultados da Tabela 12. Observou-se que a maior concentração de 1-questose foi obtida no ponto E5, com inulina a 25% e tempo de reação de 16 h.

Tabela 12: Planejamento Doehlert para otimização da produção de 1-questose na hidrólise de inulina por inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

Experimento	Concentração de Inulina (% p/v)	Tempo de Reação (h)	Concentração de FOS 1-questose (mg/mL)
E1	10 (-0,5)	24 (+0,866)	190,7416
E2	20 (+0,5)	24 (+0,866)	446,8315
E3	5 (-1,0)	16 (0,0)	102,4196
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	308,6324
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	310,7471
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	341,1356
E5	25 (+1)	16 (0,0)	520,5533
E6	10 (-0,5)	8 (-0,866)	179,4635
E7	20 (+0,5)	8 (-0,866)	343,1464

Com auxílio do programa *Statistica*, versão 7.0 obteve-se os gráficos de superfície de resposta (Figura 37) e de área (Figura 38), nos quais se pode observar a influência da concentração das variáveis independentes.

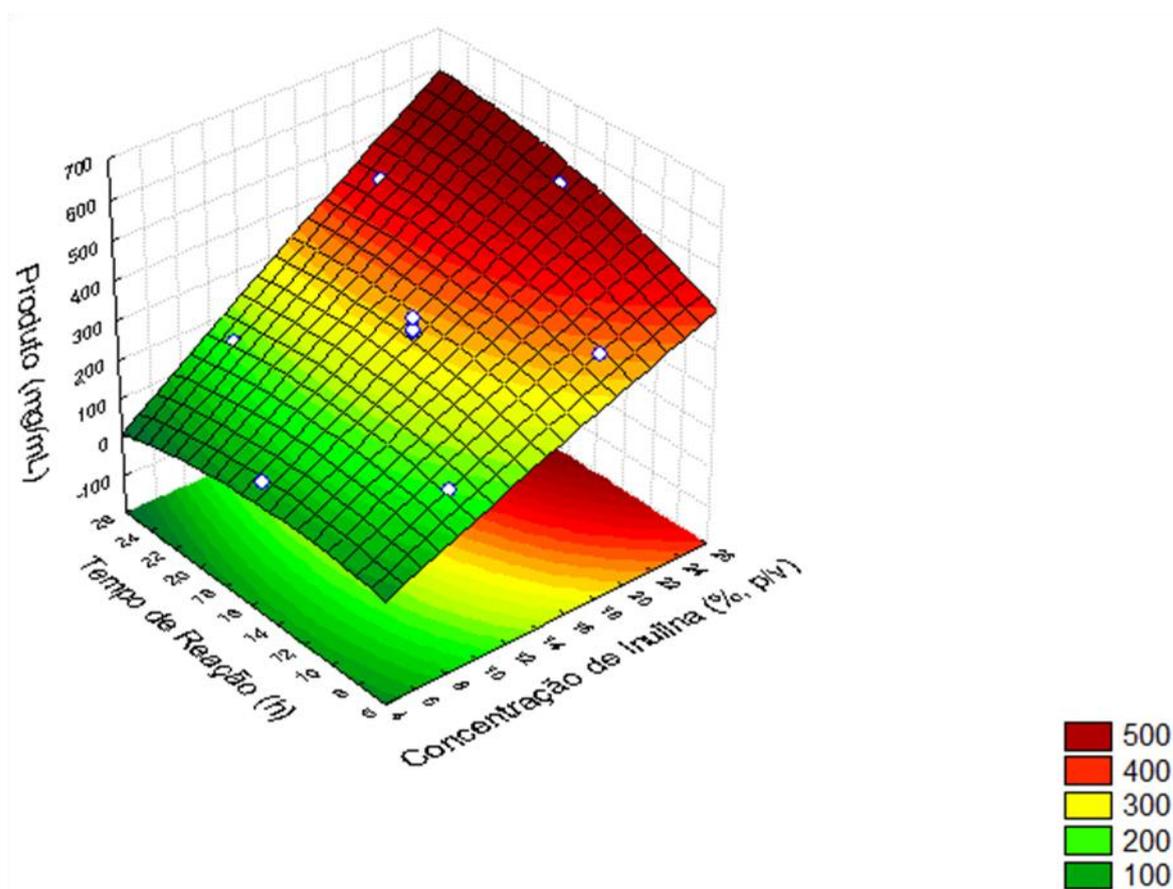


Figura 37: Gráfico de superfície de resposta na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

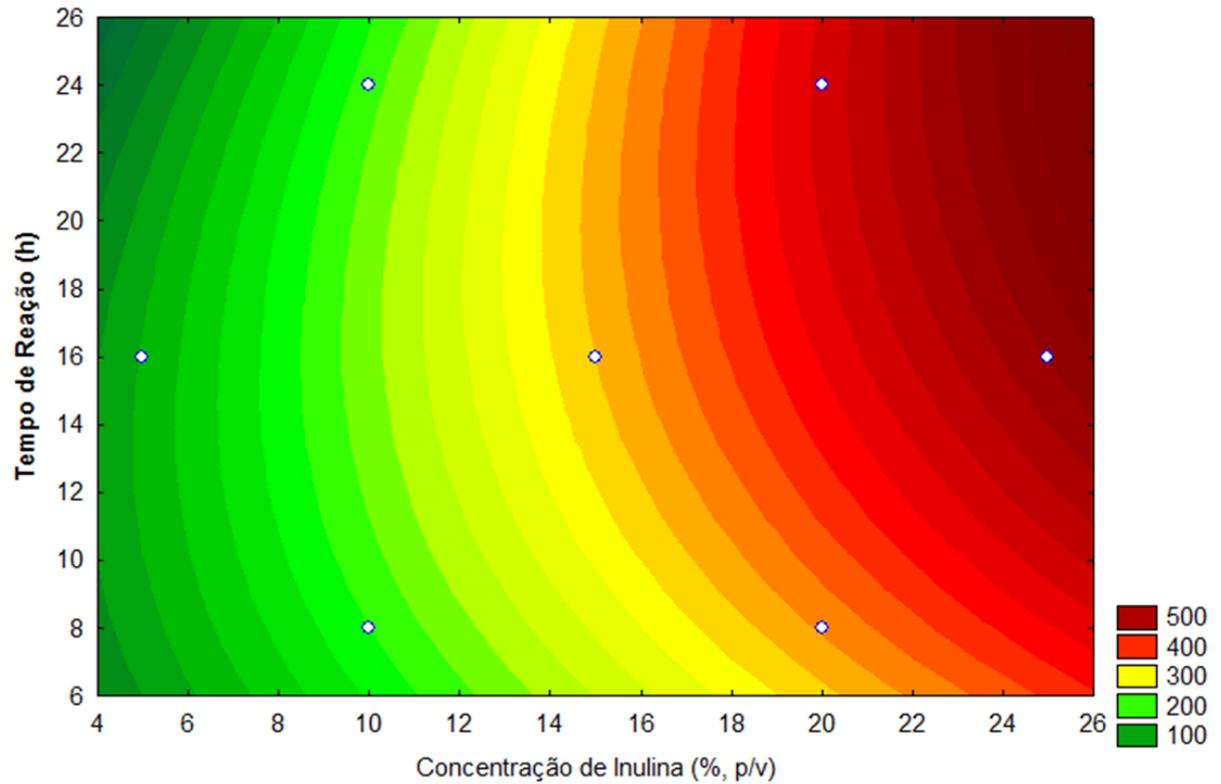


Figura 38: Gráfico de superfície de área na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

O gráfico de Pareto (Figura 39) demonstra a influência das variáveis em estudo sobre as respostas obtidas, sendo os efeitos padronizados em $p = 0,05$ considerados significativos.

