

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus*
EM PROCESSO BATELADA ALIMENTADA A PARTIR DE
MEIOS INDUSTRIAIS PRÉ-TRATADOS**

Guilherme Lopes Mendes
Engenheiro de Alimentos, UFV

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M522p Mendes, Guilherme Lopes
Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo
batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados /
Guilherme Lopes Mendes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fermentação. 2. Enzima. 3. Carboneo ativado. I. Rodrigues,
Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Use of industrial by-products for inulinase production by
Kluyveromyces marxianus in a fed-batch process

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fermentation, Enzyme, Activated carbon

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Maria Isabel Rodrigues

Daniel Ibraim Pires Atala

Eliana Setsuko Kamimura

Fátima Aparecida Almeida Costa

Francisco Maugeri Filho

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues
Orientadora – DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Daniel Ibraim Pires Atala
Membro Titular – FEQ/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Eliana Setsuko Kamimura
Membro Titular – FZEA/USP

Prof^a. Dr^a. Fátima Aparecida Almeida Costa
Membro Titular – DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Membro Suplente – DEA/FEA/UNICAMP

Dedico com muito carinho aos meus pais, Ilson e Lina, aos meus irmãos, Lincon e Amanda, e à minha namorada Jaiana. Obrigado por existirem e agigantarem meu desejo de viver e vencer. Amo vocês!

Agradecimentos

Desejo expressar minha gratidão àqueles que generosamente me ajudaram a desenvolver este trabalho com os fragmentos de seus conhecimentos e técnicas.

Em especial, agradeço à minha orientadora Prof^a. Maria Isabel por ser uma grande incentivadora e por nortear meu caminho em busca do aprendizado contínuo, sempre visando o bem da sociedade como um todo.

Ao Prof. Francisco Maugeri, além de um grande orientador científico, um amigo e modelo de liderança moderna.

À Unicamp e à Faculdade de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

À FAPESP, pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao Daniel, Bernardo, Fifa, Saartje e Danilo, pela amizade, dedicação e o incondicional auxílio prestado ao longo deste trabalho.

Ao Luciano, Abraão, Eliane, Raquel, Edu, Pedro, Angélica, Lílian, Geraldo, Elizama, Mônica e Olga, pelas idéias, a amizade e por propiciarem um agradável ambiente de trabalho no LEB.

À Maria, Lia e Vanir, pelos serviços prestados e pelo suporte contínuo.

Agradeço a Deus pelos momentos inesquecíveis e peço perdão por todas as vezes que me esqueci de agradecer por eles.

Enfim, gostaria que todos dividissem comigo os méritos dessa conquista, porque ela também vos pertence.

MUITO OBRIGADO!

*“Existem apenas duas maneiras de ver a vida:
acreditar que não existem milagres e
acreditar que tudo é milagre”.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
SUMMARY	2
INTRODUÇÃO	3
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1. INULINASES	9
1.2. MEIOS INDUSTRIAIS	11
1.3. FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA OU “FED-BATCH”	13
1.4. PURIFICAÇÃO DE INULINASE	15
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2 - PRÉ-TRATAMENTO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO PARA VIABILIZAÇÃO DA ETAPA DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INULINASE	23
2.1. RESUMO.....	23
2.2. INTRODUÇÃO	24
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.3.1. <i>Produção de inulinase</i>	26
2.3.2. <i>Purificação em coluna de leite expandido</i>	26
2.3.3. <i>Métodos analíticos</i>	27
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
2.4.1. <i>Planejamentos fatoriais</i>	27
2.4.2. <i>Teste de purificação e recuperação..</i>	33
2.5. CONCLUSÕES	34
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
2.7. ANEXO	34

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus* EM MEIOS INDUSTRIAIS NOS PROCESSOS BATELADA ALIMENTADA E BATELADA SIMPLES 46

3.1. RESUMO.....	46
3.2. INTRODUÇÃO	47
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.4.1. <i>Fermentação batelada simples</i>	55
3.4.2. <i>Fermentação batelada alimentada</i>	58
3.5. CONCLUSÕES	68
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

CAPÍTULO 4 - USE OF INDUSTRIAL BY-PRODUCTS FOR INULINASE PRODUCTION BY *Kluyveromyces marxianus* IN A FED-BATCH PROCESS 71

4.1. ABSTRACT	72
4.2. INTRODUCTION.....	73
4.3. MATERIALS AND METHODS	74
4.3.1. <i>MICROORGANISM AND INOCULUM</i>	74
4.3.2. <i>PRETREATMENT OF INDUSTRIAL BY-PRODUCTS</i>	74
4.3.3. <i>FED-BATCH FERMENTATION</i>	75
4.3.4. <i>METABOLITE ANALYSES</i>	75
4.3.5. <i>INULINASE ASSAY</i>	76
4.3.6. <i>BIOMASS AND CELLS VIABILITY</i>	76
4.4. RESULTS AND DISCUSSION	76
4.5. CONCLUSIONS	79
4.6. ACKNOWLEDGMENTS.....	79
4.7. REFERENCES.....	79

CONCLUSÃO GERAL 81

RESUMO GERAL

A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina e também na produção de frutooligossacarídeos. Os meios industriais para produção desta enzima são bastante complexos e alguns de seus componentes podem propiciar a formação de precipitados ao longo da etapa fermentativa. Numa primeira etapa deste trabalho, o objetivo principal foi estudar as condições de pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para viabilizar a recuperação e purificação direta do caldo fermentado contendo a enzima inulinase. As condições de pré-tratamento otimizadas foram assim definidas: 4% (p/p) de carvão ativado tipo ANFC, sob agitação de 150 rpm a 60°C durante 10 minutos, sendo que os substratos foram tratados separadamente numa concentração de 200 g/L. Em seguida, foi estudada a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 a partir destes meios industriais pré-tratados compostos por melaço de cana-de-açúcar (MEL) e água de maceração de milho (AMM) em reatores operando em batelada alimentada. As fermentações foram iniciadas em batelada alimentada contendo 188 g/L de AMM, 30 g/L de MEL (20 g/L de ART) e 7,5 g/L de extrato de levedura, com base nas condições otimizadas em frascos agitados. Observou-se que ocorre um aumento gradativo no pH após a exaustão da fonte de carbono contida no meio inicial, indicando a necessidade de substrato. Sendo assim, estudou-se o controle de alimentação por “feedback” pela manutenção de pH do meio a 4,5. Complementarmente, verificou-se a alimentação exponencial com base em constante cinéticas definidas em batelada simples. O processo em reator de bancada com agitação de 450 rpm (pás inclinadas), aeração de 1,5 vvm, temperatura de 36°C e controle de pH pela alimentação de melaço 200 g/L e HCl 0,5 N atingiu uma atividade enzimática máxima igual a 974 U/mL e uma concentração de biomassa final de 31,0 g/L após 135 h. Além disso, notou-se que altos níveis de oxigênio dissolvido e baixa concentração de açúcar no meio mostraram-se como boas condições para produção de inulinase e que um pulso de etanol parece ampliar a velocidade específica de produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

SUMMARY

*Inulinase is an important enzyme for fructose production through enzymatic hydrolysis of the inulin and also for fructoligosacharides formation. The alternative medium composed of industrial by-products as sugar-cane molasses and corn steep liquor for inulinase production are complex and some of its components can produce flocculants agents during fermentative process. In a first stage of this work, the main objective was to study the conditions of pretreatment of sugar-cane molasses and corn steep liquor in order to viably the downstream phase in expanded bed column. The optimized conditions of pretreatment were 4 % (w/w) activated carbon ANFC at 60 °C, 300 rpm for 10 minutes, the industrial by-products were treated separated in a concentration of 200 g/L. After that, *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 was cultivated in fed-batch process to overproduce inulinase. The fermentation was started in batch wise on medium with 188.0 g/L of corn steep liquor, 30.0 g/L of sugar-cane molasses (20 g/L of total reduced sugar) and 7.5 g/L of yeast extract to enhance biomass concentration. After depletion of sucrose, indicated by a steep rise of pH, the fed-batch phase was initiated. The feeding strategy was applied to control pH-stat at 4.5 by the automatic addition of 200 g/L sugar-cane molasses and HCl 0.5 N. Complementarily, it was verified exponential feeding on the basis of kinetic defined in batch wise process. Fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 at 36 °C, 450 rpm and 1.5 vvm resulted in a biomass concentration of 31.0 g.L⁻¹ after 135 h. High dissolved oxygen and low sugar concentration in medium are shown to be a good condition for inulinase production and an ethanol pulse has enhanced the specific inulinase production of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. The inulinase activity in the fed-batch process using industrial by-products reached 974 U.mL⁻¹.*

INTRODUÇÃO

A utilização de oligossacarídeos como alimentos funcionais é proposta desde 1980 e a sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias na flora intestinal, que são responsáveis por vários efeitos benéficos a saúde. Devido as suas características físico-químicas e bioquímicas, estes compostos têm encontrado aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e produtos para diabéticos.

A inulina e os frutooligossacarídeos são considerados alimentos funcionais, fibras ou ingredientes alimentares em diversos países. Eles têm recebido muita atenção por causa do seu efeito sobre a flora intestinal. A inulina contém em média 30 unidades de frutose, enquanto que os frutooligossacarídeos são os principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, e são açúcares formados por 2 a 9 moléculas de frutose ligadas, algumas vezes, a uma unidade de glicose terminal.

As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando a inulina como matéria-prima (ETTALIBI e BARATTI, 1987). As inulinases também têm sido utilizadas na produção de oligossacarídeos (KIM, *et al.*, 1997).

O mercado mundial de enzimas movimenta US\$ 1,8 bilhão, centralizados na Europa e Estados Unidos. Segundo BOON (2000), o Brasil, apesar de cerca de 500 pesquisadores na área, é um país totalmente dependente em biocatalisadores, onde a comercialização atinge US\$ 45 milhões, dos quais US\$ 35 milhões referentes à importação.

Diversos microrganismos podem ser utilizados para produzir inulinase, e a seleção destes dependerá de suas características fisiológicas. Além disso, para o uso de algum microrganismo deve-se considerar o fato desses pertencerem ao grupo GRAS ("Generally Recognized as Safe") e serem aceitos pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos para produtos alimentícios (SCHNEIDER, 1998). Neste contexto encontra-se o gênero *Kluyveromyces*, o que o torna muito interessante comercialmente.

A vantagem de utilizar microrganismos do gênero *Kluyveromyces sp.* consiste na alta produtividade da enzima inulinase, tanto em meio sintético (KALIL, 2000; VRANESIC *et al.*, 2002 e SANTOS, 2002) quanto em meio industrial (TREICHEL, 2001 e 2004; MAKINO, 2001 e 2004; KABKE, 2002).

A produção de inulinase vem sendo estudada há alguns anos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB-FEA-Unicamp). Inicialmente, COSTA (1986) trabalhando com *Kluyveromyces bulgarius* ATCC 16045 caracterizou a enzima produzida, até então denominada invertase. Em estudos posteriores, SANTOS (1998) mostrou que esta enzima também apresentava atividade sobre a inulina e que poderia ser denominada inulinase. O pH e temperaturas ótimos de atuação da enzima sobre a sacarose foram ao redor de 4,0 e 50-60°C, respectivamente. KALIL (2000) otimizou a produção de inulinase por *Kluyveromyces bulgarius* ATCC 16045 em frascos agitados, utilizando a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta. TREICHEL (2001) reduziu o custo de produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 em, aproximadamente, 50 vezes, ao alterar o meio sintético SANTOS (1998) e KALIL (2000), para o meio industrial, com estudos de otimização utilizando a metodologia do planejamento experimental obteve uma atividade enzimática igual a 138 U/mL. MAKINO (2001) realizou estudos de seleção entre 10 linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, sendo as linhagens NCYC 587 e NRRL Y-7571 selecionadas como melhores produtoras, nas condições de estudo. Assim, partindo do meio industrial utilizado por TREICHEL (2001) foram realizados estudos de otimização da composição do meio para as cepas selecionadas e obtiveram-se atividades enzimáticas ao redor de 700 U/mL em 72 horas de fermentação. KABKE (2002) utilizando cepas selecionadas por MAKINO (2001) continuou os estudos de otimização com as linhagens, obtendo atividade máxima igual a 91,05 U/mL para a linhagem NRRL Y-610, 84,98 U/mL para linhagem NRRL Y-1196, 1500 U/mL para a linhagem NCYC 587 e 2660 U/mL para linhagem NRRL Y-7571, diminuindo ainda mais o custo de produção.

A tendência atual na produção das enzimas através de processos biotecnológicos é analisar estes processos de forma integrada, para que a

otimização seja realizada desde as etapas iniciais do preparo do meio e condições de cultura (“upstream”) até a fase de purificação (“downstream”). Os meios industriais (melaço e água de maceração de milho-AMM) utilizados para produção de enzima são economicamente e ecologicamente muito interessantes, mas alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção da inulinase, ou ainda, dificultar sua posterior purificação. Logo um pré-tratamento destes substratos surge como alternativa de forma a clarificar o meio sem provocar prejuízos a fermentação e garantir maior facilidade na recuperação e purificação da enzima. Deste modo, TREICHEL (2004) realizou estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados com carvão ativado, terra diatomácea e tratamentos ácidos para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima em coluna de leito expandido.

Entretanto, em processos fermentativos de bateladas convencionais, a excreção, em baixas concentrações, de metabólicos está provavelmente relacionada com a elevada concentração inicial de substrato presente no meio. De acordo com HENSING *et al.* (1994), *K. marxianus* CBS 6556 possui forte tendência para produzir piruvato e acetato quando expostos a quantidades excessivas de açúcar. Sendo a síntese de inulinase por *K. marxianus* inibida quando o meio de crescimento não possui fonte limitada de sacarose (ROWENHORST *et al.* 1988; PAREKH e MARGARITIS 1985; GROOTWASSINK e HEWITT, 1983). Em razão disso, estudos que empregam condições de crescimento em meios com limitadas concentrações de carbono para produção da enzima são necessários.

Em suma, este trabalho está apresentado em quatro capítulos. No primeiro capítulo, faz-se uma revisão bibliográfica sobre a inulinase, os meios industriais utilizados, o processo fermentativo em batelada alimentada, processos de purificação e ainda mostra a importância e interesse das pesquisas direcionadas a esta enzima.

O capítulo 2 apresenta a otimização das condições de pré-tratamento dos meios industriais para viabilização da etapa de purificação.

O capítulo 3 avalia algumas estratégias de alimentação do reator de bancada por taxas de adição pré-determinadas e por taxas obtidas pelo “feedback” de condições do meio, buscando-se o aumento de atividade enzimática obtida ao longo do processo fermentativo.

O último capítulo apresenta o estudo de um processo batelada alimentada onde a alimentação do meio é feita a partir do controle de pH. Este capítulo ainda mostra a influência de pulsos de etanol na velocidade específica de formação de inulinase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOON, M.; JANSSEN, E.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

COSTA, F.A.A. Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras. Campinas, 1986. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. (1987) Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.26, p.13-20.

GROOTWASSINK, W. D.; HEWITT, G. M. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulinase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 31-41, 1983.

KABKE, K. C. P. Otimização da Produção de inulinase em meio industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus*. Campinas, 2002. 77p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KALIL, S.J. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. Campinas, 2000. 141p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

MAKINO, Y. Produção de inulinase e invertase a partir da espécie *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos. Campinas, 2001. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MAKINO, Y. Produção e purificação em leito expandido inulinase obtida a partir das espécies de *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos. Campinas, 2004. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PAREKH, S.; MARGARITIS, A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22 (1985) 446-448.