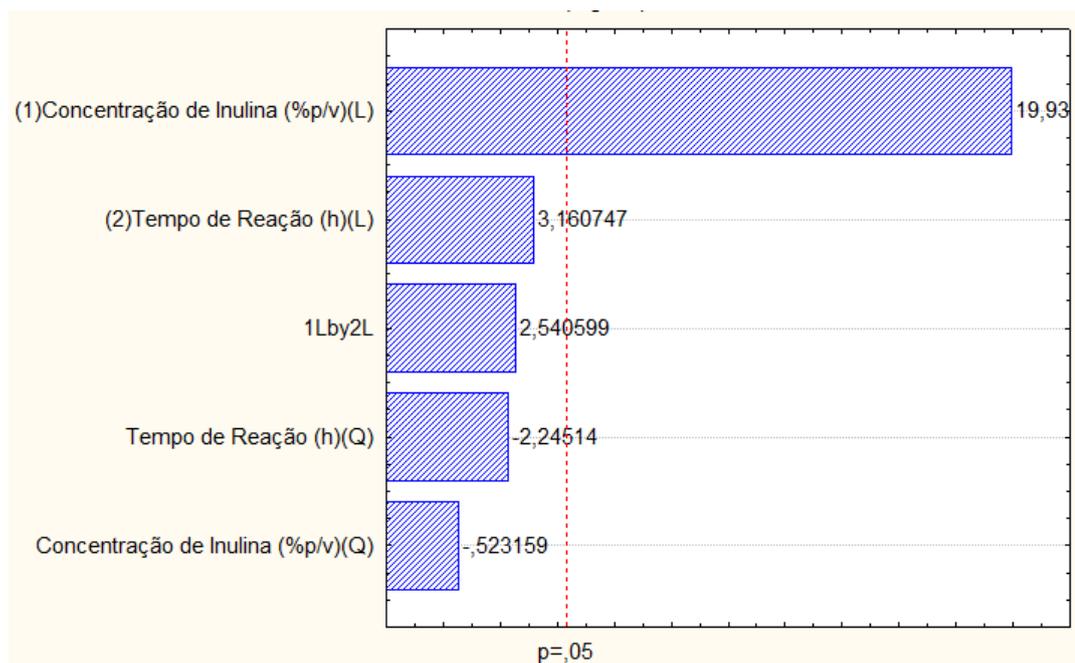


Figura 39: Gráfico de Pareto da produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

A análise de variância encontrada para otimização da produção do FOS 1-questose é observada na Tabela 13, tendo obtido-se valor de F igual a 125,62, valor maior que o tabelado (9,01), sendo o R² de 0,99525.

Tabela 13: Análise da variância na produção do FOS 1-questose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa*.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	138577,690690	5	27715,53814	125,6155043	9,01
Resíduo	661,913630	3	220,6378765		
Falta de ajuste	0,4	1	0,4	0,001353952	0,000399
Puro erro	661,5	2	330,7		
SQ total	139239,6	8			

Legenda: SQ = Soma quadrática; GL = Graus de liberdade; e MQ = Média quadrática.

A Equação 5 obtida ilustra a relação destas duas variáveis e a atividade da enzima (UA), onde 1Q é a resposta obtida (concentração de 1-questose em mg/mL) CI é Concentração de Inulina em % (p/v) e TR é o Tempo de Reação em horas.

$$1Q = -44,06978 + 14,29888 \times (CI) - 0,08685 \times (CI)^2 + 8,90675 \times (TR) - 0,43679 \times (TR)^2 + 0,57754 \times (CI) \times (TR) \quad (\text{Equação 5})$$

Na síntese do FOS nistose por inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa*, com a enzima imobilizada em celite em meio orgânico (acetona), obteve-se os resultados da Tabela 14. Analisando-se os resultados, observou-se que as maiores concentrações de nistose foram obtidas nas amostras cuja concentração de inulina foi de 25% (p/v), com tempo de reação de 16 h.

Tabela 14: Planejamento Doehlert para otimização da produção de nistose na hidrólise de inulina por inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

Experimento	Concentração de Inulina (% p/v)	Tempo de Reação (h)	Concentração de FOS nistose (mg/mL)
E1	10 (-0,5)	24 (+0,866)	3,787388
E2	20 (+0,5)	24 (+0,866)	8,056379
E3	5 (-1,0)	16 (0,0)	2,130488
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	6,204792
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	5,81299
E4	15 (0,0)	16 (0,0)	5,635186
E5	25 (+1)	16 (0,0)	9,497364
E6	10 (-0,5)	8 (-0,866)	3,288896
E7	20 (+0,5)	8 (-0,866)	6,448865

Nas Figuras 40 e 41, mostram-se os gráficos de superfície de resposta e de área, respectivamente, sendo demonstrado na Figura 42 o gráfico de Pareto, no qual se pode observar a influência da concentração das variáveis independentes nas respostas obtidas.

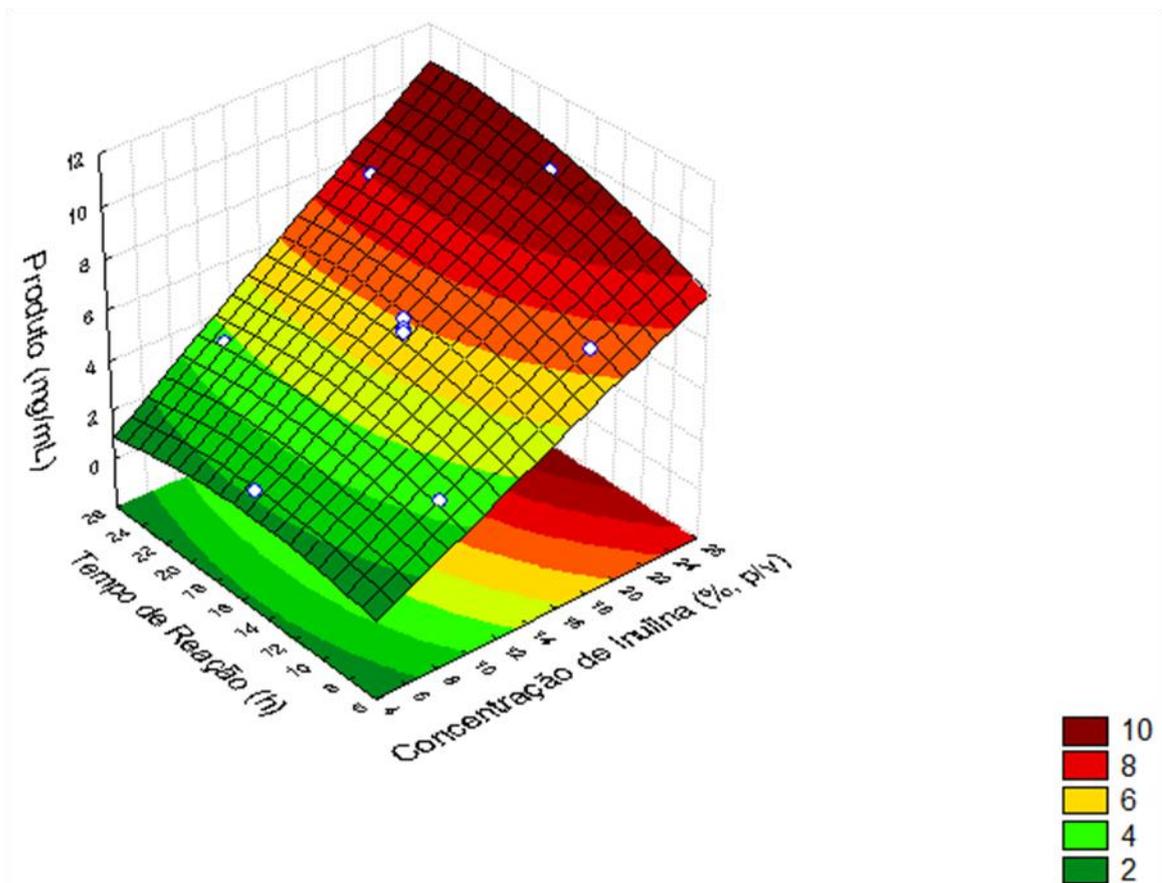


Figura 40: Gráfico de superfície de resposta da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

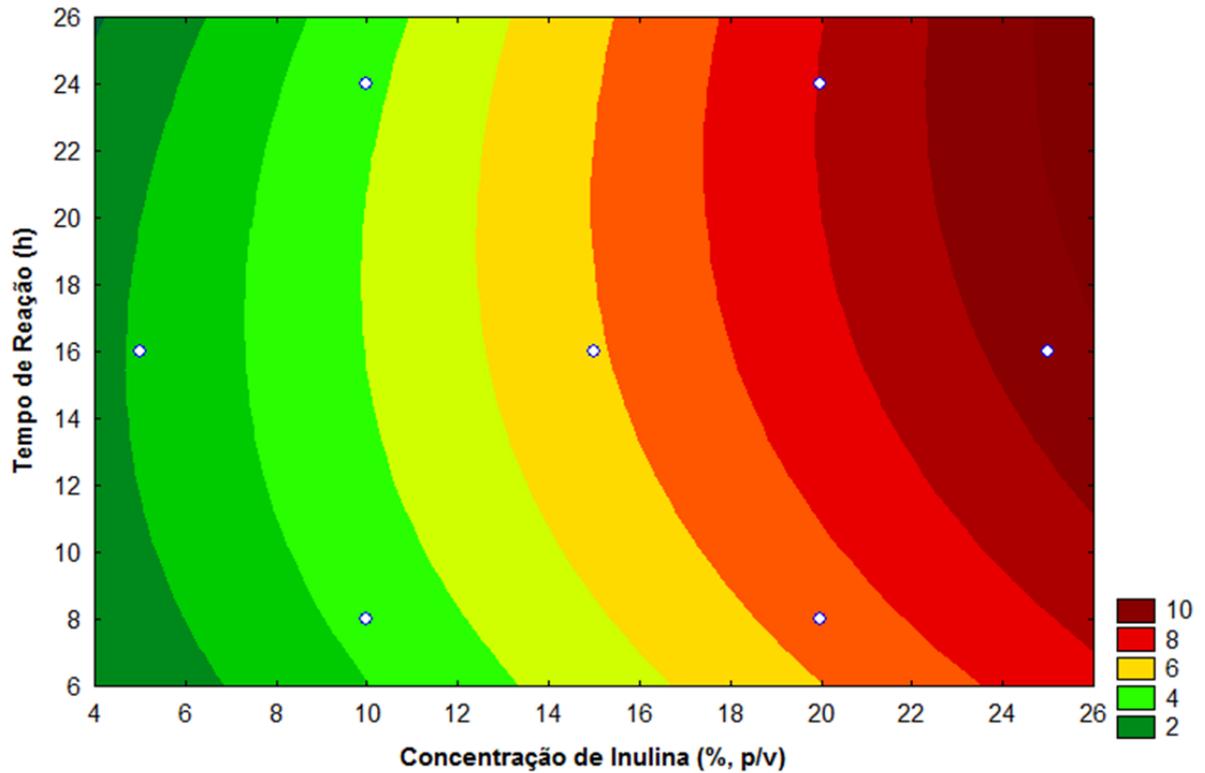


Figura 41: Gráfico de superfície de área na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

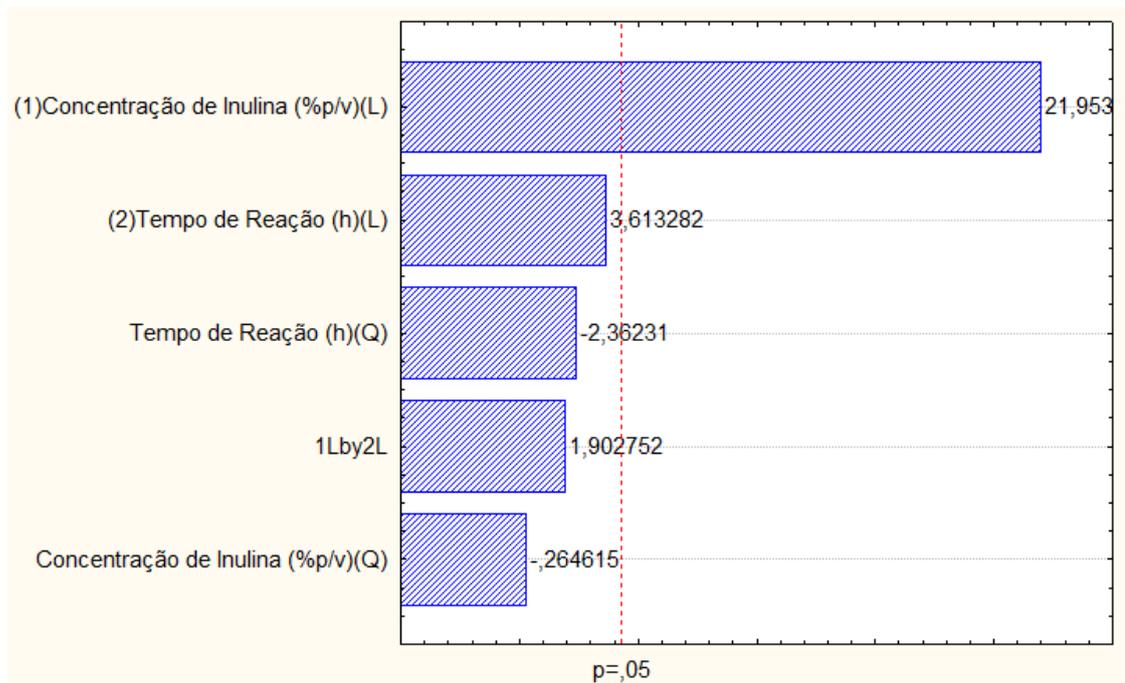


Figura 42: Gráfico de Pareto da produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

Na análise de variância, obteve-se F calculado de 150,70 e R^2 de 0,99603, demonstrando que o modelo está bem adequado às respostas obtidas (Tabela 15).