ROUWENHORST, R. J., L. E.; VISSER, A. A.; VANDERBAAN, W. A. SCHEFFERS AND J. P. VANDIJKEN. Production, Distribution, and Kinetic-Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS-6556. **Applied and Environmental Microbiology**. 1988, 54(5): 1131-1137.

SANTOS, A.M.P. Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgarius*, Campinas, 2002. 161p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHNEIDER, A. L. S. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Florianópolis, 1998. 137p. **Tese (Mestrado em Engenharia Química)** – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

TREICHEL, H. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima. Campinas, 2004. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

TREICHEL, H. Estudo de meios alternativos para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. Campinas, 2001. 81p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VRANESIC, D.; KURTANJEK, Z; SANTOS, A. M. P.; MAUGERI, F. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces bulgarius*. **Food Techonology Biotechonology**, v. 40, n. 1, p.67-73, 2002.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Inulinases

Inulinases são 2,1- β -D-frutanohidrolase (EC 3.2.1.7.), que convertem inulina, um polímero com frutose na ligação β -2,1, em frutose. A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose, os quais têm assumido grande importância como agentes responsáveis pela doçura em alimentos e bebidas (POORNA e KULKARNI, 1995).

As inulinases podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que contém inulina, ou através de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Dentre as leveduras, aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* tem despertado grande interesse industrial (SCHNEIDER, 1998).

Diversas inulinases microbianas têm sido parcialmente purificadas e suas propriedades foram revisadas por VANDAMME e DERYCKE (1983). Em contraste com as enzimas das plantas, inulinases microbianas apresentam atividade sobre a sacarose, bem como sobre a inulina.

SANTOS (1998), estudando a síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose com inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgarius* ATCC 16045, observou que a enzima apresentava tanto atividade hidrolítica (U_h), como atividade de transferência (U_t). Sendo que a atividade hidrolítica desta enzima é mais acentuada do que a de transfrutossilação, observada por uma baixa produção de U_t/U_h . Obtendo uma produção máxima de frutooligossacarídeos após 5 horas em pH 6,0 e temperatura de 50°C.

A síntese de inulinase está diretamente relacionada ao metabolismo de carbono sendo praticamente o ponto de partida do mesmo, sendo por isso necessário o entendimento dos mecanismos de regulação específicos deste caso. Existe muita informação sobre os componentes das vias de metabolismo de açúcares em *Saccharomyces cerevisiae*, porém esta informação tem sido

assumida como válida para outros tipos de leveduras. Muitas variações bioquímicas e genéticas existem em relação ao uso de vias metabólicas para os açúcares, principalmente em muitas leveduras com metabolismo difíceis de serem modelados como, por exemplo, a respiração em presença de oxigênio no metabolismo dos açúcares.

Dentre este tipo de leveduras estão as dos gêneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, *Yarrowia* e *Schizosaccharomyces* (FLORES *et al.*, 2000). Os mesmos autores, afirmam que o conhecimento preciso do mecanismo de regulação é de extremo interesse quando se pretende modificar organismos para usos específicos, ou para modelagem da conduta de sistemas industriais que utilizam este tipo de levedura de metabolismo não convencional.

Os mecanismos clássicos de regulação do metabolismo de açúcares são descritos por FIECHTER *et al* (1981) e os mesmos estão relacionados com o balanço entre respiração e fermentação (PRONK *et al*, 1996), uns relacionados à presença de oxigênio e outros à presença de glicose. O efeito Pasteur é definido como a inibição da via glicolítica em presença de oxigênio o mesmo que se manifesta com a não formação de etanol. Um efeito oposto é o efeito Custers, descrito como a inibição da formação de etanol na ausência de oxigênio e a estimulação da mesma na presença de oxigênio. O efeito Crabtree (DE DEKEN, 1966) é definido como a repressão da atividade respiratória na presença de glicose, em condições aeróbias, o que manifesta a glicólise com formação de etanol.

Dois tipos de efeito Crabtree têm sido descritos, o “long-term” e o “short-term”. O efeito “long-term” é definido como sendo a fermentação alcoólica aeróbia com altas velocidades de crescimento independente da limitação ou excesso de açúcar, provocado pela insuficiente capacidade da via respiratória para consumir o piruvato. O “short-term” é definido como a fermentação alcoólica instantânea depois de gerar uma mudança desde uma condição de limitação de açúcar até excesso da mesma, provocado pela saturação da via respiratória levando a um sobre-fluxo ao nível do piruvato.

O efeito Kluyver descreve a ausência de fermentação alcoólica durante crescimento com um açúcar, geralmente um dissacarídeo, em condições em que a glicose é rapidamente fermentada (PRONK *et al.*, 1996).

1.2. Meios Industriais

Os meios industriais utilizados para produção de enzimas são bastante complexos e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação e purificação. Assim, um pré-tratamento destes substratos surge como alternativa de forma a clarificar o meio sem provocar prejuízos na fermentação, garantindo maior facilidade na extração e purificação da enzima.

Melaço é um subproduto da indústria de açúcar e é utilizado como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e matéria-prima para a indústria de fermentações (“Underfolker” citado por SIRIANUNTAPIBOON *et al.*, 2004). Sua grande concentração de metais pesados é a causa de um problema crítico na sua utilização em fermentações, pois inibe o crescimento de microrganismos, influencia o pH do substrato e está envolvida na inativação de enzimas associadas a biossíntese do produto. ROUKAS (1998) estudou o pré-tratamento de melaço de beterraba, com diferentes técnicas, a fim de remover metais pesados. Sendo elas: resina de trocas catiônicas; tratamento com ácido sulfúrico; tratamento com tricálcio fosfato; ferrocianeto de potássio; e EDTA. Os resultados mostraram que o tratamento com ácido sulfúrico foi o que gerou as máximas concentrações de polissacarídeos.

RYAN e JOHNSON (2001) estudaram os efeitos da modificação de uma membrana padrão de diálise, comercialmente disponível, através da redução de seus poros com a deposição de cristais de cálcio octanato na membrana; sendo este procedimento utilizado na remoção da concentração de potássio em melaços destinado à fermentação microbiana.

Nas fermentações com melaço, uma concentração ideal de potássio deve ser alcançada, considerando que em níveis maiores ele pode inibir a fermentação, e em níveis menores pode não atender as necessidades requeridas pelo

microrganismo para seu crescimento. Uma membrana normal de diálise é um método economicamente viável na remoção de potássio do melaço, porém resulta em uma grande perda de açúcar no processo de difusão. A membrana modificada é capaz de reduzir a concentração de potássio no melaço, aumentando o rendimento da fermentação, com perdas de açúcares bem menores durante a difusão.

KIM e SHODA (1999) estudaram a clarificação de melaço em meios contendo o fungo *Geotrichum candidum* em suspensão. A peroxidase produzida pelo fungo agiu na clarificação de melaço, obtendo-se uma clarificação de 80% em quatro semanas. Num segundo ensaio, a clarificação de melaço foi realizada com este microrganismo imobilizado em espuma de polietano e o nível de 80% de clarificação somente foi atingido após oito semanas.

WALFORD (2002) estudou as aplicações da cromatografia de troca iônica na resolução de problemas de processamento de cana-de-açúcar. A cromatografia de troca iônica ofereceu uma técnica simples e confiável, tanto para separação, quanto para determinação de íons orgânicos e inorgânicos na mistura complexa. Identificar e quantificar íons presentes em xarope de açúcar são fatores importantes para entender e maximizar a recuperação do açúcar. O tipo de empacotamento da coluna cromatográfica, a composição da fase móvel, o pH do meio e o modo de detecção se mostraram variáveis muito úteis na análise de produtos manufaturados de açúcar, especialmente para a separação dos íons multivalentes, como o fosfato, e de ácidos orgânicos.

A cromatografia de troca iônica possui excelente repetibilidade e recuperação dos compostos das matrizes. Um grande exemplo da aplicação desse método de separação está exatamente na solução de problemas de clarificação de caldos de açúcar. No entanto, é um procedimento de custo ainda elevado.

SIRIANUNTAPIBOON *et al.* (2004) estudaram a despigmentação das melanoidinas do melaço testando 170 linhagens de bactérias acetogênicas. Entre elas, a linhagem BP103 foi a que apresentou o melhor resultado quando cultivada a 30°C por cinco dias num meio contendo glicose 30%, extrato de levedura 0,5%,

K₂PO₄ 0,1% e MgSO₄.7H₂O 0,05% e pH 6,0. A adição dessa linhagem de bactérias resultou numa descoloração de 73,5 ± 3,5% dos pigmentos do melaço em tratamentos anaeróbios.

Assim, verifica-se através da revisão de literatura que a utilização de resíduos industriais tem tido grande interesse de estudo devido ao apelo ecológico e econômico além de uma ampla aplicação, requerendo, portanto, estudos de clarificação que viabilizem não só a obtenção dos produtos, mas também as etapas de recuperação e purificação dos mesmos.

1.3. Fermentação em batelada alimentada ou “fed-batch”

A fermentação em batelada alimentada (fed-batch) é um processo particularmente efetivo para fermentações onde ocorre inibição pelo substrato, repressão catabólica e inibição pelo produto (MODAK *et al.*, 1986; LIU *et al.*, 2000). A adição de substrato provoca uma extensão da fase de crescimento, seguida do aumento da biomassa e da concentração de metabólicos (KLEMAN, 1994). Entretanto, o acúmulo de metabólicos pode causar inibição do crescimento (BECH-JENSEN e CARLSEN, 1990) e da produção de proteínas heterólogas (BECH-JENSEN e CARLSEN, 1990; MACDONALD e NEWAY, 1990). Assim, as fermentações em batelada alimentada também têm inconvenientes, que devem ser resolvidos através da determinação das condições ótimas que resultem em menor quantidade de produto tóxico e maior produção dos metabólicos desejáveis.

Os métodos de adição de nutrientes podem ser classificados em dois grupos: adição de nutrientes contínua e intermitente. A adição intermitente ocorre manualmente em tempo pré-determinado. BAUER e SHILOACH (1974) cultivaram *E. coli* em meio complexo com pH controlado, obtendo uma densidade celular de 26 g/L de massa seca. A fonte de carbono (glicose) era adicionada manualmente ao fermentador em resposta ao súbito aumento da concentração de oxigênio dissolvido, devido ao decréscimo no metabolismo, em virtude da exaustão da fonte de carbono. A alimentação contínua também já foi muito utilizada, sendo que o substrato limitante é adicionado ao reator a taxa constante, sendo a mesma

responsável pela taxa de crescimento do microrganismo (YEE e BLANCH, 1992). Esse tipo de alimentação pode ser dividido em dois grupos: métodos que utilizam uma alimentação pré-determinada, e aqueles que possuem um controle por “feedback” (YEE e BLANCH, 1992).

Segundo ALLEN e LULI (1998), alimentação pré-determinada pode ocorrer a uma taxa constante (também conhecida como alimentação por gradiente) ou através de uma taxa exponencial de alimentação. Essas taxas são definidas pelo operador no início da fermentação. Com taxa constante de alimentação, a biomassa irá aumentar linearmente com o tempo, a uma taxa especificada pela taxa de alimentação (YEE e BLANCH, 1992). No caso da alimentação exponencial a biomassa irá aumentar na mesma velocidade determinada pela taxa exponencial de alimentação, a menos que a mesma seja maior que a velocidade específica de crescimento máxima do microrganismo, o que irá provocar um acúmulo de substrato no reator (YEE e BLANCH, 1992). O tipo de alimentação tem influência na obtenção de proteínas recombinantes, bem como no acúmulo de biomassa (JUNG *et al.*, 1988). Pode-se citar como exemplo o trabalho desenvolvido por ALLEN e LULI (1998), onde a produção de interleucina-1- β por *E. coli*, usando taxa constante de alimentação (17 mg/g de massa seca) e alimentação exponencial (39 mg/g de massa seca). Usando o método de alimentação por gradiente YEE e BLANCH (1993) obtiveram para *E. coli* recombinante (produção de tripsina) uma densidade celular de 92 g/L com uma boa produção de tripsina.

Um problema inerente a esse tipo de alimentação pré-determinada, é que não se tem controle da concentração de nutrientes dentro do reator, o que pode acarretar um acúmulo de nutrientes, principalmente se o microrganismo não cresce a taxa especificada pelo operador. Para reduzir os problemas de alimentação pré-determinada, pode-se fazer a adição de um determinado componente ao meio de cultivo utilizando-se um controle que verifique as necessidades do microrganismo durante o crescimento.

Muitos parâmetros de processo têm sido utilizados para controle de alimentação, incluindo: oxigênio dissolvido (MORI *et al.*, 1979; OHTA *et al.*, 1993), pH (ROBBINS e TAYLOR, 1989; LEE e CHANG, 1993; LEE *et al.*, 1994), turbidez

(YANO *et al.*, 1981; IJIMA *et al.*, 1987), coeficiente respiratório (WOEHER e ROEHR, 1981), concentração de substrato (LULI *et al.*, 1987; SHIMIZU *et al.*, 1991), concentração de produtos metabólicos no meio (DAIRAKU *et al.*, 1971; SHIMIZU *et al.*, 1991), calor metabólico e evolução de CO₂ (PAALMA *et al.*, 1990; RANDOLPH *et al.*, 1990).

Há diversas maneiras de se obter informação desses parâmetros para controle da adição de nutrientes no reator. O método mais simples é quando se tem alimentação ligada diretamente ao sensor, como no caso de oxigênio dissolvido e pH. MORI *et al.* (1979) desenvolveram um sistema onde a adição de glicose foi controlada pelo sensor de oxigênio dissolvido, obtendo 125 gramas de massa seca por litro para *E. coli*. Quando se utiliza o controle através do pH para adição de glicose ao meio de cultivo, após exaustão da glicose do meio, o pH aumenta, indicando a necessidade de substrato. LEE e CHANG (1993) utilizaram esse tipo de sistema para crescimento de *E. coli* obtendo uma biomassa final de 88 g/L.

Verifica-se assim, que o objetivo principal dos pesquisadores foi atingir uma alta produtividade em fermentação de alta densidade celular. O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* CB6556 foi estudado por HENSING *et al.* (1994), com o intuito de modelar a produção de inulinase em alta densidade celular no processo batelada alimentada.

Em razão disso, estudos que empregam condições de crescimento em meios com limitadas concentrações de carbono para produção da enzima são necessários para investigar a possibilidade de obtenção de uma maior produtividade enzimática a partir do processo em batelada alimentada.

1.4. Purificação de Inulinase

Na produção da enzima inulinase por processos biotecnológicos são necessárias operações de purificação após a fermentação que devem ser incluídas no custo final do produto. Para minimizar estes custos é importante a escolha de métodos de separação e purificação adequados de modo a se obter um bioproduto comercialmente viável. Tradicionalmente, a adsorção de proteínas

a partir de meios fermentados é feita em leito fixo, onde o líquido precisa passar por um tratamento prévio para remoção de particulados. A aplicação de uma alimentação contendo particulados, em leitos fixos convencionais de adsorvente, resulta em severos problemas operacionais como resultado da retenção de particulados nos espaços do leito. Estes problemas podem manifestar-se pelo incremento na queda de pressão ao longo do leito e pela formação de uma barreira na entrada devido a partículas mais espessas que não permeiam através do leito.

Um processo que vem recebendo atenção é a adsorção de proteínas na presença de biomassa através do uso de leito fluidizado, particularmente o uso de leito expandido.

A adsorção em leito expandido envolve etapas de clarificação, concentração e purificação em uma única operação. Assim, este processo elimina etapas preliminares devido a utilização direta do caldo bruto, sem clarificação prévia, com o material particulado passando através do leito sem ser retido. Além disso, possui um apelo industrial muito promissor e atraente, pois reduz o tempo total de processo (ganho de produtividade), bem como conduz a um aumento de eficiência global.

O uso de adsorvente com densidade controlada permite obter um leito estável, com cada partícula mantendo uma posição discreta no leito com um pequeno movimento circular. Deste modo, este processo, comparado com o leito fixo, apresenta uma maior capacidade de adsorção. Em processos em que o produto é extracelular, esta operação ocorre logo após a fermentação, e no caso de intracelular logo após a ruptura das células (SNOW, 1994).

SANTOS (1998) trabalhando com inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* purificou a enzima através de precipitação em etanol 70%, re-suspensão do precipitado em tampão 0,05M e pH 5,2, e posterior passagem da amostra em coluna de troca aniônica "Q-Sepharose Fast Flow". A eluição da enzima foi feita com gradiente salino em tampão fosfato 0,05M, pH 7,5. Ao final, o fator de purificação foi de 9,2 vezes e com recuperação de 52% da enzima.

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas opostas a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Estes solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamentos com outros íons com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação que a fase estacionária (COLLINS *et al.*, 1995).

Em 1993, a “Pharmacia Biotech” introduziu novos tipos de resina cromatográficas e colunas chamadas STREAMLINE, produtos especialmente projetados para a absorção em leito expandido. A resina e coluna STREAMLINE permitem a formação de leito fluidizado estável e operação em alta velocidade. Inicialmente, foram desenvolvidos dois trocadores de íons, o STREAMLINE DEAE, trocador aniônico dietilaminoetil, e STREAMLINE SP, trocador catiônico sulfopropil, ambos com base da matriz em agarose com inclusão de quartzo cristalino inerte no núcleo para obter uma densidade requerida.

KALIL (2000) estudou a purificação da inulinase diretamente do caldo bruto obtida pela fermentação de meio sintético por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgarius* ATCC 16045, em coluna de leito expandido utilizando a resina STREAMLINE SP e obteve uma recuperação de 74% e fator de purificação de 10,4 vezes.

MAKINO (2004), estudando a otimização da purificação de inulinase produzida por *K. marxianus* NRRL Y-7571 também em meio sintético, verificou que, na etapa de adsorção, a resina STREAMLINE DEAE com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,5 e fator de expansão 2,0 apresentou melhores resultados, adsorvendo 22.627 UI de enzima por mililitros de resina. Na etapa de dessorção, a condição otimizada foi a eluição com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 5,2, obtendo volume para o gradiente salino de 0 a 1,0 M de 650 mL. Nessa condição, o resultado experimental de recuperação da enzima adsorvida pela resina, considerando a recuperação em todas as frações que apresentaram atividade, foi de 100% e a fração que apresentou maior concentração de atividade atingiu fator de purificação de 24 vezes.

Assim, nos capítulos que seguem, buscou-se viabilizar a produção e purificação da enzima inulinase a partir de meios industriais pré-tratados num processo integrado desde a etapa *upstream* até *downstream*.

1.5. Referências Bibliográficas

ALLEN, B. R.; LULI, G.W. A gradiente-feed process for *Escherichia coli* fermentations, Biopharm. Deutschland. v.1, p. 38-41, 1988.

BAUER, S.; SHILOACH, J. Maximal exponential growth rates and yields of *Escherichia coli* obtainable in a bench-scale fermentor. Biotechnology and Bioengineering. New York, v.16, p.933-941, 1974.

BECH-JENSEN, E.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose acetate and salts. Biotechnology Bioengineering. New York. v.36, p.1-11, 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos 6 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. p. 11-27.

DAIRAKU, K.; YAMASKI, Y., KUKI, K., SHIOYA, S.; TAKAMATSU, T.; Maximum production in a Baker's yeasts fed-batch culture by a tubing method. Biotechnology and Bioengineering. New York. v.22, p.86-95, 1971.

DE DEKEN R.H. The Crabtree effects and its relation to petite mutation, Yeast, v. 14, p 157-165, 1966.

FIECHTER A.; FUHRMANN G.F.; KAPPELI O. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. In: Advances microbial physiology, Edited by A.H. Rose and J. Gareth Morris, Academic Press, v. 22, 1981.

FLORES, C.-L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T. E GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding in non-conventional yeast. FEMS Microbiology Reviews, v.24, p.507-529, 2000.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-bath culture of *Kluyveromyces marxianus*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 42, n. 4, p. 516-521, 1994.

IJIMA, S.; YAMASHITA, S.; MATSUNAGA, K.; MIURA, H.; MORIKAWA, M; SHIMIZU, K.; MATSUBARA, M.; LOBAYASHI, T. Use of a novel turbimeter to monitor microbial growth and control glucose concentrations. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. London. v.40, p.203-213, 1987.

JUNG, G.; DENEFLÉ, P.; BECQUART, J; MAYAUX, J.F; High-cell-density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1B. Annals Institute Pasteur Microbiology. Paris. v.139: 129-146, 1988.

KALIL, S.J. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. Campinas, 2000. 141p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KIM, S. J.; SHODA, M. Batch Decolorization of Molasses by Suspended and Immobilized Fungus of *Geotrichum candidum* Dec1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.88, No. 5, 586-589, 1999.

KLEMAN, G. L. Development and analysis of glucose controlled fermentation of *Escherichia coli*. 1994. 287 f. Tese (Doctor of Philosophy) Ohio State University, Ohio.

LEE, S.Y; CHANG, H.N; High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. Biotechnology Letters. Dordrecht v. 15, p.971-974, 1993.

LEE, S.Y; YIM, K.S; CHANG, H.N; CHANG, Y.K; Construction of plasmids estimation of plasmid stability, and use of stable plasmid for the production of poly (3-hydroxybutiric acid) by recombinant *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology. Amsterdam. v.32, p.203-211, 1994.

LIU, Y.; LIAO, L; WU, W. Cultivation of recombinant *Escherichia coli* to achieve high cell density with a high level of penicillin G acylase activity. *Proceedings of the National Science Council*. Pekin. v.24, n4, p. 156-160, 2000.

LULI, G.W.; SCHLASNER, S.M.; ORDAZ, D.E.; MASON, M.; STROHL. W.R; An automatic on-line glucose analyzer for feed-back contro of fed-batch growth of *Escherichia coli*. *Biotechnology Techniques*. Kew. v.4, p. 225-230, 1987.

MACDONALD, H.L; NEWAY, J.O; Effects of medium quality on the expression of human interleukim-2 at a high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington. v.3, n.56, p.640-645, 1990.

MAKINO, Y. Produção de inulinase e invertase a partir da espécie *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos. Campinas, 2001. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MAKINO, Y. Produção e purificação em leite expandido inulinase obtida a partir das espécies de *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos. Campinas, 2004. Tese em andamento (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MODAK, J.M.; LIM, HC.; TAYEB, Y. L. General characteristics of optimal feed rate profiles for various fed-batch process. *Biotechnology and Bioengineering*. New York, v.28, p. 1396-1406, 1986.

MORI, H.; YANO, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-state. *Journal Chemical Engineering of Japan*. Tokyo, v.12, p.313-319, 1979.

OHTA, K. SHIBUI, T.; MORIMOTO, Y.; IJIMA, S.; KOBAYASHI, T. High level production of human proapo A-I by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Osaka. v.75, p.155-157, 1993.

PAALMA, T.; TIISMA, K.; KAHRU, A.; VANATALU, K.; VILU, R. Glucose limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology Letters*. Dordrecht, v.21, p.1043-1046, 1999.

POORNA, V.; KULKARNI, P. R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. *Bioresource Technology*, Essex, v. 54, n. 3, p. 315-320, 1995.

PRONK J.T.; STEENSMA H.Y.; VAN DIJKEN P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, v. 12, p. 1607-1633, 1996.

RANDOLPH, T.W., MARISON, I.W., MARTENS, D.E.; von STROCKAR R. U.; Calorimetric control of feed-batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. New York. v.36, p.678-684, 1990.

ROBBINS, J. W.; TAYLOR, K.B. Optimization of *Escherichia coli* growth by controlled addition of glucose. *Biotechnology and Bioengineering*. New York. v.34, p.1289-1294. 1989.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*. v.33, n. 8, p.805-810, 1998.

RYAN, D.; JOHNSON, R. Dialyses and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement. *Separation and Purification Technology*. 22-23, 239-245, 2001.

SANTOS, A.M.P. Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas, 1998. 91p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHNEIDER, A. L. S. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Florianópolis, 1998. 137p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SHIMIZU, N. FUKUZONO, S.; HARADA, Y.; FUJIMORI, K.; GOTOH, K.; YAMAZAKI, Y. Mass production of human epidermal growth factor using fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. New York. v.38, p. 37-42, 1991.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; PHOTHILANGKA, P.; OHMOMO, S (2004) Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria. *Bioresource Technology*, v.92, p. 31-39.

SNOW, U. Adsorbent reduces primary unit operations for bioprocess recovery. *Genetic Engineering News*, New York, v.14, n.3, p. 320-329, 1994.

VANDAMME, E.J.; DERYCKE, D.G. Fermentation process, properties and applications, *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 29, p. 139-176, 1983.

WALFORD, S. N. Applications of ion chromatography in canesugar research and process problems. *Journal of Chromatography A*, 956 p.187-199, 2002.

WOEHER, W.; ROEHR,M. Regulatory aspects of Baker's yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. New York, v.23, p.567-581, 1981.

YANO, T. KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. Control system of dissolved oxygen concentration employing a microcomputer. *Journal of Fermentation Technology*. Osaka. v. 59, p.295-301, 1981.

YEE, L.; BLANCH, H.W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology*. Frankfurt. v.10, p.1550-1556, 1992.

YEE, L.; BLANCH, H.W.; Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. New York. v.41, p.781-790, 1993.

CAPÍTULO 2

Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para viabilização da etapa de recuperação e purificação de inulinase

Guilherme Lopes Mendes, Helen Treichel e Maria Isabel Rodrigues

Universidade Estadual de Campinas – Depto. de Engenharia de Alimentos
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos
Caixa Postal 6121 – 13083-862 – Campinas/SP - E-mail: guilopes@fea.unicamp.br

Trabalho apresentado no XV SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, realizado em Recife/PE de 2 a 5 de agosto 2005.

2.1. RESUMO

A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina e também na produção de frutooligossacarídeos. Os meios industriais para produção desta enzima são bastante complexos e alguns de seus componentes podem dificultar posterior recuperação e purificação direta do caldo bruto fermentado em coluna de leito expandido devido à formação de precipitados ao longo da etapa de transformação. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para viabilizar a recuperação e purificação direta do caldo fermentado contendo a enzima inulinase. A melhor clarificação e a menor taxa de formação de grumos durante as 72 horas de fermentação foram obtidas quando os substratos industriais foram tratados separadamente. As condições de pré-tratamento otimizadas pela aplicação da metodologia de planejamento fatorial foram assim definidas: 4%(p/p) de carvão ativo tipo ANFC, sob agitação de 150 rpm a 60°C durante 10 minutos.

2.2. INTRODUÇÃO

As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando-se a inulina como matéria-prima (ETTALIBI e BARATTI, 1987). A produção de frutose por hidrólise da inulina é mais vantajosa do que a produção convencional a partir do amido. A reação enzimática com o uso da inulinase é simples e forma produtos com 95% de frutose. Por outro lado, a produção convencional de frutose inclui três etapas enzimáticas: a ação da α -amilase, amiloglucosidase e glicose isomerase, produzindo cerca de 45% de solução de frutose, devido o equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose ser próximo de 50% (KIM e RHEE, 1989).

As inulinases também têm sido utilizadas na produção de frutooligossacarídeos (KIM *et al.*, 1997). Os frutooligossacarídeos, prebióticos utilizados como ingredientes funcionais em alimentos, têm atraído especial atenção pelo estímulo ao aumento da população de bifidobactérias, bactérias benéficas que sintetizam antibióticos naturais e vitaminas importantes, como as do complexo B. A superioridade quantitativa dessas bactérias úteis no intestino promove o equilíbrio da flora intestinal e, conseqüentemente, reduzem quadros de disbiose, um distúrbio cada vez mais considerado no diagnóstico de várias doenças. A fermentação da inulina e dos frutooligossacarídeos no cólon produz ácidos graxos de cadeia curta que são absorvidos e metabolizados em várias partes do corpo.

Na produção das enzimas através de processos biotecnológicos, a tendência é ver estes processos de forma integrada, para que a otimização seja realizada desde as etapas iniciais do preparo do meio e condições de cultura (“upstream”) até a fase de purificação (“downstream”). A obtenção de inulinase através de inulina inviabiliza sua produção devido ao custo deste indutor ser cerca de 1500 vezes superior ao custo de sacarose. Além disso, o Brasil dispõe de resíduos industriais em abundância tais como melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho (AMM) com grande apelo econômico e ecológico. Esses meios industriais são compostos por água, sacarose, proteínas, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgânicos e metais pesados tais como ferro, zinco, cobre, manganês, magnésio, cálcio, etc. Entretanto, altas concentrações de metais pesados no meio podem acarretar inibição do crescimento de microrganismos, alteração no pH do meio, inativação de

enzimas associadas a biossíntese do produto e, principalmente, dificultar a etapa de recuperação e purificação da enzima devido a formação de precipitados ao longo da fermentação (ROUKAS, 1998). Assim, o estudo da clarificação do meio de cultivo para produção de inulinase surge como alternativa para viabilizar a etapa de recuperação e purificação através da alimentação direta do caldo bruto fermentado e remoção de compostos inibidores contidos no meio fermentativo.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Os substratos industriais utilizados foram melaço de cana-de-açúcar, adquirido na Usina Esther - Campinas/SP, e água de maceração de milho (AMM) cedida pela Corn Products – Mogi Guaçu/SP.

Estes substratos industriais foram tratados com carvão ativo da empresa Carvorite tipo ANFC e suas características estão listadas na Tabela 2-1.

Tabela 2-1. Características do carvão ativo Carvorite-ANFC.

Aspecto	Pulverizado
Granulometria	25% a 38% retido pela malha de mesh 325
pH	5,0 a 6,5
Eficiência relativa	90%
Cinzas	5% a 7%
Densidade aparente	0,390 g/cm ³
Umidade ao embalar	<4%
Filtrabilidade	Boa

Fonte: Carvorite Ltda – Irati/PR

O melaço de cana-de-açúcar e a água de maceração de milho foram pré-tratados numa concentração de 200 g/L. Nessa concentração, o melaço possuía cerca de 140 gramas de açúcares redutores totais (ART) por litro de solução e uma densidade ótica (absorbância) média a 600 nm igual a 0,682 - enquanto que a AMM possuía cerca de 4,0 g/L de ART e a solução diluída (1:3) uma densidade ótica média (600 nm) igual a 1,340.

Foi aplicada metodologia de planejamento fatorial visando avaliar o efeito das variáveis concentração de carvão (% p/p) e temperatura do pré-tratamento para que fossem definidas as condições que levassem à clarificação do meio de cultivo sem decréscimo

acentuado de nutrientes importantes no processo de biotransformação. Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 2-2.

Esse tratamento foi realizado em agitador orbital Psycrotherm (New Brunswick Scientific, N. J.) a 150 rpm em erlenmeyers de 500 mL. Para que a cinética do tratamento também fosse avaliada, os efeitos de cada variável foram analisados após 30, 60, 90 e 120 minutos de agitação. Em seguida as amostras foram filtradas e centrifugadas a 10.000 rpm numa faixa de temperatura entre 4 e 6°C por 15 minutos.

Tabela 2-2 – Valores utilizados no planejamento fatorial completo para o pré-tratamento do melaço e da água de maceração de milho.