Tabela 15: Análise da variância na produção do FOS nistose pela hidrólise de inulina por inulinase imobilizada de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	42,826222	5	8,565244437	150,7078654	9,01
Resíduo	0,170500	3	0,056833427		
Falta de ajuste	0,00064	1	0,00064	0,00756396	0,000399
Puro erro	0,16986	2	0,08493		
SQ total	42,99672	8			

Legenda: SQ = Soma quadrática; GL = Graus de liberdade; e MQ = Média quadrática.

A relação entre as duas variáveis e a resposta é descrita na Equação 6, onde N é a resposta obtida (concentração de nistose em mg/mL) CI é Concentração de Inulina em % (p/v) e TR é o Tempo de Reação em horas.

$$N = -1,08958 + 0,27959 \times (CI) - 0,00070 \times (CI)^2 + 0,19751 \times (TR) - 0,00736 \times (TR)^2 + 0,00693 \times (CI) (TR) \quad (\text{Equação 6})$$

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 IMOBILIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE FRUTOSE

6.1.1 Produção de frutose pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306)

A imobilização da inulinase em casca de ovo branco de galinha foi realizada utilizando-se duas técnicas de imobilização: a imobilização por adsorção e a imobilização por ligação covalente cruzada. O método de imobilização por adsorção ocorre através de ligações eletrostáticas estabelecidas entre grupamentos de cargas opostas presentes nas moléculas da enzima e do suporte. Essa interação ocorre entre os grupamentos amino residuais na molécula da enzima e grupamentos funcionais nas moléculas do suporte, sendo consideradas interações fracas por serem rompidas com facilidade, uma vez que ocorrem por interações iônicas, interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, entre outras.

De acordo Nighojkar *et al* (1995), a casca de ovo é um resíduo biológico de alta disponibilidade que não sofre contaminação por micro-organismos e possui boa resistência mecânica o que proporciona a aplicação da mesma em processos industriais.

Avaliando-se os resultados encontrados para imobilização por adsorção da enzima ao suporte casca de ovo, observou-se, ao comparar a atividade da enzima imobilizada com a atividade da enzima livre, que houve uma maior atividade da inulinase produzida por CCMB 306 quando imobilizada, sendo a atividade enzimática da enzima imobilizada em casca de ovo de 1,18 UA e a atividade da enzima livre 0,27 UA (Figura 9), com taxa de imobilização de 3,17 UA/g de suporte(Figura 11).

Em relação a dosagem de proteína total (Figura 10) que foi imobilizada em casca de ovo por adsorção, encontrou-se 0,033 mg/mL de proteína total para enzima inulinase livre produzida por CCMB 306 e 0,024 mg/mL para o sobrenadante de imobilização, estimando-se que a quantidade de proteína total que se ligou ao suporte foi de 0,008 mg/mL, o que indica que, embora tenha ocorrido uma melhor atividade da enzima quando imobilizada, houve baixa ligação da mesma ao suporte.

Essa melhora na atividade enzimática pode ser explicada, segundo Dalla-Vecchia *et al* (2004), devido a adsorção da inulinase ao suporte possuir caráter iônico, não envolvendo ligações químicas que possam causar distorções no sítio ativo da enzima e favorecendo,

assim, a manutenção de uma conformação que seja favorável a ligação do substrato ao catalisador.

Na imobilização por ligação covalente cruzada, realizou-se a adsorção da enzima inulinase em casca de ovo seguida pela adição do reagente glutaraldeído, formando o complexo suporte-enzima-reagente. Avaliando-se os resultados, observou-se que a atividade encontrada (Figura 9) para enzima imobilizada foi de 0,96 UA, apresentando maior atividade que a enzima livre (0,27 UA) e menor atividade que a enzima imobilizada em casca de ovo por adsorção, com taxa de imobilização (Figura 11) de 2,40 UA/g.

Na imobilização com casca de ovo da pectinesterase, Nighojkar *et al* (1995) obteve resultados semelhantes, com atividade da pectinesterase imobilizada na casca de ovo de 93 UA e atividade de 70 UA para pectinesterase imobilizada em casca de ovo com glutaraldeído, ocorrendo ambas reações em pH 7,0.

Segundo Vieira (2009), esse resultado pode ser justificado devido a presença do glutaraldeído promover restrição de mobilidade da enzima, causada pela ligação ao suporte, e impedimento estérico, uma vez que possui uma molécula volumosa que pode limitar o acesso da enzima ao substrato, dificultando a ligação entre ambos. Além disso, o glutaraldeído, sendo altamente reativo, pode polimerizar sobre a superfície do suporte, dificultando a difusão do substrato no meio e sua ligação à enzima.

Quando observamos a dosagem de proteína total (Figura 10), observa-se que a concentração de proteína no sobrenadante foi nula, estimando-se que toda proteína presente na amostra enzimática solúvel ligou-se ao suporte. No entanto, esse fato pode ocorrer devido desnaturação da proteína presente no sobrenadante que não se ligou ao suporte.

Na imobilização por adsorção em celite, utilizou-se como meio de imobilização tampão acetato (meio aquoso) e acetona (meio orgânico), sendo a maior atividade obtida quando realizada imobilização em meio orgânico, como observado na Figura 9, obtendo-se atividade da enzima imobilizada de 1,64 UA para inulinase em meio orgânico, maior atividade encontrada para inulinase imobilizada, e 0,77 UA em meio aquoso, sendo ambas as atividades maiores que a encontrada para enzima livre (0,27 UA).

Esse resultado pode ser justificado devido a acetona conferir carga a grupamentos ionizáveis da enzima, aumentando o acoplamento da mesma ao suporte. Esse acoplamento promove maior rigidez na molécula, impedindo mudanças no sítio ativo que possam prejudicar a ligação do mesmo ao substrato. Outro fator importante é a partição no meio, uma vez que o suporte pode afetar a partição do substrato e dos produtos na mistura reacional. Por possuir caráter apolar, a adesão da celite a água é baixa, o que pode permitir que as moléculas

de água tenham maior adesão ao substrato, de natureza polar, e realize a reação de hidrólise para formação dos produtos. No entanto, em meio aquoso, pode ocorrer agregação da enzima, devido sua natureza hidrofílica, impedindo o acesso do substrato ao sítio ativo. Quando é adicionado ao meio um solvente orgânico, há diminuição dessa agregação devido à natureza hidrofóbica do solvente, favorecendo a atividade catalítica da inulinase (PACE *et al*, 2010).