Variáveis independentes / Níveis	-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Carvão (%)	3,2	4,0	6,0	8,0	8,8
Temperatura (°C)	56	60	70	80	84

* Ponto central

2.3.1. Produção de inulinase

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi repicado de ágar inclinado de extrato de malte e levedura para tubo de ensaio contendo caldo do mesmo meio, em um volume de 10 mL. O meio foi incubado por 24 horas a 30°C e 150 rpm. Cada tubo de ensaio foi usado como pré-inóculo. O meio para obtenção do inóculo possuía a seguinte composição: sacarose 20,0 g.L⁻¹; extrato de levedura 5,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄ 5,0 g.L⁻¹; NH₄Cl 1,5 g.L⁻¹; KCl 1,15 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,65 g.L⁻¹ (KABKE, 2002). O meio fermentativo otimizado por TREICHEL (2004), possuía 150 g/L de melaço (85 g/L ART), 50 g/L de AMM e 6 g/L extrato de levedura.

2.3.2. Purificação em coluna de leito expandido

Foram aplicadas as condições otimizadas para a purificação do meio sintético fermentado definidas por MAKINO (2004). Foi utilizada a resina aniônica STREAMLINE DEAE. A adsorção foi feita pela alimentação em coluna de leito expandido da enzima em caldo fermentado com pH ajustado para 6,5, a coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,5 e com fator de expansão de 3,0. Na dessorção a enzima foi eluída com tampão fosfato 0,02M, pH 5,2 e o volume de 650 mL para o gradiente salino de NaCl passar de 0 a 1 M em sistema FPLC – Pharmacia Biotech.

2.3.3. Métodos analíticos

A densidade ótica (absorbância) das amostras foi avaliada por análise espectrofotométrica a 600 nm. O teor de açúcares redutores totais foi determinado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por MILLER (1959).

A atividade enzimática foi determinada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. O método consiste na utilização de frascos incubados em banho termostatzado a 50°C com agitação recíproca. Nos frascos adicionam-se, 4,5 mL de solução de sacarose a 2 % preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,6 e 0,5 mL da amostra convenientemente diluída. Retira-se amostras de 1,0 mL nos intervalos de 2, 4, 6 e 8 minutos e determina-se a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS. Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar 1 μ mol/mL de sacarose por minuto.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estudadas condições de pré-tratamento que viabilizassem a recuperação e purificação direta da enzima e, paralelamente, minimizassem a perda de nutrientes essenciais do meio fermentativo.

2.4.1. Planejamentos fatoriais

A matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados, bem como as respostas de densidade ótica (DO) e perda de açúcares redutores totais (PART) após 30, 60, 90 e 120 minutos de tratamento para o melaço estão apresentados na Tabela 2-3. Observa-se que para o melaço já nos primeiros 30 minutos de tratamento há uma redução da densidade ótica superior a 80% e que somente a redução de DO (600 nm) do melaço realizado pelo ensaio 7 (56°C e 6,0% carvão) difere relativamente dos outros ensaios, ficando ao redor de 70% (Figura 2-1). Verifica-se que em 30 minutos de tratamento o ensaio 01 (60°C e 4,0% carvão) apresenta uma clarificação de cerca de 83% (Figura 2-2), minimiza a perda de açúcares redutores totais ficando em 11,9% e, além disso,

oferece um menor custo de tratamento. A Figura 2-3 compara a clarificação das amostras antes e depois da centrifugação realizada.

A Tabela 2-4 apresenta a matriz do planejamento experimental e as respostas de DO após 30, 60, 90 e 120 minutos para AMM. Neste caso, a redução de DO é superior a 98% para todos os ensaios após 30 minutos de tratamento (Figura 2-4), ficando a solução das amostras totalmente límpida (Figura 2-5 e Figura 2-6).

Tabela 2-3 – Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de leitura de densidade ótica (DO) e perda de açúcares redutores totais (PART) para o melaço após 30, 60, 90 e 120 minutos de tratamento.

En-saio	Carvão (%)	Temperatura (°C)	Tempo 0,5 h		Tempo 1,0 h		Tempo 1,5 h		Tempo 2,0 h	
			DO (600nm)	PART (%)	DO (600nm)	PART (%)	DO (600nm)	PART (%)	DO (600nm)	PART (%)
01	4,0 (-1)	60 (-1)	0,105	11,9	0,099	14,0	0,083	17,6	0,085	17,6
02	8,0 (+1)	60 (-1)	0,014	25,2	0,012	26,2	0,011	19,6	0,009	16,0
03	4,0 (-1)	80 (+1)	0,079	12,6	0,072	16,0	0,056	18,6	0,053	19,4
04	8,0 (+1)	80 (+1)	0,008	22,0	0,005	21,7	0,003	19,0	0,001	26,1
05	3,2 (-1,41)	70 (0)	0,113	12,7	0,110	12,8	0,107	13,9	0,090	19,1
06	8,8 (+1,41)	70 (0)	0,050	19,4	0,047	21,2	0,043	22,7	0,041	25,8
07	6,0 (0)	56 (-1,41)	0,186	10,9	0,196	10,0	0,196	17,0	0,185	15,3
08	6,0 (0)	84 (+1,41)	0,008	33,8	0,006	34,2	0,004	28,7	0,003	24,3
09	6,0 (0)	70 (0)	0,036	16,3	0,020	7,5	0,020	9,3	0,017	12,7
10	6,0 (0)	70 (0)	0,038	13,8	0,032	11,8	0,027	6,4	0,018	14,7
11	6,0 (0)	70 (0)	0,037	10,7	0,030	12,5	0,024	7,3	0,020	15,3

Densidade ótica (600 nm) antes do pré-tratamento: Melaço=0,682;

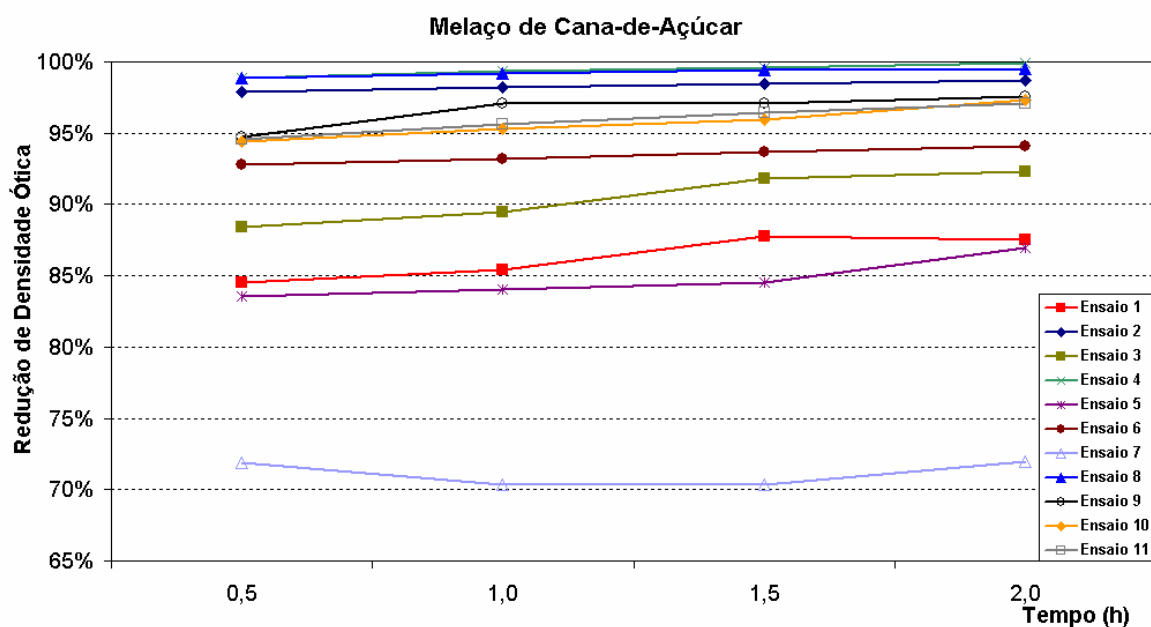


Figura 2-1 – Percentual de redução de densidade ótica (absorbância) do melaço ao longo do tempo para os 11 ensaios do planejamento experimental.

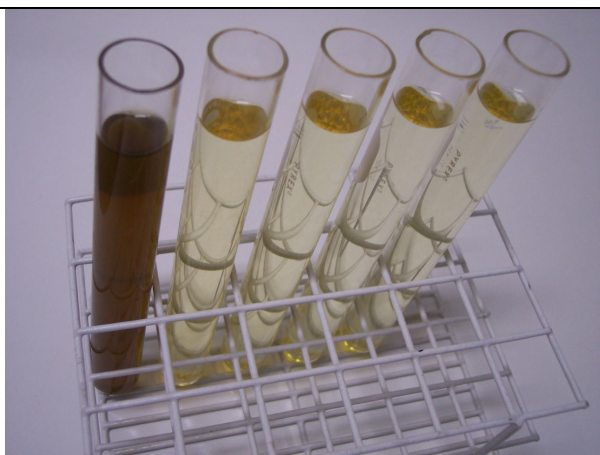


Figura 2-2 – Amostras Melaço – Ensaio 01 (60°C – 4% carvão; não-tratado, 30, 60, 90 e 120 minutos)

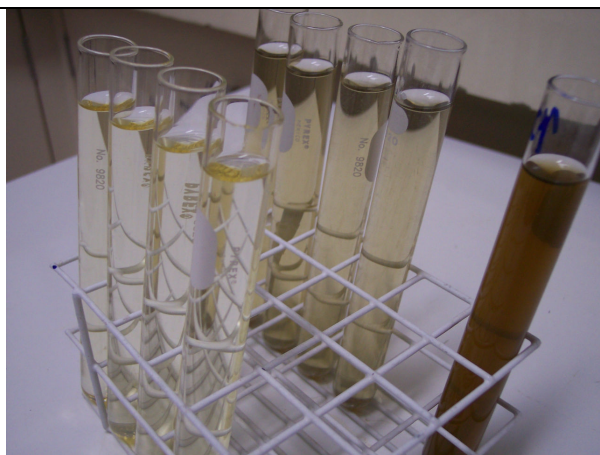
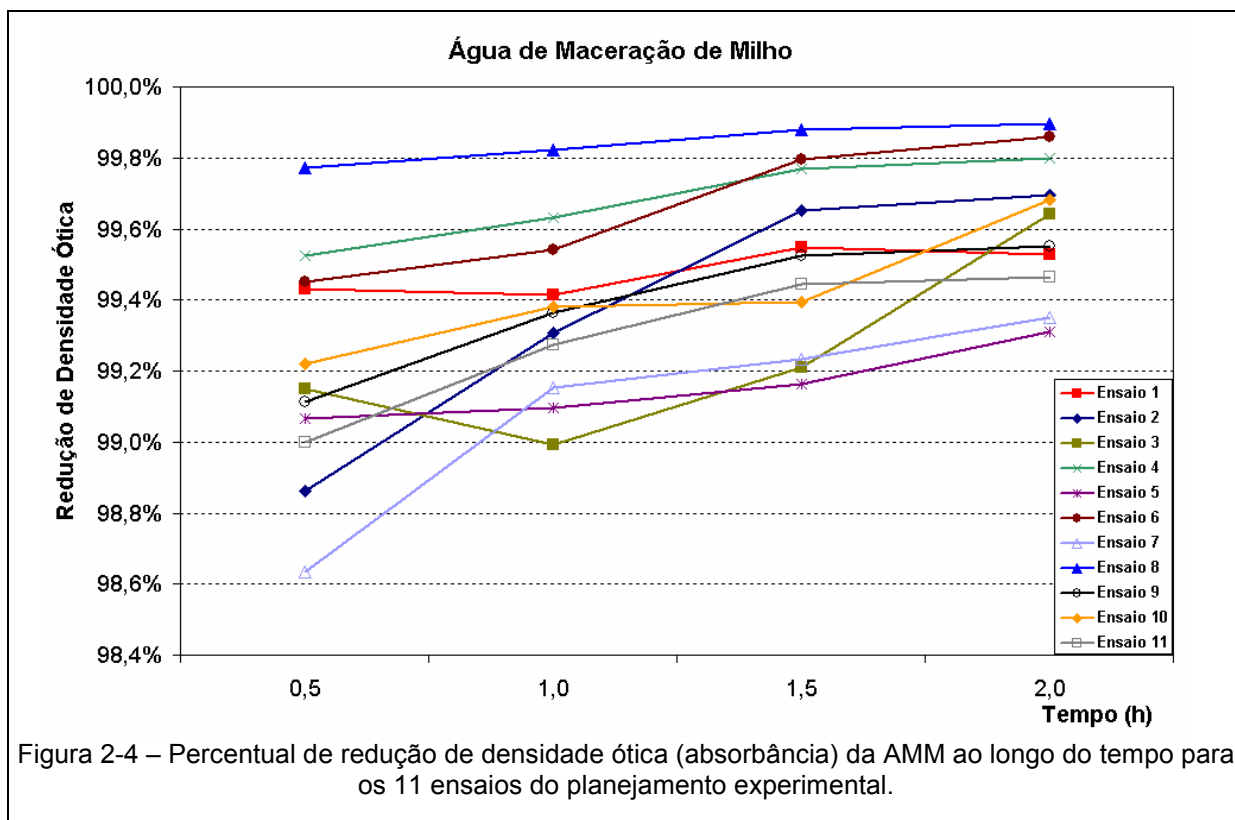


Figura 2-3 – Amostras melaço ensaio 6 (70°C – 8,8% carvão) - Frente → Após centrifugação: 30, 60; 90, 120 minutos. Fundo → Sem tratamento; Não-centrifugado (30, 60; 90 e 120 minutos, respectivamente)

Tabela 2-4 – Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de leitura de densidade ótica (DO) para a água de maceração de milho após 30, 60, 90 e 120 minutos de tratamento.

Ensaio	Carvão (%)	Temperatura (°C)	Tempo			
			0,5 h	1,0 h	1,5 h	2,0 h
			DO (600nm)	DO (600nm)	DO (600nm)	DO (600nm)
01	4,0 (-1)	60 (-1)	0,023	0,024	0,018	0,019
02	8,0 (+1)	60 (-1)	0,046	0,028	0,014	0,012
03	4,0 (-1)	80 (+1)	0,040	0,034	0,032	0,014
04	8,0 (+1)	80 (+1)	0,019	0,015	0,009	0,008
05	3,2 (-1,41)	70 (0)	0,038	0,037	0,034	0,028
06	8,8 (+1,41)	70 (0)	0,022	0,019	0,008	0,006
07	6,0 (0)	56 (-1,41)	0,054	0,033	0,030	0,025
08	6,0 (0)	84 (+1,41)	0,009	0,007	0,005	0,004
09	6,0 (0)	70 (0)	0,035	0,025	0,019	0,018
10	6,0 (0)	70 (0)	0,032	0,025	0,025	0,013
11	6,0 (0)	70 (0)	0,040	0,029	0,022	0,022

Densidade ótica (600 nm) antes do pré-tratamento: AMM =4,020



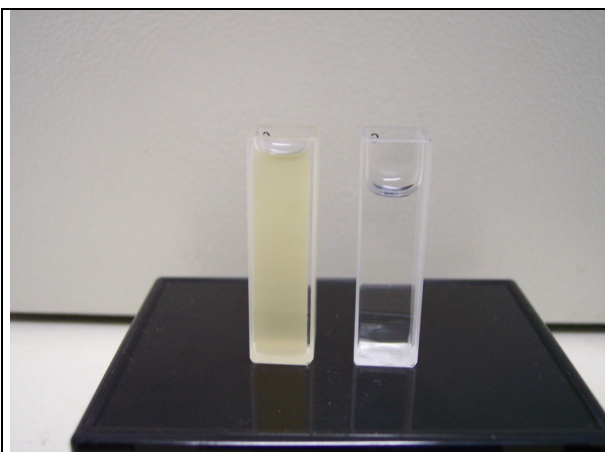


Figura 2-5 - AMM – Direita: Tratamento ensaio 03 (80°C –4%Carvão); Esquerda: Amostra não-tratada.

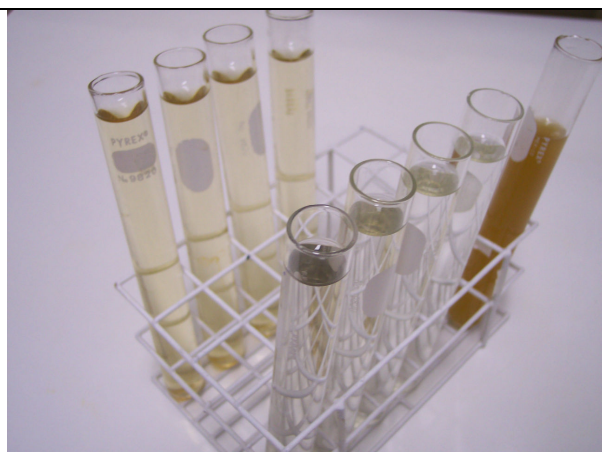


Figura 2-6 - AMM – Frente → ensaio 6 (70°C – 8,4% carvão; 30, 60; 90, 120 minutos e não-tratado). Fundo → ensaio 5 (70°C – 3,2% carvão, 30, 60; 90 e 120 minutos).

Ao final deste capítulo, segue Anexo (item 2-7) com as matrizes de delineamento e respostas de densidade ótica para o melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho, bem como os coeficientes de regressão e análises de variância para os tempos de 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h e 2,0 h.

Em seguida, visando reduzir ainda mais os custos do processo e minimizar a perda de substratos, adotou-se o ensaio 1 (60°C e 4% carvão) para avaliação da redução de densidade ótica e perda de açúcares redutores em 10, 20, 30 e 40 minutos de pré-tratamento com carvão ativo. A Tabela 2-5 apresenta os resultados obtidos durante a realização destes pré-tratamentos.

Tabela 2-5 – Resultados de densidade ótica (DO) e perda de açúcares redutores totais (PART) após 10, 20, 30 e 40 minutos de pré-tratamento com 4% (p/p) de carvão ativo a 60°C.

Amostras	Análises	Tempo (minutos)			
		10	20	30	40
Melaço	DO (600 nm)	0,101	0,102	0,100	0,094
	PART(%)	8,5	9,7	10,5	18,0
AMM	DO (600 nm)	0,022	0,026	0,028	0,027

Densidade ótica (600 nm) antes do pré-tratamento: Melaço = 0,682; AMM =1,411 (solução diluída 1:3)

Analisando estes resultados, nota-se que o pré-tratamento por um período de 10 minutos, acarretou uma perda de 8,5% na concentração de açúcares redutores totais do meio e uma redução de densidade ótica de cerca de 99% da AMM e 85% do melaço. Ou

seja, nas condições analisadas até mesmo um tratamento de 10 minutos permite uma redução de densidade ótica considerável e minimiza as perdas de nutrientes essenciais para a etapa fermentativa (Tabela 2-6). A Figura 2-7 apresenta as amostras de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho antes e depois dos pré-tratamentos realizados nesta etapa.

Tabela 2-6- Resultados analíticos das amostras de água de maceração de milho (AMM) e melaço de cana-de-açúcar (MEL) numa concentração de 200 g/L tratadas por 10 minutos com 4% (p/p) de carvão ativo a 60°C e não-tratadas.

Parâmetro	Unidade	AMM não tratada	AMM tratada	MEL não tratado	MEL tratado
Carbono ¹	% m/m	4,12 ± 0,2	3,60 ± 0,04	6,0 ± 0,1	5,7 ± 0,2
Nitrogênio ¹	% m/m	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2	<0,5	<0,5
Fenóis totais	mg/kg	< LD ³ (87,5)	< LD (87,5)	< LD (87,5)	< LD (87,5)
Ferro ²	% m/m	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
Magnésio ²	% m/m	0,103 ± 0,001	0,102 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,020 ± 0,001
Potássio ²	% m/m	<LQ ⁴ (0,313)	<LQ ⁴ (0,313)	<LQ ⁴ (0,313)	<LQ (0,313)
Zinco ²	mg/kg	16,4 ± 6	< LQ (16)	< LQ (16)	< LQ (16)

1. Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão.

2. Resultados expressos com intervalo de confiança de 95% e dois graus de liberdade.

3. LD: Limite de Detecção

4. LQ: Limite de Quantificação



Figura 2-7 – Amostras de melaço (frente) e água de maceração de milho (fundo) após 10, 20, 30 e 40 minutos de pré-tratamento e sem pré-tratamento, respectivamente.

2.4.2. Testes de purificação e recuperação para validação do pré-tratamento adotado

Considerando o tratamento de 10 minutos a 60°C e 4,0% de carvão ativo Carvorite ANFC, realizou-se o pré-tratamento dos substratos industriais AMM e MEL separadamente com base nos resultados obtidos por TREICHEL (2004). Após as 72 horas do processo fermentativo, foram injetados na coluna de leito expandido 142 mL de caldo bruto fermentado com 20 U/mL, totalizando 2840 U. Foi alimentado o caldo bruto fermentado no leito expandido, não sendo observado a formação de tortas na saída da coluna, fenômeno este observado por MAKINO (2004) e que tinha como consequência o entupimento do leito ao longo do processo de purificação e recuperação. A recuperação da enzima foi de aproximadamente 30% na eluição de gradiente salino conforme apresentado no cromatograma de purificação (Figura 2-8).

Trabalhos futuros serão realizados para otimização da purificação e recuperação pelo estudo das condições de adsorção e eluição desta enzima produzida a partir de meios industriais pré-tratados. Pretende-se atingir os níveis de 100% de recuperação de inulinase na eluição e purificação de 24 vezes obtidos por MAKINO (2004) a partir de meios sintéticos.

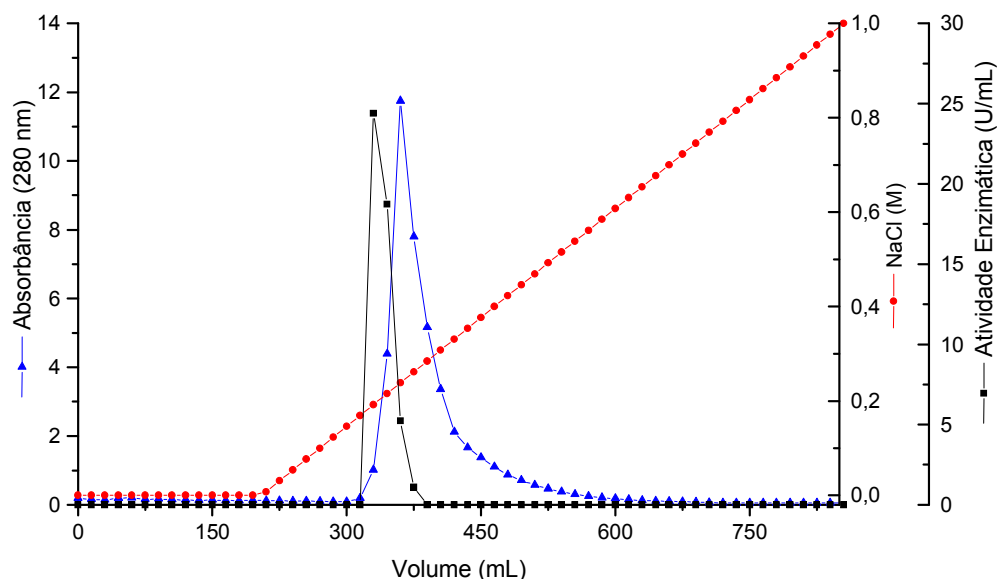


Figura 2-8 – Cromatograma da purificação de inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-7571 em leito expandido com tampão fosfato.

2.5. CONCLUSÕES

O pré-tratamento de água de maceração de milho e melaço de cana-de-açúcar com carvão ativo reduziu a formação de aglomerados ao longo da fermentação por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, viabilizando assim a recuperação e purificação de inulinase através da alimentação direta do caldo bruto fermentado em coluna de leito expandido. Deste modo foi possível definir as seguintes condições para o pré-tratamento destes substratos industriais: concentração de carvão ativo Carvorite tipo ANFC de 4% (p/p), temperatura do processo igual 60°C, sob agitação de 150 rpm durante 10 minutos e posterior filtração e centrifugação a 10.000 rpm numa faixa de temperatura entre 4 e 6°C por 15 minutos.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. (1987) Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.26, p.13-20.
- KABKE, K. (2002) Otimização da produção de inulinase em meio industria através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus*. *Tese de Mestrado*, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp.
- KIM,C.H.; RHEE,S.K. (1989) Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin, *Biotechnology Letters*, v.11,p.201-206.
- KIM,D.H.; CHOI,Y.J.; SONG,S.K.; YUN,J.W. (1997) Production of Inulo-oligosaccharides Using Endo-inulinase from a *Pseudomonas sp.*, *Biotechnology Letters*, v.19,p.369-371.
- MAKINO, Y. (2004) Produção e purificação em leito expandido de inulinase obtida a partir de espécies de *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos. *Tese de Doutorado*, Fac. Eng. de Alimentos – Unicamp.

MILLER, G.L (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*,v.31, p.426-428.

ROUKAS, T. (1998) Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*. v.33, n. 8, p.805-810.

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

2.7. ANEXO

Melaço de Cana-de-Açúcar 200 g/L (140 g/L ART):

Matriz de delineamento e resposta de densidade ótica em 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h e 2,0h.

Ensaio	Carvão Ativo (%p/p)	Temperatura (°C)	Carvão ativo - Codificado	Temp - Codificado	Densidade Ótica (600 nm) - Absorbância			
					Tempo 0,5 h	Tempo 1,0 h	Tempo 1,5 h	Tempo 2,0h
1	4,0	60	-1	-1	0,105	0,099	0,083	0,085
2	8,0	60	1	-1	0,014	0,012	0,011	0,009
3	4,0	80	-1	1	0,079	0,072	0,056	0,053
4	8,0	80	1	1	0,008	0,005	0,003	0,001
5	3,2	70	-1,41	0	0,113	0,110	0,107	0,090
6	8,8	70	1,41	0	0,050	0,047	0,043	0,041
7	6,0	56	0	-1,41	0,186	0,196	0,196	0,185
8	6,0	84	0	1,41	0,008	0,006	0,004	0,003
9	6,0	70	0	0	0,036	0,020	0,020	0,017
10	6,0	70	0	0	0,038	0,032	0,027	0,018
11	6,0	70	0	0	0,037	0,030	0,024	0,020

Matriz de delineamento e resposta de redução de densidade ótica em 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h e 2,0h.

Ensaio	Carvão Ativo (%p/p)	Temperatura (°C)	Carvão ativo - Codificado	Temp - Codificado	Redução Densidade Ótica (%)			
					Tempo 0,5 h	Tempo 1,0 h	Tempo 1,5 h	Tempo 2,0h
1	4,0	60	-1	-1	84,52	85,41	87,78	87,50
2	8,0	60	1	-1	97,91	98,20	98,43	98,72
3	4,0	80	-1	1	88,44	89,46	91,78	92,31
4	8,0	80	1	1	98,91	99,34	99,61	99,93
5	3,2	70	-1,41	0	83,59	84,07	84,50	86,92
6	8,8	70	1,41	0	92,79	93,16	93,71	94,05
7	6,0	56	0	-1,41	71,88	70,31	70,35	71,99
8	6,0	84	0	1,41	98,83	99,18	99,40	99,52
9	6,0	70	0	0	94,74	97,05	97,09	97,53
10	6,0	70	0	0	94,39	95,33	95,99	97,30
11	6,0	70	0	0	94,58	95,65	96,41	97,09

Considerando os valores codificados na análise e que:

Carvão (% p/p) = variável x1

Temperatura (°C) = variável x2

Tempo 0,5 hora:

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	94,57	3,80	24,88	1,96E-06	84,80	104,34
x1 (L)	4,61	2,33	1,98	0,104661	-1,38	10,59
x1 (Q)	-1,77	2,77	-0,64	0,550812	-8,89	5,35
x2 (L)	5,38	2,33	2,31	0,068845	-0,60	11,36
x2 (Q)	-3,19	2,77	-1,15	0,301973	-10,31	3,93
x1 x2	-0,73	3,29	-0,22	0,832638	-9,20	7,73

$R^2 = 0,68$ QM-Resíduo: 43,35

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q), x2(Q) e x1x2:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(8)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	90,96	1,79	50,94	2,44E-11	86,84	95,08
x1 (L)	4,61	2,09	2,20	0,058937	-0,22	9,44
x2 (L)	5,38	2,09	2,57	0,033179	0,55	10,21

$R^2 = 0,59$ QM-Resíduo: 35,07

ANOVA para redução de densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	401,33	2	200,67	5,72	0,029
Resíduos	280,59	8	35,07		
Total	681,92	10	68,192		

% variação explicada (R^2) = 58,85; $F_{2;8; 0,05} = 4,46$

Tempo 1,0 hora:

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	96,01	4,12	23,28	2,7204E-06	85,41	106,61
x1 (L)	4,44	2,53	1,76	0,13893096	-2,05	10,93
x1 (Q)	-2,09	3,01	-0,70	0,51791618	-9,82	5,64
x2 (L)	5,75	2,53	2,28	0,07170712	-0,74	12,24
x2 (Q)	-4,03	3,01	-1,34	0,23812605	-11,75	3,70
x1 x2	-0,73	3,57	-0,20	0,84651541	-9,91	8,45

$R^2 = 0,67$ QM-Resíduo: 51,01

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q), x2(Q) e x1x2:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(8)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	91,56	2,01	45,67	5,8405E-11	86,94	96,18
x1 (L)	4,44	2,35	1,89	0,09555551	-0,98	9,86
x2 (L)	5,75	2,35	2,45	0,04013309	0,33	11,17

$R^2 = 0,54$ QM-Resíduo: 44,22

ANOVA para redução de densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	422,56	2	211,28	4,78	0,043
Resíduos	353,76	8	44,22		
Total	776,33	10	77,63		

% variação explicada (R^2) = 54,43; $F_{2;8; 0,05} = 4,46$

Tempo 1,5 hora:

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	96,50	4,28	22,53	3,1992E-06	85,49	107,51
x1 (L)	3,94	2,62	1,50	0,19367077	-2,81	10,68
x1 (Q)	-1,84	3,12	-0,59	0,58058624	-9,87	6,18
x2 (L)	5,78	2,62	2,21	0,07859719	-0,96	12,52
x2 (Q)	-3,96	3,12	-1,27	0,26052637	-11,98	4,06
x1 x2	-0,71	3,71	-0,19	0,85669519	-10,24	8,83

$R^2 = 0,64$ QM-Resíduo: 51,01

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q), x2(Q) e x1x2:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(8)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	92,28	2,05	45,10	6,4528E-11	87,56	97,00
x1 (L)	3,94	2,40	1,64	0,13952578	-1,60	9,47
x2 (L)	5,78	2,40	2,41	0,04250362	0,25	11,32

$R^2 = 0,51$ QM-Resíduo: 46,05

ANOVA para redução de densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	391,44	2	195,72	4,25	0,055
Resíduos	368,43	8	46,05		
Total	759,87	10	75,99		

% variação explicada (R^2) = 51,51; $F_{2;8; 0,05} = 4,46$

Tempo 2,0 horas:

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Lim. Conf. – 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	97,31	3,91	24,88	1,9588E-06	87,25	107,36
x1 (L)	3,61	2,40	1,51	0,19178048	-2,54	9,77
x1 (Q)	-1,79	2,85	-0,63	0,55853681	-9,12	5,54
x2 (L)	5,62	2,40	2,35	0,06593744	-0,54	11,78
x2 (Q)	-4,15	2,85	-1,46	0,20509538	-11,48	3,18
x1 x2	-0,90	3,39	-0,27	0,80117083	-9,61	7,81

$R^2 = 0,67$ QM-Resíduo: 45,90

Coeficientes de Regressão para a resposta redução de densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q), x2(Q) e x1x2:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(8)	p - valor	Lim. Conf. – 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	92,99	1,94	47,87	4,0131E-11	88,51	97,47
x1 (L)	3,61	2,28	1,59	0,15130703	-1,64	8,87
x2 (L)	5,62	2,28	2,47	0,03892824	0,37	10,87

$R^2 = 0,51$ QM-Resíduo: 41, 51

ANOVA para redução de densidade ótica

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	356,99	2	178,49	4,30	0,054
Resíduos	332,09	8	41,51		
Total	689,07	10	68,91		

% variação explicada (R^2) = 51,80; $F_{2;8; 0,05} = 4,46$

Água de Maceração de Milho 200 g/L:

Matriz de delineamento e resposta de densidade ótica em 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h e 2,0h.