Em relação a dosagem de proteína (Figura 10), tanto as amostras em meio aquoso quanto as em meio orgânico demonstraram que houve baixa ligação de enzima ao suporte, sendo a concentração de proteína estimada de 0,0015 mg/mL e 0,0012 mg/mL, respectivamente.

A imobilização da inulinase em Immobeads® foi realizada em meio aquoso, utilizando-se tampão acetato, por adsorção da enzima ao suporte. Os Immobeads® são macroporos de matriz polimérica esféricas de acrílico, tendo na sua superfície uma densa monocamada de grupos epóxidos reativos e estáveis, os quais se ligam a diferentes resíduos de aminoácidos na enzima de forma estável sob brandas condições experimentais (PERALTA, 2010). Na imobilização realizada, obteve-se 0,54 UA de atividade, com taxa de imobilização de 11,85 UA/g.

De acordo Peralta (2010), esse fato pode ser explicado devido à imobilização em Immobeads® promover interações que podem perturbar as forças que mantêm a estrutura nativa da enzima, levando a alterações na estrutura e função da mesma. No entanto, a enzima normalmente adota uma conformação estabilizada pela interação com o suporte. Caso a nova conformação induzida se assemelhe a sua estrutura nativa, a enzima imobilizada poderá desempenhar sua ação catalítica e essa estabilidade conformacional pode aumentar a atividade da enzima frente ao substrato. Caso essa nova conformação não seja semelhante à conformação ativa da enzima, a mesma terá sua atividade reduzida ou até mesmo será inativada.

A imobilização com Sepabeads® EC-OD foi realizada por duas técnicas: ligação covalente e ligação covalente cruzada, sendo utilizado em ambas glutaraldeído como reagente ativante/reticulante. Observando-se os resultados da inulinase de CCMB 306 imobilizada em Sepabeads®, nota-se que, em comparação com a enzima livre, ocorreu uma maior atividade quando realizada a imobilização por ligação covalente e uma menor atividade quando realizada a imobilização por ligação covalente cruzada, sendo as atividades obtidas de 0,37 UA e 0,14 UA, respectivamente, com taxas de imobilização de 0,74 UA/g e 0,70 UA/g.

Semelhante a imobilização com casca de ovo, a imobilização de inulinase com Sepabeads® por ligação cruzada pode diminuir a interação da enzima com o substrato, devido

a possível polimerização do glutaraldeído na superfície da enzima. A menor atividade da enzima quando imobilizada em Sepabeads® também pode ser explicada pelo fato desse polímero possuir uma molécula com grupamentos volumosos, podendo prejudicar a aproximação do substrato a enzima e, assim, o desencadeamento da sua atividade catalítica (PERALTA, 2010; SANTOS, 2010).

Em relação a quantidade de proteína (Figura 10) ligada aos suportes de polímeros de acrílico Immobeads® e Sepabeads®, observou-se que houve baixa ligação da enzima ao suporte devido a alta concentração de proteína total encontrado no sobrenadante de imobilização, estimando-se que de 0,0326 mg/mL de proteína total na enzima livre, 0,0081 mg/mL foi imobilizada em Immobeads®, 0,0064 mg/mL foi imobilizada em Sepabeads por ligação covalente cruzada e apenas 0,0002 mg/mL foi imobilizada em Sepabeads por ligação covalente.

A imobilização em sílica foi realizada por ligação covalente, ativando-se os grupamentos reativos do suporte com glutaraldeído, uma vez que o mesmo tem capacidade de ativar grupos funcionais no suporte e promover ligação desses à grupamentos amino na superfície da enzima. A atividade enzimática imobilizada foi de 0,62 UA, com taxa de imobilização de 6,16 UA/g, e concentração estimada de proteína imobilizada de 0,0178 mg/mL.

6.1.2 Produção de frutose pela hidrólise de inulina produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604)

A imobilização da inulinase em casca de ovo branco de galinha foi realizada utilizando-se duas técnicas de imobilização: a imobilização por adsorção e a imobilização por ligação covalente cruzada. Avaliando-se os resultados encontrados para imobilização por adsorção da enzima ao suporte casca de ovo, observou-se, ao comparar a atividade da enzima imobilizada com a atividade da enzima livre (Figura 12), uma menor atividade para enzima imobilizada, sendo encontrada 1,66 UA para enzima imobilizada em casca de ovo por adsorção e 2,69 UA para enzima livre, com taxa de imobilização de 4,16 UA/g (Figura 14). Esse fato pode ser justificado pela possível deformação da conformação do sítio ativo da enzima ao ligar-se ao suporte, diminuindo a sua capacidade catalítica. Além disso, o volume de suporte ao redor da enzima pode provocar um impedimento estérico, evitando que o substrato chegue ao sítio catalítico e realize a reação (SANTOS, 2010).

Em relação a dosagem de proteína total (Figura 13) que foi imobilizada em casca de ovo por adsorção, encontrou-se 0,036 mg/mL para inulinase livre e 0,030 mg/mL para o sobrenadante, estimando-se que a quantidade de proteína imobilizada foi de 0,006 mg/mL. Uma vez que a dosagem de proteína do sobrenadante de imobilização teve um valor próximo a dosagem de proteína total da enzima livre, pode-se concluir que não houve boa ligação da enzima ao suporte, permanecendo a maior parte da concentração total de proteína livre.

Na imobilização por ligação covalente cruzada, realizou-se a adsorção da enzima inulinase em casca de ovo seguida pela adição do reagente glutaraldeído, formando o complexo suporte-enzima-reagente. Na imobilização por ligação covalente cruzada, o glutaraldeído é empregado como reagente reticulante, a fim de facilitar a ligação da enzima ao suporte, pois o mesmo promove a formação de ligações covalentes cruzadas em grupos reativos na superfície da enzima como grupos da molécula de glutaraldeído, resultando em estabilização da enzima devido restrição da mobilidade de sua superfície, e a criação de uma barreira resistente ao ataque de substâncias presentes no meio reacional, facilitando a imobilização e evitando a dessorção da enzima, uma vez que a interação por adsorção é formada por interações não covalentes fracas, facilmente rompidas. Dessa forma, a ligação covalente cruzada na imobilização tende a melhorar a estabilidade da enzima imobilizada (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; SANTOS, 2010; VIEIRA, 2009).

Avaliando-se os resultados, observa-se que a atividade encontrada foi de 0,97 UA (Figura 12), sendo a taxa de imobilização 2,49 UA/g (Figura 14). Comparando-se com a atividade das enzimas livres, observou-se que houve uma menor atividade para enzima inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604) imobilizada. Quando observamos a dosagem de proteína total (Figura 13), observa-se que a concentração de proteína no sobrenadante foi nula para inulinase de ambos os micro-organismos, estimando-se que toda proteína presente na amostra enzimática livre ligou-se ao suporte.