Ensaio	Carvão Ativo (%p/p)	Temperatura (°C)	Carvão ativo - Codificado	Temp - Codificado	Densidade Ótica (600 nm) - Absorbância			
					Tempo 0,5 h	Tempo 1,0 h	Tempo 1,5 h	Tempo 2,0h
1	4,0	60	-1	-1	0,0229	0,0236	0,0182	0,019
2	8,0	60	1	-1	0,0459	0,028	0,014	0,0123
3	4,0	80	-1	1	0,0404	0,0341	0,0316	0,0143
4	8,0	80	1	1	0,019	0,0147	0,0092	0,008
5	3,2	70	-1,41	0	0,0382	0,0369	0,0342	0,0282
6	8,8	70	1,41	0	0,022	0,0187	0,0083	0,0058
7	6,0	56	0	-1,41	0,0535	0,0331	0,03	0,0254
8	6,0	84	0	1,41	0,0092	0,0072	0,0049	0,0042
9	6,0	70	0	0	0,0353	0,0253	0,019	0,0179
10	6,0	70	0	0	0,0319	0,0253	0,0248	0,013
11	6,0	70	0	0	0,0404	0,029	0,0224	0,0216

Matriz de delineamento e resposta de redução de densidade ótica em 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h e 2,0h.

Ensaio	Carvão Ativo (%p/p)	Temperatura (°C)	Carvão ativo - Codificado	Temp - Codificado	Redução Densidade Ótica (%)			
					Tempo 0,5 h	Tempo 1,0 h	Tempo 1,5 h	Tempo 2,0h
1	4,0	60	-1	-1	99,43	99,42	99,55	99,53
2	8,0	60	1	-1	98,86	99,31	99,65	99,70
3	4,0	80	-1	1	99,15	98,99	99,21	99,64
4	8,0	80	1	1	99,53	99,63	99,77	99,80
5	3,2	70	-1,41	0	99,07	99,10	99,16	99,31
6	8,8	70	1,41	0	99,45	99,54	99,80	99,86
7	6,0	56	0	-1,41	98,63	99,15	99,23	99,35
8	6,0	84	0	1,41	99,77	99,82	99,88	99,90
9	6,0	70	0	0	99,11	99,37	99,52	99,55
10	6,0	70	0	0	99,22	99,38	99,39	99,68
11	6,0	70	0	0	99,00	99,27	99,45	99,47

Considerando os valores codificados na análise e que:

Carvão (% p/p) = variável x1

Temperatura (°C) = variável x2

Tempo 0,5 hora:

Coefficientes de Regressão para a resposta de densidade ótica:

	Coefficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,036	0,0025	14,52	0,00470924	0,025	0,046
x1 (L)	-0,003	0,0015	-1,76	0,2202882	-0,009	0,004
x1 (Q)	-0,003	0,0018	-1,42	0,29205852	-0,010	0,005
x2 (L)	-0,009	0,0015	-5,95	0,02706698	-0,016	-0,002
x2 (Q)	-0,002	0,0018	-1,07	0,39649083	-0,010	0,006
x1 x2	-0,011	0,0021	-5,19	0,03518985	-0,020	-0,002

$R^2 = 0,73$ Erro Puro: 0,000018

Coefficientes de Regressão para a resposta densidade ótica, ignorando variáveis x1(L), x1(Q) e x2(Q):

	Coefficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,033	0,0013	25,28	0,00156114	0,027	0,038
x2 (L)	-0,009	0,0015	-5,95	0,02706698	-0,016	-0,002
x1 x2	-0,011	0,0021	-5,19	0,03518985	-0,020	-0,002

$R^2 = 0,67$ Erro Puro: 0,000018

ANOVA para resposta densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	0,00114	2	0,00057	7,98	0,012
Resíduos	0,00057	8	0,00007		
Total	0,00171	10	0,00017		

% variação explicada (R^2) = 66,67; $F_{2;8; 0,05} = 4,46$

Tempo 1,0 hora:

Coeficientes de Regressão para a resposta de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p - valor	Lim. Conf. – 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,027	0,0012	21,51	0,00215364	0,021	0,032
x1 (L)	-0,005	0,0008	-6,74	0,02129657	-0,008	-0,002
x1 (Q)	0,001	0,0009	1,02	0,41600907	-0,003	0,005
x2 (L)	-0,005	0,0008	-6,53	0,02268724	-0,008	-0,002
x2 (Q)	-0,003	0,0009	-3,24	0,08360968	-0,007	0,001
x1 x2	-0,006	0,0011	-5,57	0,03074621	-0,011	-0,001

$R^2 = 0,78$ Erro Puro: 0,0000046

Coeficientes de Regressão para a resposta densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q) e x2(Q):

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p - valor	Lim. Conf. – 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,025	0,0006	38,94	0,00065878	0,0223	0,0279
x1 (L)	-0,005	0,0008	-6,74	0,02129657	-0,0083	-0,0018
x2 (L)	-0,005	0,0008	-6,53	0,02268724	-0,0082	-0,0017
x1 x2	-0,001	0,0003	0,95	0,00805898	-0,0024	0,0003

$R^2 = 0,70$ Erro Puro: 0,0000046

ANOVA para resposta densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	0,00054	3	0,00018	5,38	0,031
Resíduos	0,00024	7	0,00003		
Total	0,00078	10	0,00008		

% variação explicada (R^2) = 69,74; $F_{3;7; 0,05} = 4,35$

Tempo 1,5 hora:

Coeficientes de Regressão para a resposta de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p - valor	Lim. Conf. – 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,022	0,0017	13,11	0,00576389	0,015	0,029
x1 (L)	-0,008	0,0010	-7,67	0,01657465	-0,012	-0,003
x1 (Q)	-0,001	0,0012	-0,56	0,63343144	-0,006	0,005
x2 (L)	-0,003	0,0010	-3,26	0,0824701	-0,008	0,001
x2 (Q)	-0,003	0,0012	-2,11	0,1697567	-0,008	0,003
x1 x2	-0,005	0,0015	-3,12	0,08907342	-0,011	0,002

$R^2 = 0,72$ Erro Puro: 0,0000085

Coeficientes de Regressão para a resposta densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q) e x2(Q):

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p - valor	Lim. Conf. – 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,020	0,0009	22,41	0,00198545	0,0159	0,0235
x1 (L)	-0,008	0,0010	-7,67	0,01657465	-0,0123	-0,0035
x2 (L)	-0,003	0,0010	-3,26	0,0824701	-0,0078	0,0011
x1 x2	-0,005	0,0015	-3,12	0,08907342	-0,0108	0,0017

$R^2 = 0,68$ Erro Puro: 0,0000085

ANOVA para resposta densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{Calc}	p-valor
Regressão	0,00067	3	0,00022	5,02	0,036
Resíduos	0,00031	7	0,00004		
Total	0,00099	10	0,00010		

% variação explicada (R^2) = 68,25; $F_{3;7; 0,05} = 4,35$

Tempo 2,0 horas:

Coeficientes de Regressão para a resposta de densidade ótica:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,0175	0,0031	5,56	0,00257938	0,009	0,026
x1 (L)	-0,0056	0,0019	-2,90	0,03379463	-0,011	-0,001
x1 (Q)	-0,0009	0,0023	-0,38	0,7183502	-0,007	0,005
x2 (L)	-0,0049	0,0019	-2,53	0,05252188	-0,010	0,000
x2 (Q)	-0,0020	0,0023	-0,86	0,4282814	-0,008	0,004
x1 x2	0,0001	0,0027	0,04	0,9721319	-0,007	0,007

$R^2 = 0,75$ QM-Resíduo: 0,0000297

Coeficientes de Regressão para a resposta densidade ótica, ignorando variáveis x1(Q), x2(Q) e x1x2:

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(8)	p - valor	Lim. Conf. - 95 %	Lim. Conf. + 95%
Média	0,0154	0,0014	11,07	3,959E-06	0,0122	0,0186
x1 (L)	-0,0056	0,0016	-3,42	0,00912761	-0,0094	-0,0018
x2 (L)	-0,0049	0,0016	-2,98	0,01756464	-0,0086	-0,0011

$R^2 = 0,72$ QM-Resíduo: 0,0000214

ANOVA para resposta densidade ótica:

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	0,00044	2	0,00022	10,27	0,006
Resíduos	0,00017	8	0,00002		
Total	0,00061	10	0,00006		

% variação explicada (R^2) = 71,93; $F_{2;8; 0,05} = 4,46$

CAPÍTULO 3

Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em meios industriais no processo batelada alimentada e batelada simples*

Guilherme Lopes Mendes, Francisco Maugeri Filho e Maria Isabel Rodrigues

Universidade Estadual de Campinas – Depto. de Engenharia de Alimentos
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos
Caixa Postal 6121 – 13083-862 – Campinas/SP - E-mail: guilopes@fea.unicamp.br

* Trabalho apresentado no 6º SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, realizado em Campinas/SP de 7 a 10 de novembro 2005.

3.1. RESUMO

*A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina e também na produção de frutooligossacarídeos. Os frutooligossacarídeos, prebióticos utilizados como ingredientes funcionais em alimentos, têm atraído especial atenção pelo estímulo ao aumento da população de bifidobactérias, bactérias benéficas que sintetizam antibióticos naturais e vitaminas importantes, como as do complexo B. A produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 a partir de meios industriais compostos por melaço de cana-de-açúcar (MEL) e água de maceração de milho (AMM) foi estudada em reatores operando em batelada alimentada. Partiu-se do meio fermentativo otimizado em frascos agitados (MEL 150 g/L, AMM 50 g/L e Extrato de Levedura 6 g/L) para definição das concentrações iniciais de cada substrato. Após a exaustão da fonte de carbono contida no meio inicial ocorre um aumento gradativo no pH até o final do processo fermentativo indicando a necessidade de substrato. Sendo assim, efetuou-se o controle de alimentação por “feedback” pela manutenção de pH do meio a 4,5. O processo em reator de bancada com agitação de 450 rpm (pás inclinadas), aeração de 1,5 vvm e temperatura de 36°C atingiu uma atividade enzimática máxima igual a 562 U/mL e uma concentração de biomassa final de 45 g/L.*

3.2. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de enzimas movimenta US\$ 1,8 bilhão, centralizados na Europa e Estados Unidos. Segundo BOON (2000), o Brasil, apesar de cerca de 500 pesquisadores na área, é um país totalmente dependente em biocatalisadores, onde a comercialização atinge US\$ 45 milhões, dos quais US\$ 35 milhões referentes à importação.

As inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando a inulina como matéria-prima (ETTALIBI e BARATTI, 1987). As inulinases também têm sido utilizadas na produção de oligossacarídeos (KIM *et al.*, 1997).

Diversos microrganismos podem ser utilizados para produzir inulinase, e a seleção destes dependerá de suas características fisiológicas. Além disso, para o uso de algum microrganismo deve-se considerar o fato desses pertencerem ao grupo GRAS ("Generally Recognized as Safe") e serem aceitos pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos para produtos alimentícios (SCHNEIDER, 1998). Neste contexto encontra-se o gênero *Kluyveromyces*, o que o torna muito interessante comercialmente.

A vantagem de utilizar microrganismos do gênero *Kluyveromyces sp.* consiste na alta produtividade da enzima inulinase, tanto em meio sintético (KALIL, 2000; VRANESIC *et al.*, 2002 e SANTOS, 2002) quanto em meio industrial (TREICHEL, 2001 e 2004; MAKINO, 2001 e 2004; KABKE, 2002).

A produção de inulinase vem sendo estudada há alguns anos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB-FEA-Unicamp) utilizando sacarose e melaço como fontes de carbono, já que a obtenção desta enzima através de inulina inviabiliza sua produção devido ao custo deste indutor ser cerca de 1500 vezes superior ao custo de sacarose. A Tabela 3-1 resume a evolução das pesquisas sobre a enzima inulinase realizadas neste laboratório. Inicialmente, COSTA (1986) trabalhando com *Kluyveromyces bulgarius* ATCC 16045 caracterizou a enzima produzida, até então denominada invertase. Estudos posteriores (SANTOS, 1998) mostraram que esta enzima também apresentava

atividade sobre a inulina e que poderia ser denominada inulinase. O pH e temperaturas ótimos de atuação da enzima sobre a sacarose foram ao redor de 4,0 e 50-60°C, respectivamente. KALIL (2000) otimizou a produção de inulinase por *Kluyveromyces bulgarius* ATCC 16045 em frascos agitados, utilizando a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta. TREICHEL (2001) reduziu o custo de produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 em cerca de 50 vezes, ao alterar o meio sintético utilizado por SANTOS (1998) e KALIL (2000), para o meio industrial. Além disso, com os estudos de otimização utilizando a metodologia do planejamento experimental TREICHEL (2001) obteve uma atividade enzimática igual a 138 U/mL. MAKINO (2001) realizou estudos de seleção entre 10 linhagens de *Kluyveromyces marxianus* tendo as linhagens NCYC 587 e NRRL Y-7571 sido selecionadas como melhores produtoras, nas condições de estudo. Assim, partindo do meio industrial utilizado por TREICHEL (2001) foram realizados estudos de otimização da composição do meio para as cepas selecionadas e obtiveram-se atividades enzimáticas ao redor de 700 U/mL em 72 horas de fermentação. KABKE (2002) utilizando cepas selecionadas por MAKINO (2001) continuou os estudos de otimização com as linhagens, obtendo atividade máxima igual a 91,05 U/mL para a linhagem NRRL Y-610, 84,98 U/mL para linhagem NRRL Y-1196 e 1500 U/mL para a linhagem NCYC 587, diminuindo ainda mais o custo de produção. TREICHEL (2004) otimizou o meio industrial composto por melaço e água de maceração de milho pré-tratados para produção de inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-7571 em frascos agitados atingindo atividade máxima igual a 1300 U/mL após 72 horas de fermentação.

A inulinase é descrita como uma enzima que sofre repressão catabólica em concentrações elevadas de substrato. Segundo PAREKH e MARGARITIS (1985), a síntese da inulinase é controlada por repressão catabólica, sendo que as maiores produções de inulinase foram observadas no final da fase de crescimento, mostrando que, aparentemente, baixas concentrações da fonte de carbono foram o pré-requisito para formação da enzima.