Na imobilização por adsorção em celite, utilizou-se como meio de imobilização tampão acetato (meio aquoso) e acetona (meio orgânico), sendo observada maior atividade quando realizada imobilização em meio orgânico, obtendo-se atividade da enzima imobilizada de 1,81 UA (Figura 12), com taxa de imobilização de 3,70 UA/g (Figura 14). Em relação a dosagem de proteína (Figura 13), houve boa ligação ao suporte, sendo estimada que 0,012 mg/mL de proteína foi imobilizada em meio aquoso e 0,015 mg/mL foi imobilizada em meio orgânico.

A imobilização da inulinase em Immobeads® foi realizada em meio aquoso, utilizando-se tampão acetato, por adsorção da enzima ao suporte, obtendo-se 0,45 UA de atividade (Figura 12) e taxa de imobilização de 8,73 UA/g (Figura 14).

Na imobilização com Sepabeads® EC-OD foi realizada por duas técnicas: ligação covalente e ligação covalente cruzada, sendo utilizado em ambas glutaraldeído como reagente ativante/reticulante, obtendo-se 0,34 UA para imobilização por ligação covalente e 0,03 UA na imobilização por ligação covalente cruzada (Figura 12), com taxas de imobilização (Figura 14) de 0,69 UA/g e 0,16 UA/g, respectivamente. Observando-se os resultados das amostras imobilizadas em Immobeads® e Sepabeads®, nota-se que nas mesmas foram encontradas as menores atividades para inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604).

Esse fato pode ser explicado devido ocorrerem durante o processo de imobilização interações que podem perturbar as forças que mantêm a estrutura nativa da enzima, levando a alterações na estrutura e função da mesma. Caso a nova conformação induzida se assemelhe a estrutura nativa da enzima, a enzima imobilizada poderá desempenhar sua ação catalítica e essa estabilidade conformacional pode aumentar a atividade da enzima frente ao substrato. Caso essa nova conformação não seja semelhante a conformação ativa da enzima, a mesma terá sua atividade reduzida ou até mesmo inativada (PERALTA, 2010).

Além disso, pode haver restrição de mobilidade da enzima causada pela ligação ao suporte ou impedimento estérico causado pelos grupamentos presentes nas moléculas dos suportes de acrílico, limitando o acesso do substrato a enzima. No caso da imobilização com Sepabeads®, essa menor atividade enzimática pode ser provocada também pela presença do glutaraldeído, uma vez que o mesmo pode polimerizar sobre a superfície do suporte, dificultando a difusão do substrato e ligação do mesmo à enzima (DALLA-VECCHIA *et al*, 2004; PERALTA, 2010).

Em relação à quantidade de proteína (Figura 13), a concentração de proteína nos sobrenadantes de imobilização para inulinase imobilizada em Immobeads® e Sepabeads® foi nula, estimando-se que toda proteína presente na amostra enzimática ligou-se ao suporte.

A imobilização em suporte sílica foi realizada por ligação covalente, ativando-se os grupamentos reativos do suporte com glutaraldeído, uma vez que o mesmo tem capacidade de ativar grupos funcionais no suporte e promover ligação desses à grupamentos amino na superfície da enzima. Na imobilização da inulinase de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604), obteve-se atividade de 0,61 UA (Figura 12), com taxa de imobilização de 6,59 UA/g (Figura 14) e concentração estimada de proteína imobilizada de 0,013 mg/mL (Figura 13).

6.2 PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

6.2.1 Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306)

A síntese de fruto-oligossacarídeos (FOS) foi realizada através da hidrólise enzimática de inulina por inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306), identificando-se os FOS produzidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se como padrão frutose (F) e os FOS 1-questose (GF₂) e nistose (GF₃). A frutose foi utilizada para identificar a mesma no cromatograma, uma vez que é o monossacarídeo de maior formação na hidrólise da inulina por inulinase.

A hidrólise da inulina foi realizada pela inulinase livre em seu extrato bruto e pela inulinase imobilizada em diferentes suportes sólidos, sendo utilizado como suporte de imobilização casca de ovo, celite e Immobeads®. A imobilização em casca de ovo foi realizada por dois métodos: adsorção e ligação covalente cruzada com glutaraldeído.

A imobilização com celite foi realizada pelo método de adsorção, utilizando-se como meio reacional tampão acetato (meio aquoso) e acetona (meio orgânico). A imobilização com Immobeads®, por sua vez, foi realizada por adsorção em meio aquoso utilizando tampão acetato.

Observando-se os perfis cromatográficos obtidos por CLAE, e analisando os mesmos por comparação com os perfis cromatográficos dos padrões utilizados, verificou-se que houve síntese de frutose e nistose em todas as amostras analisadas. Em relação a 1-questose, foi observada síntese apenas nas amostras na qual a hidrólise foi realizada pela inulinase imobilizada em celite em meio orgânico (Figura 22). Dessa forma, realizou-se a quantificação dos FOS formados pela hidrólise da inulina por inulinase imobilizada em celite em meio orgânico.

Para realizar a quantificação dos FOS, foi construído um planejamento experimental Doehlert para duas variáveis, sendo estudados a variação da concentração de substrato inulina (5, 10, 15, 20 e 25%, p/v) e o tempo de reação (8, 16 e 24 h). Após realização da hidrólise, foram analisados os produtos formados através de CLAE, construindo-se curvas padrão para 1-questose (Anexo A) e nistose (Anexo B).

Foi observada a formação de 1-questose e nistose em todos os pontos do planejamento (Tabela 8), sendo a maior concentração encontrada no ponto no qual a concentração de inulina foi de 25% (p/v) e o tempo de reação foi de 16 h (Figura 24). Nesse ponto, obteve-se a

concentração de 631 mg/mL de 1-questose e 10,15 mg/mL de nistose. Analisando o gráfico de Pareto da Figura 27, observa-se que houve maior influência da concentração de inulina em relação ao tempo de reação na síntese de 1-questose por inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306), sendo observado que a menor concentração de produtos ocorreu no ponto no qual a concentração de inulina foi 5% (menor concentração aplicada no planejamento experimental).

A influência da concentração do substrato no meio reacional é explicada devido a quantidade de produto formado ser diretamente proporcional a quantidade de substrato no meio. Assim, quanto maior a concentração de inulina, maior a concentração de FOS formadas (SILVA-SANTISTEBAN, 2006). No entanto, uma vez que a inulina pode formar microcristais em temperaturas brandas, é necessário que a análise dos produtos seja realizada prontamente após a reação, evitando-se, assim, que o substrato não hidrolisado precipite durante a análise na coluna cromatográfica, fato esse que pode prejudicar a corrida das amostras na coluna e, assim, o tempo de retenção das mesmas durante análise.

A análise de variância da Tabela 9 compara a variação devido à mudança dos níveis das variáveis com a variação randômica inerente ao próprio sistema, possibilitando a avaliação da significância estatística da regressão, que pode ser avaliada pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática do resíduo e por comparação dessas fontes de variação usando a distribuição de Fisher (Teste F) e levando-se em consideração os respectivos graus de liberdade.