Entretanto, em processos fermentativos de bateladas convencionais, a excreção, em baixas concentrações, de metabólicos está provavelmente relacionada com a elevada concentração inicial de substrato presente no meio. De acordo com HENSING *et al.* (1994), *K. marxianus* CBS 6556 possui forte tendência para produzir piruvato e acetato quando expostos a quantidades excessivas de açúcar. Sendo a síntese de inulinase por *K. marxianus* inibida quando o meio de crescimento não possui fonte limitada de sacarose (ROWENHORST *et al.* 1988; PAREKH e MARGARITIS 1985; GROOTWASSINK e HEWITT, 1983). Em razão disso, neste trabalho iniciou-se o estudo de condições de crescimento em meios com limitadas concentrações de carbono para produção de inulinase.

Tabela 3-1 - Evolução das pesquisas relacionadas a enzima inulinase realizadas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB-FEA-Unicamp).

AUTOR	Ano	Microrganismo (tipo reator)	Composição do meio	Atividade U/mL
COSTA, F. A. A.	1986	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> ATCC 16045 (frascos agitados)	Melaço: 21 g/L	16,7
			Ext. Lev: 10 g/L	
			Peptona: 20 g/L	
SANTOS, A. M. P.	1998	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> ATCC 16045 (frascos agitados)	Sacarose: 30 g/L	7,5
			Ext. Lev: 10 g/L	
			Peptona: 20 g/L	
			K ₂ HPO ₄ : 5 g/L	
KALIL, S. J.	2000	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> ATCC 16045 (frascos agitados)	Sacarose: 14 g/L	127
			Ext. Lev: 10 g/L	
			Peptona: 20 g/L	
			K ₂ HPO ₄ : 1 g/L	
TREICHEL, H	2001	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> ATCC 16045 (frascos agitados)	Melaço: 80 g/L	113
			AMM*: 50 g/L	
			Prodex**: 4,5 g/L	
TREICHEL, H.	2001	<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> ATCC 16045 (frascos agitados)	Melaço: 90 g/L	138
			AMM: 45 g/L	
			Ext. Lev: 4 g/L	
			K ₂ HPO ₄ : 1 g/L	
MAKINO, Y.	2001	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 (frascos agitados)	Melaço: 90 g/L	800
			AMM: 45 g/L	
			Ext. Lev: 4 g/L	
KABKE, K. C. P.	2002	<i>K. marxianus</i> NCYC 587 (frascos agitados)	Melaço: 110 g/L	1450
			AMM: 60 g/L	
			Prodex: 5 g/L	
TREICHEL, H.	2004	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 (frascos agitados)	Melaço: 150 g/L	1300
			AMM: 50 g/L	
			Ext. Lev: 6 g/L	

* AMM: Água de maceração de milho (Corn Products - Mogi Guaçu – SP);

**Prodexlac® (Indústria Prodesa, Valinhos – SP)

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Pré-tratamento do meio industrial

Cada substrato industrial, melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho, foi pré-tratado separadamente numa concentração de 200 g/L nas condições otimizadas na etapa anterior: carvão ativo Carvorite tipo ANFC em concentração de 4% (p/p), temperatura do processo igual a 60°C, sob agitação de 150 rpm em agitador orbital Psycrotherm (New Brunswick Scientific, N. J.) durante 10 minutos e posterior filtração e centrifugação a 10.000 rpm numa faixa de temperatura entre 4 e 6°C por 15 minutos (Dupont Sorvall RC 26 Plus, Boston, USA).

3.3.2. Manutenção da Cultura e Preparo do Inóculo:

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi repicado de ágar inclinado de meio YM (extrato de malte 3g/L; extrato de levedura 3 g/L; peptona 5g/L; glicose 10 g/L) para tubo de ensaio contendo caldo do mesmo meio, num volume de 10 mL. O meio foi incubado por 24 horas a 30°C e 150 rpm em agitador orbital Psycrotherm (New Brunswick Scientific, N.J). Cada tubo de ensaio foi usado como pré-inóculo. O pré-inóculo foi adicionado em frascos erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL do meio para obtenção do inóculo com a seguinte composição: sacarose 20,0 g.L⁻¹; extrato de levedura 5,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄ 5,0 g.L⁻¹; NH₄Cl 1,5 g.L⁻¹; KCl 1,15 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,65 g.L⁻¹ (KABKE, 2002). A esterilização do meio foi realizada a 121°C por 15 minutos.

3.3.3. Produção de Inulinase

Os ensaios foram realizados em bioreator (New Brunswick Scientific Bioflo3000, Edison, USA) com volume útil de 5 litros, volume inicial de 2,0 litros a 36°C, sob agitação de 450 rpm (pás inclinadas) e aeração controlada manualmente em 1,5 vvm. O volume do inóculo adicionado foi de 200 mL. O meio fermentativo da fase inicial em batelada simples foi definido em cada ensaio com base nos estudos de TREICHEL (2004) que otimizou este meio fermentativo em

frascos agitados e reator de bancada. Definiu-se a concentração dos substratos não-alimentados no volume inicial de 2,0 litros considerando o volume útil do reator. Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O sistema de monitoramento fermentativo foi realizado em programa desenvolvido por ATALA (2004), codificado na linguagem G usando o software LabView 6.1 National Instruments . A Figura 3-1 apresenta a “interface home machine” (IHM) do programa de controle e monitoração do fermentador.

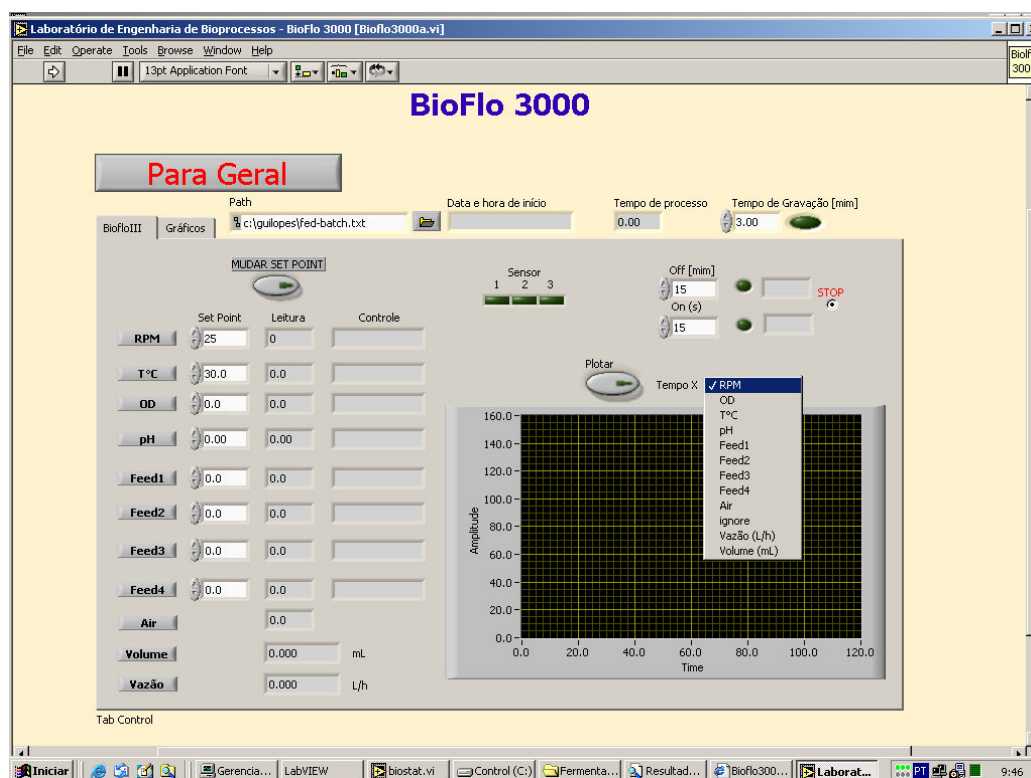


Figura 3-1 – IHM de monitoração e controle de processo fermentativo.

3.3.4. Determinação dos parâmetros da fermentação

- Rendimento biomassa/substrato ($Y_{x/s}$) foi determinado pela razão entre a velocidade de crescimento celular (dX/dt) e velocidade de consumo de substrato. ($-dS/dt$):

$$Y_{x/s} = \frac{\frac{dX}{dt}}{-\frac{dS}{dt}} \quad \text{Equação 3-1}$$

- Velocidade específica de crescimento celular (μ) [h^{-1}] :

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 3-2}$$

- Cinética de crescimento de Monod, modelo não-estruturado:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Equação 3-3}$$

- Velocidade específica de produção de inulinase (q_p) [$\text{U} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$]:

$$q_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad \text{Equação 3-4}$$

Onde:

$\mu_{\max}$ = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1});

K_s = constante de Monod igual a concentração de substrato, quando $\mu = \mu_{\max}/2$ (g/L).

q_p = velocidade específica de produção de inulinase, U inulinase. (g biomassa) $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

S = concentração de substrato (g/L);

X = concentração de biomassa (g/L)

3.3.5. Vazão de Alimentação Exponencial

A Equação 3-5 apresenta a vazão de alimentação (F) atribuída durante os ensaios realizados com alimentação exponencial pré-determinada. Esta equação considera que a degradação de substrato ao longo do tempo ($-r_s = dS/dt$) é basicamente realizada para formação de biomassa ($dX/dt = \mu \cdot M_x / Y_{xs}$).

$$F = \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} \right) \cdot \left(\frac{V_o \cdot X_o}{S_a} \right) \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Equação 3-5}$$

Onde:

F = Vazão (L.h⁻¹)

μ = Velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

Y_{xs} = Rendimento biomassa/substrato (g.g⁻¹)

V_o = Volume inicial (L)

X_o = Concentração de biomassa inicial (g.L⁻¹)

S_a = Concentração de substrato na alimentação (g.L⁻¹)

t = tempo (h)

V_o·X_o = M_{xo} = Biomassa Inicial (g)

3.3.6. Metodologia analítica

a. Determinação de Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. Baseado no estudo da estabilidade da enzima inulinase realizado por TREICHEL (2004), o método consiste na utilização de frascos incubados em banho termoeletrizado a 50°C com agitação. Nos frascos são adicionados 4,5 mL de solução de sacarose a 2 %, preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,6 e 0,5 mL da amostra convenientemente diluída. São retiradas amostras de 1,0 mL nos intervalos de tempo 2, 4, 6 e 8 minutos e determina-se a concentração de açúcares redutores pelo método de DNS. Uma unidade por mililitro de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar 1 μmol/mL de sacarose por minuto.

b. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

Foi utilizado o método de DNS (MILLER,1959).

c. Determinação de Biomassa:

A determinação de massa seca na amostra foi feita espectrofotometricamente através da leitura da absorbância a 600 nm, utilizando água destilada para calibração do aparelho. Para avaliação da massa celular construiu-se uma curva-padrão de densidade ótica *versus* massa seca, sendo obtida após secagem da amostra em estufa (50°C). Paralelamente, fez-se diluições sucessivas do meio fermentado e mediu-se a densidade ótica. A partir da densidade ótica determinou-se indiretamente a massa seca para cada diluição.

d. Quantificação de metabólicos secundários

Concentrações de sacarose, glicose, frutose, glicerol, acetato de sódio e glicerol ao longo dos ensaios fermentativos foram determinadas por HPLC constituído de Sistema de Bombeamento de Solvente modelo 9010, Detector de Índice de Refração modelo RI-4, 9095 Injetor automático de amostras (Varian, Walnut Creek, USA), Termostato de Coluna SPH99 (Spark Holland, Emmen, Holanda), Software Millennium Chromatography Manager v. 2.10 (Waters, Milford, USA), em coluna de troca aniônica HPX87H (Biorad Laboratories, Hercules, USA) a 30 °C, usando solução de ácido sulfúrico pH 1,4 como fase móvel a um fluxo de 0,7 mL/min.

e. Determinação de Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido no meio foi medido através de sensor polarográfico (Mettler Toledo InPro 6000, Schwerzenbach, Suíça).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Fermentação batelada simples

Foi realizado um ensaio preliminar no reator de bancada em batelada simples para definição dos parâmetros cinéticos, considerando o meio otimizado em frascos agitados por TREICHEL (2004). A Figura 3-2 apresenta os resultados do acompanhamento deste ensaio com meio fermentativo composto por melaço (150 g/L = 85 g/L ART), AMM (50 g/L) e extrato de levedura (6 g/L).

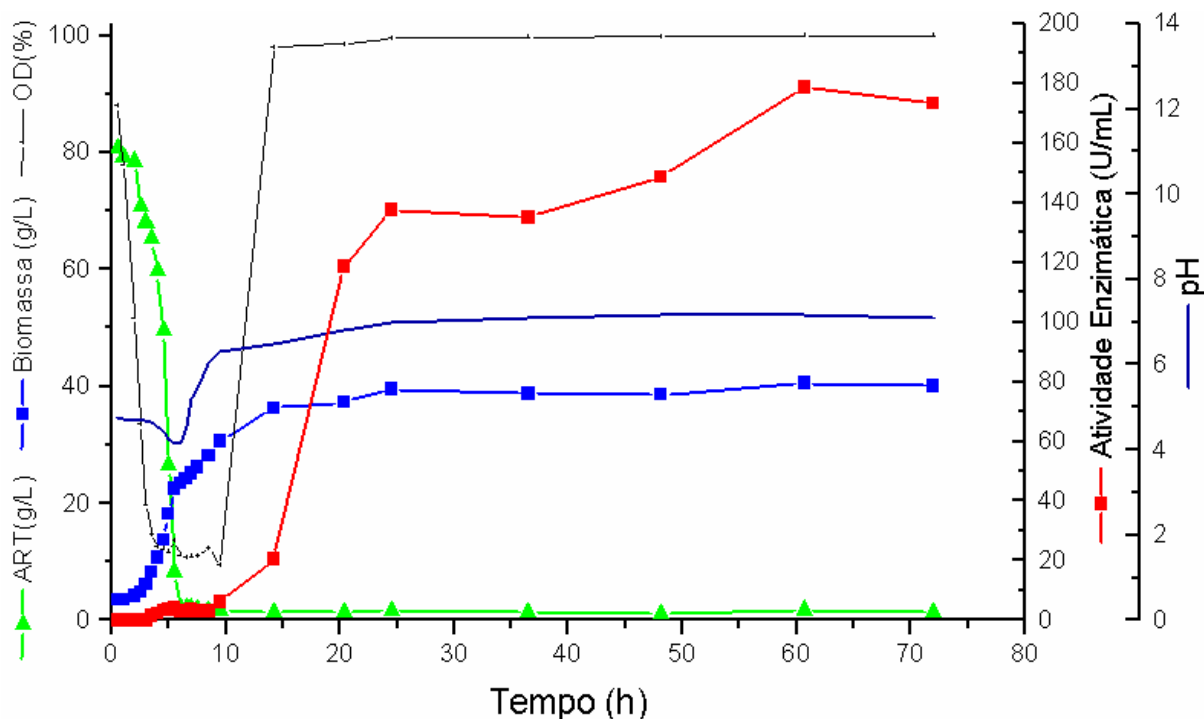


Figura 3-2 – Cinética da produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em processo de batelada simples utilizando meio industrial pré-tratado, aeração 1,5 vvm, 450 rpm de agitação (pás inclinadas) e volume útil de 2,0 L.