Para que um resultado seja estatisticamente significativo, esta razão deve ser maior que o valor tabelado para F, sendo obtido na síntese de 1-questose por inulinase de CCMB 306 F calculado igual a 258,12, valor maior que o tabelado (9,01), e o R^2 igual a 0,99768, demonstrando que o modelo está ajustado as respostas obtidas.

Na síntese de nistose pela hidrólise da inulina por inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306), pela análise do gráfico de Pareto da Figura 30 que houve influência apenas da concentração de substrato nas respostas obtidas, sendo o F calculado de 219,50 e R^2 de 0,99727, indicando que o modelo está ajustado as respostas obtidas.

6.2.2 Produção de fruto-oligossacarídeos pela hidrólise de inulina por inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604)

Na síntese de fruto-oligossacarídeos por inulinase produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604), observou-se a produção de FOS pela análise dos produtos obtidos na hidrólise de inulina por inulinase livre e inulinase imobilizada em casca de ovo, casca de

ovo ativado com glutaraldeído, celite em meio aquoso, celite em meio orgânico e Immobeads®, identificando-se os FOS produzidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para análise qualitativa e identificação dos produtos formados, utilizou-se como padrão frutose (F) e os FOS 1-questose (GF₂) e nistose (GF₃).

Observando-se os perfis cromatográficos obtidos por CLAE, e analisando-os, comparando-os com perfis cromatográficos dos padrões utilizados, verificou-se que houve síntese de frutose e nistose em todas as amostras analisadas, não sendo observada presença de 1-questose nas amostras avaliadas.

Realizou-se a quantificação dos produtos formados através do delineamento de um planejamento experimental Doehlert para duas variáveis, no qual foram estudados a variação da concentração de substrato inulina (5, 10, 15, 20 e 25%, p/v) e o tempo de reação (8, 16 e 24 h). Para analisar os resultados e quantificar os produtos, foram construídas curvas padrão de 1-questose (Anexo A) e nistose (Anexo B).

A hidrólise da inulina foi realizada por inulinase imobilizada em celite em meio orgânico, uma vez que as amostras de inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) imobilizadas nesse suporte apresentaram produção de ambos os FOS estudados.

Analisando-se quantitativamente os resultados obtidos com o planejamento delineado na Tabela 12, observou-se que houve formação dos FOS de interesse em todos os níveis das variáveis em estudo, sendo a concentração de 1-questose e nistose mais altas nas amostras cuja concentração de inulina foi de 25% e o tempo de reação foi 16 h. Nesse ponto, obteve-se a concentração de 520 mg/mL de 1-questose e 9,49 mg/mL de nistose. Analisando o gráfico de Pareto da Figura 39, observa-se que houve influência da concentração de inulina, não sendo observada influência da variável tempo de reação na síntese de 1-questose por inulinase de CCMB 604.

A influência da concentração do substrato no meio reacional é importante na síntese de FOS uma vez que quanto maior a concentração de inulina, maior a concentração de FOS formado, sendo observado que a menor concentração de produtos ocorreu no ponto no qual a concentração de inulina foi 5% (menor concentração aplicada no planejamento experimental).

A análise de variância na Tabela 13 indica que o modelo está bem ajustado as respostas obtidas, tendo valor de F igual a 125,62, valor maior que o tabelado (9,01), e R² de 0,99525.

Na síntese de nistose pela hidrólise da inulina por inulinase de CCMB 604, pela análise do gráfico de Pareto da Figura 42, observa-se que houve influência apenas da

concentração de substrato nas respostas obtidas. Observando-se a Tabela 15, verifica-se que o modelo está bem ajustado as respostas obtidas, sendo F calculado de 150,70 e R^2 de 0,99603.

7 CONCLUSÃO

As enzimas inulinases podem ser aplicadas em processos industriais, como na produção de frutose, obtida a partir da hidrólise do polissacarídeo inulina por exoinulinases, e de fruto-oligossacarídeos, obtidos pela hidrólise da inulina por endoinulinases.

No entanto, como as enzimas podem sofrer redução de sua atividade ou inativação devido a fatores relativos ao meio no qual ocorre a reação, a imobilização de enzimas em suportes sólidos torna-se um método viável para promover maior estabilidade a enzima inulinase e, assim, aplicá-la na produção de frutose e fruto-oligossacarídeos.

A imobilização de inulinase em diferentes suportes sólidos demonstrou ser uma técnica viável, uma vez que não inativou a inulinase, uma vez que a mesma exibiu atividade em todas as amostras analisadas.

No entanto, houve uma melhor resposta nas amostras contendo inulinase produzida por *Pseudozyma sp.* (CCMB 306), nas quais foram observadas maiores atividades da enzima imobilizada em comparação a atividade da enzima livre, exceto para amostra contendo inulinase imobilizada em Sepabeads® por ligação covalente cruzada, na qual houve redução da atividade enzimática.

Em relação à síntese de frutose, observou-se que a maior concentração foi obtida para inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) quando imobilizada em celite em meio orgânico contendo acetona.

Na produção do fruto-oligossacarídeo (FOS), a imobilização demonstrou-se eficaz para ambas as inulinases de leveduras estudada, havendo identificação de nistose em todas as amostras estudadas. No caso da 1-questose, sua identificação foi observada apenas nas amostras com inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) imobilizada em celite em meio orgânico, sendo utilizada a enzima imobilizada por esse método na otimização da produção de FOS e análise quantitativa dos produtos encontrados.

Na otimização da inulinase de *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) e de *Rhodotorula mucilaginosa* (CCMB 604), imobilizadas em celite em meio orgânico, obteve-se maior concentração de produto formado nas amostras com concentração de inulina a 25% e tempo de reação de 16 h, sendo a maior quantidade obtida para inulinase de CCMB 306, com 631 mg/mL de 1-questose e 10,15 mg/mL de nistose.

Uma vez que foram observados valores satisfatórios de teste F e R², o modelo demonstrou está adequado ao fim obtido e o planejamento experimental mostrou-se eficiente,

podendo ser aplicado para diminuir a quantidade de experimentos a ser realizado em estudos de otimização e, conseqüentemente, diminuir o consumo de reagentes.

Dessa forma, torna-se viável a aplicação de enzimas inulinases imobilizadas em procedimentos de síntese de frutose e fruto-oligossacarídeos, sendo interessante a otimização dos métodos de imobilização e seleção adequada dos suportes a serem utilizados para obtenção de melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- APOLINÁRIO, A. C. *et al.* Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 101, p. 368– 378, 2014.
- ASTOLFI, V. **Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.
- BARREIROS, R. C. *et al.* Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 377-389, maio/jun. 2005.
- BAYRAKTAR, H. *et al.* Immobilization and stabilization of α -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 49, p. 855– 860, 2011.
- BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.
- CARVALHO, W. *et al.* Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, [S.l.], n. 23, p. 60-70, jun/jul 2006.
- CASTRO, H. F. *et al.* Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in a Nonaqueous System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S.l.], v. 76, n. 1, p. 147-152, 1999.
- CHAMPE, P. C; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- CHATTERJEE, U. *et al.* Goat Liver Catalase Immobilized on Various Solid Supports. **Journal Of Fermentation And Bioengineering**, [S.l.], v. 70, n. 6, p. 429-430, 1990.
- CHI, Z. M. *et al.* Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 102, p. 4295–4303, 2011.
- DALLA-VECCHIA, R. *et al.* Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DATTA, S. *et al.* Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotechnology**, [S.l.], v. 3, p. 1-9, 2013.
- DOEHLERT, D. H. **Applied Statistical Science**, [S.l.], v. 19, p. 231, 1970.
- EBERLIN, M. N. Avaliando a evolução: cósmica, química e biológica. Disponível em: <http://www.fomosplanejados.com.br/capitulos/assuntos/assunto_fullscreen.asp?codcapitulo=26&codassunto=67&numero=3>. Acesso em: 15 ago. 2014.

ESTELLER, M. S. Uso de açúcares em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, n. 4, p. 602-607, 2004.

GERN, R. M. *et al.* Utilização do extrato de chicória na produção de endo-inulinas por *Paenibacillus sp.* **Revista Saúde e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 73-76, nov. 2000.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, dez. 2002.

JESIONOWSKI, T. *et al.* Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, [S.l.], v. 20, p. 801–821, 2014.

KUHN, G. O. *et al.* Synthesis of Fructooligosaccharides from *Aspergillus niger* Commercial Inulinase Immobilized in Montmorillonite Pretreated in Pressurized Propane and LPG. **Appl Biochem Biotechnol**, [S.l.], v. 169, p. 750–760, 2013.

LEHNINGER, A. L. *et al.* **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEOPOLDO, P. T. G. **Estruturas tridimensionais e funções biológicas das proteínas fibrosas**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2010. Disponível em: <<http://dc312.4shared.com/doc/aM3YRXAt/preview.html>>. Acesso em: 08 jul. 2012.

LIMA, D. M. *et al.* Thermostable inulinases secreted by yeast and yeast-like strains from the Brazilian semi-arid region. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [S.l.], n. 1, p. 1-9, 2009.

LOURENÇO, C. M. **Desenvolvimento de Processo Contínuo de Obtenção de Frutose a Partir de Sacarose**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MAKINO, Y. **Seleção de linhagens de *Kluyveromyces* produtoras de inulinase visando a obtenção de fructooligosacarídeos**: caracterização na enzima e otimização das etapas de produção e purificação. 2004. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NGUYEN, Q. D. *et al.* Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 21, p. 183–186, 1999.

NIGHOJKAR, A. *et al.* Production of low methoxyl pectin using immobilized pectinesterase bioreactors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S.l.], n. 80, p. 327-330, 1995.

NOGUEIRA, R. I. **Processode obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó.** 2002. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

OLIVEIRA, D. A. A literature review on adding value to solid residues: egg shells. **Journal of Cleaner Production**, [S.l.], v. 46, p. 42-47, 2013.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Otimização de extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 131-140, 2004.

OLIVEIRA, R. Q. *et al.* Produção de pectinases por leveduras: uma revisão. **SITIEN TIBUS - Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 9, n. 1, p. 41-47, jan./mar. 2009.

PACE, V. *et al.* Celite-Supported Reagents in Organic Synthesis: An Overview. **Current Organic Chemistry**, [S.l.], v. 14, p. 2384-2408, 2010.

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

PATCHING, J. W.; ROSE, A. H. The effects and control of temperature. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. **Methods irz Microbiology**, Londres: Academic Press, 1969, v. 2, p. 23-38.

PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil.** 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PELCZAR JR *et al.* **Microbiologia: conceitos e aplicações.** v. 1. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PERALTA, J. L. V. M. **Phosphorylation by alkaline phosphatase: use of the enzyme in cascade reactions.** 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, p. 237-245, 1999.

PESSONI, R. A. B. *et al.* Produção de concentrados de frutose por inulinas de *Penicillium janczewski* atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 373-377, 2004.

POUYEZ, J. *et al.* First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity. **Biochimie**, [S.l.], v. 94, p. 2423-2430, 2012.

PRADELLA, J. G. da C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHIMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. cap. 16.

SANTOS, A. F. dos. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. cap. 2.

SILVA, M. F. *et al.* Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous–organic médium. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 138, p. 148–153, 2013.

SILVA-SATISTEBAN, B. O. Y. **Estudo dos parâmetros de engenharia de processo que afetam a fisiologia e a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045**. 2006. 157 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TAVARES, A. P. M. *et al.* Immobilization of laccase on modified silica: Stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 131, p. 405–412, 2013.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1. cap. 5.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. 2004. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

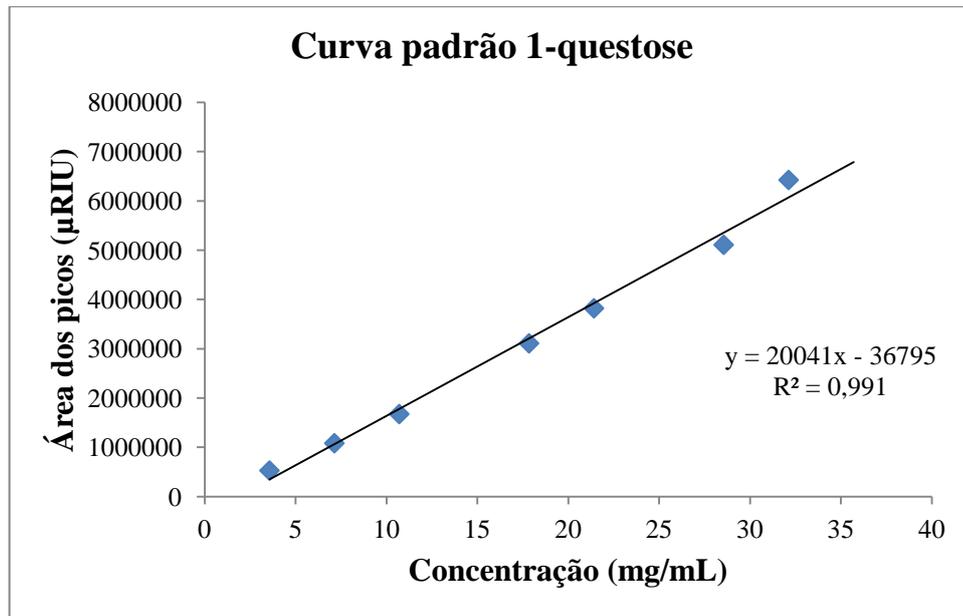
UENO, K. *et al.* Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). **Chemistry Central Journal**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 16, 2011.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: LIMA, U. de A.. *et al.* **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3. cap. 18.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v. 19, p. 107-117, 1996.

ANEXO A – CURVA PADRÃO DE 1-QUESTOSE



ANEXO B – CURVA PADRÃO DE NISTOSE