Após uma fase de adaptação de aproximadamente 2 horas, observa-se duas fases de crescimento celular distintas. Primeiramente, em presença de fonte de carbono o microrganismo cresce numa taxa de $5,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e há um decréscimo no pH do meio. Depois da exaustão dos açúcares redutores totais (ART) ocorrida em 6 horas, o microrganismo apresenta uma menor produtividade de biomassa igual a $2,00 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e um aumento de pH até 7,2. De acordo com SUZUKI *et al.* (1990), após a exaustão da glicose o pH eleva-se principalmente como resultado do aumento da concentração de íons amônio excretado pelas células.

Considerando a cinética de crescimento de Monod, definiu-se os parâmetros K_s e $\mu_{\max}$ através do ajustamento não-linear da curva obtida aos dados observados a 1% de significância pelo teste de qui-quadrado (χ^2) (Figura 3-3). A definição do rendimento $Y_{x/s}$ foi realizada pela regressão linear dos

valores de substrato *versus* biomassa (Figura 3-4). A Tabela 3-2 resume os parâmetros cinéticos, produções e rendimentos obtidos após 72 horas fermentativas.

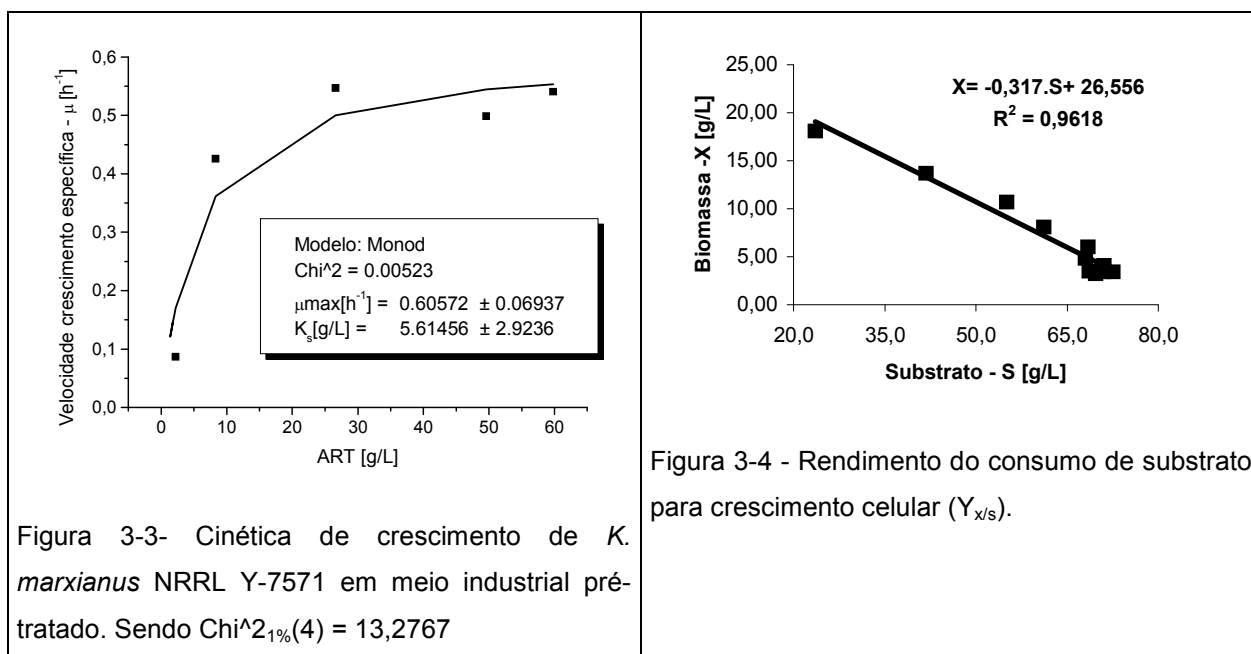


Tabela 3-2 – Produções, rendimentos, constantes e parâmetros cinéticos de *K. marxianus* NRRL Y-7571 em melaço 150 g/L (85 g/L ART), AMM 50 g/L e extr. levedura 6 g/L, 450 rpm, 1,5 vvm.

Parâmetro	Valores obtidos
Biomassa máxima	40,5 g/L
Atividade enzimática	178,0 U/mL
Velocidade máxima de crescimento específico (μ_{max})	0,606 h ⁻¹
Rendimento Biomassa/substrato ($Y_{x/s}$)	0,317 g.g ⁻¹
Concentração de substrato em $\mu_{max}/2$ (K_s)	5,61 g/L

Uma vez obtidos estes parâmetros, pode-se definir modelos de alimentação exponencial do meio de acordo com as taxas metabólicas do microrganismo em estudo.

3.4.2. Fermentação batelada alimentada

Fermentação com alimentação por “feedback” – controle pH pela adição de HCl 1,0 N e melão 200 g/L (pH 4,5)

Segundo os resultados de influência do pH na estabilidade enzimática obtidos por TREICHEL (2004), foi realizado um primeiro ensaio com alimentação definida pelo controle do pH a 4,5. Durante o consumo da fonte de carbono contida inicialmente no meio (30,8 g/L melão), ocorreu uma redução no pH devido a liberação de ácidos no meio. Entretanto, observou-se um aumento súbito de pH após 4 horas de fermentação indicando a necessidade de substrato. Sendo assim, foram ativados os controladores de pH do sistema pela adição em proporções iguais de melão 200 g/L (112 g/L ART, pH 4,5) e HCl 1,0 N até 75 horas de fermentação (Figura 3-5).

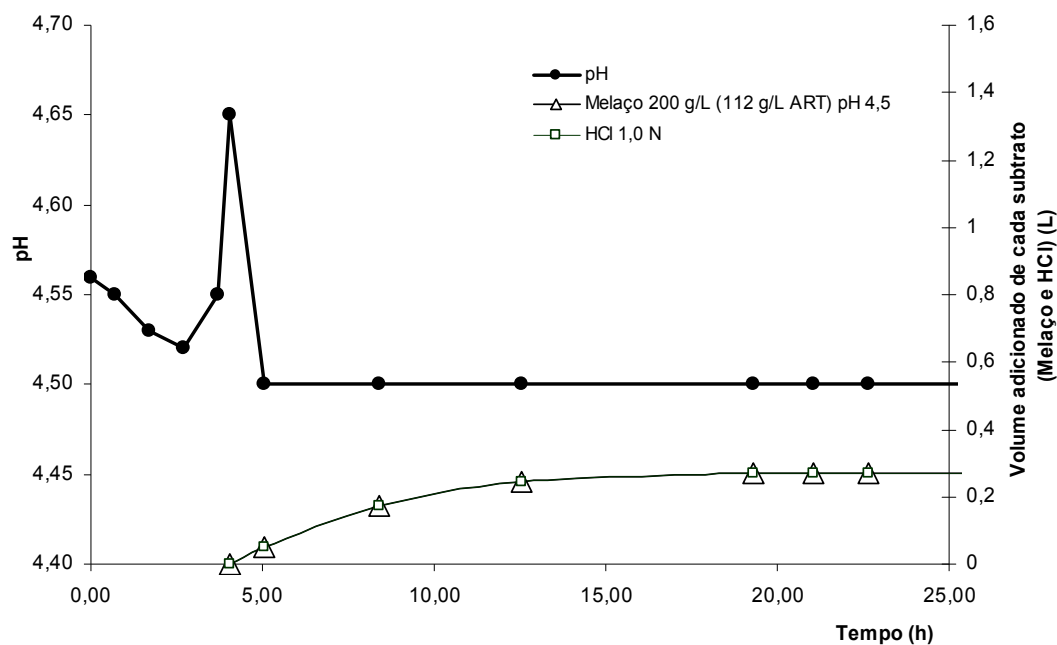


Figura 3-5 - Acompanhamento do pH e volume adicionado nas primeiras 25 horas fermentativas.

O volume adicionado para controle de pH até 75 horas de fermentação ainda era baixo quando comparado ao volume útil de 5 litros do reator. Sendo assim, neste momento a bomba de alimentação da solução de HCl 1,0 N foi desligada. Conseqüentemente, gerou um aumento de injeção da solução de melão 200 g/L para manutenção do pH a 4,5. A Figura 3-6 apresenta o

acompanhamento do oxigênio dissolvido no meio, atividade enzimática, biomassa, concentração de açúcares redutores totais (ART) e volume adicionado das soluções de melaço 200 g/L e HCl 1,0 N ao longo das 170 horas de fermentação.

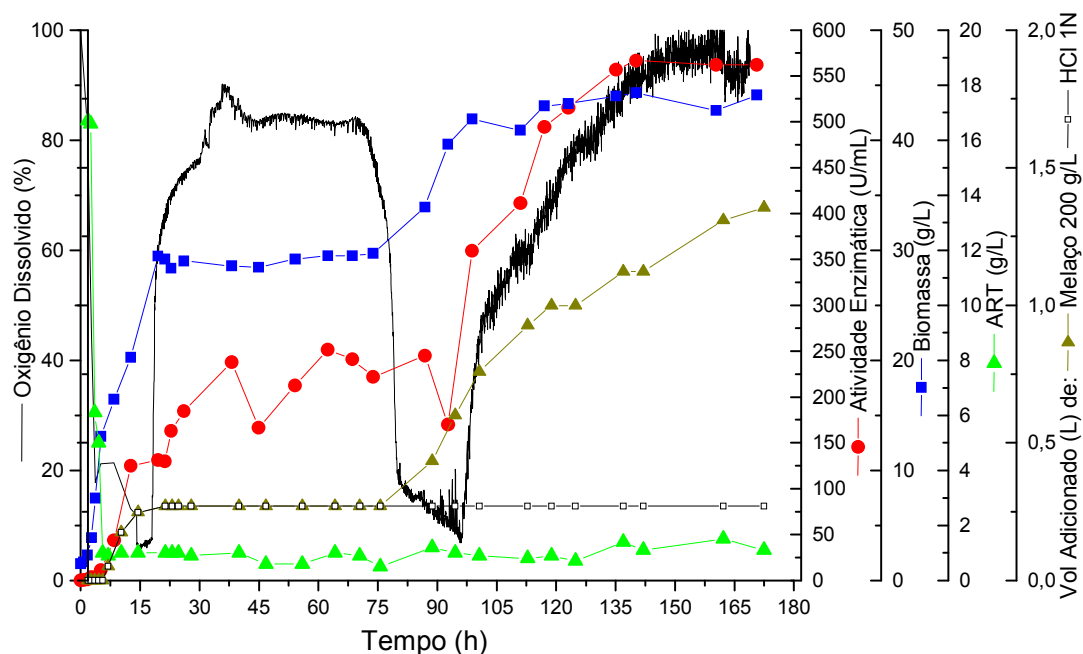


Figura 3-6 - 1ª Cinética da produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571 com alimentação de HCl 1,0 N e melaço 200 g/L definida em função do controle de pH do meio a 4,5. Agitação: 450 rpm – Aeração: 1,5 vvm – Temperatura: 36°C.

A maior vazão de alimentação de melaço 200 g/L após 75 horas de fermentação propiciou um aumento no metabolismo primário do microrganismo, evidenciado pelo maior consumo de oxigênio e pelo aumento na concentração de biomassa. Depois de 100 horas, ocorreu um súbito aumento no oxigênio dissolvido no meio e, paralelamente, um acréscimo considerável na atividade enzimática com relação ao nível anterior. Além disso, observa-se que mesmo numa maior taxa de adição de melaço, não houve acúmulo de açúcares redutores totais no meio.

Comparando-se com os resultados obtidos por TREICHEL (2004) em reator de bancada no processo batelada simples, verifica-se que a máxima biomassa

obtida neste ensaio representa um valor 1,7 vezes superior. Entretanto, a atividade enzimática de 562 U/mL ainda é baixa frente ao nível de 1300 U/mL obtidos naquele trabalho.

Na Figura 3-7-a, observa-se que durante a fase inicial em batelada simples ocorre acúmulo de etanol até uma concentração de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ e de glicerol até $8,2 \text{ g.L}^{-1}$ e estes metabólicos passam a ser consumidos após a redução das fontes de carbono em níveis inferiores a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 3-7-b). Neste momento, o pH do meio inverte a tendência de queda e, em razão disso, inicia-se a alimentação do meio. Além disso, a concentração de acetato atinge níveis de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ após 9 horas fermentativas, enquanto as concentrações de glicerol e etanol decrescem ao longo da fermentação.

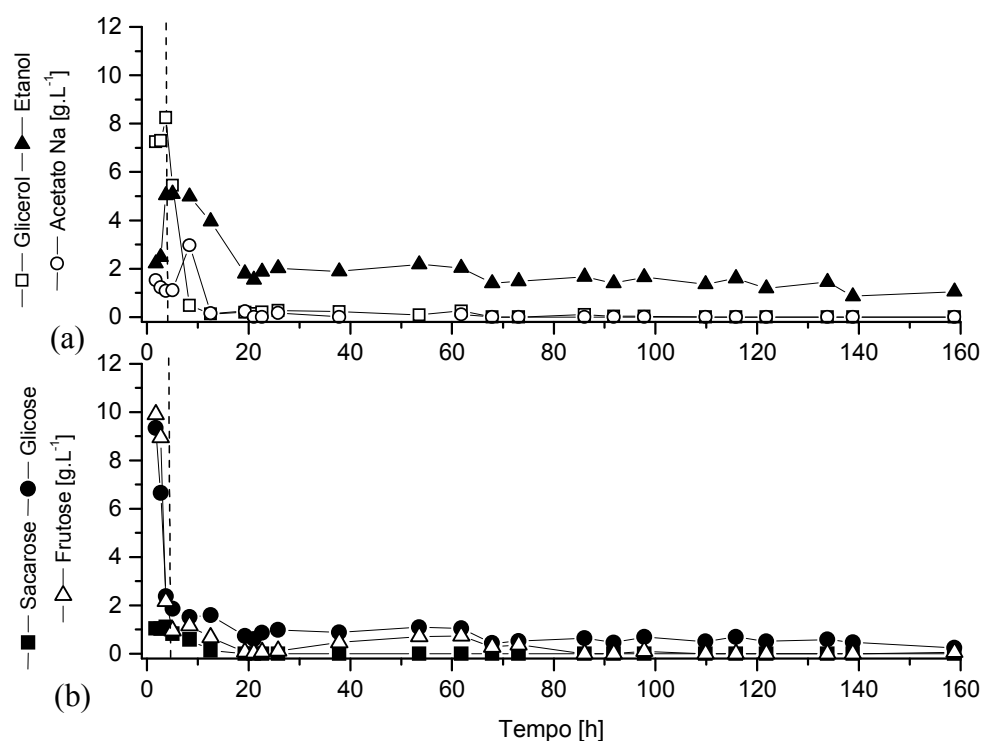


Figura 3-7 – Fermentação com alimentação por “feedback” – Controle de pH pela adição de HCl 1,0 N e melaço 200 g/L. (a) Concentrações de glicerol (□), etanol (▲) e acetato de sódio; (b) concentrações de sacarose (■), glicose (●) e frutose (△) ao longo do processo fermentativo.

Fermentação com alimentação por “feedback” – controle pH pela adição de melaço 200 g/L (pH 4,0)

Neste ensaio o controle de pH 4,5 foi realizado com adição de solução de melaço 200 g/L (pH 4,0). Verificou-se que depois da exaustão da fonte de carbono inicial houve elevado requerimento de melaço 200 g/L (112 g/L ART e pH 4,0) para manutenção do pH do meio a 4,5. A Figura 3-8 apresenta as elevadas taxas de adição de melaço 200 g/L pela bomba de controle de pH e as oscilações geradas no pH do meio. Por causa disso, o reator atingiu seu volume útil em 14 horas e neste momento foi desligado o controlador de pH do processo.

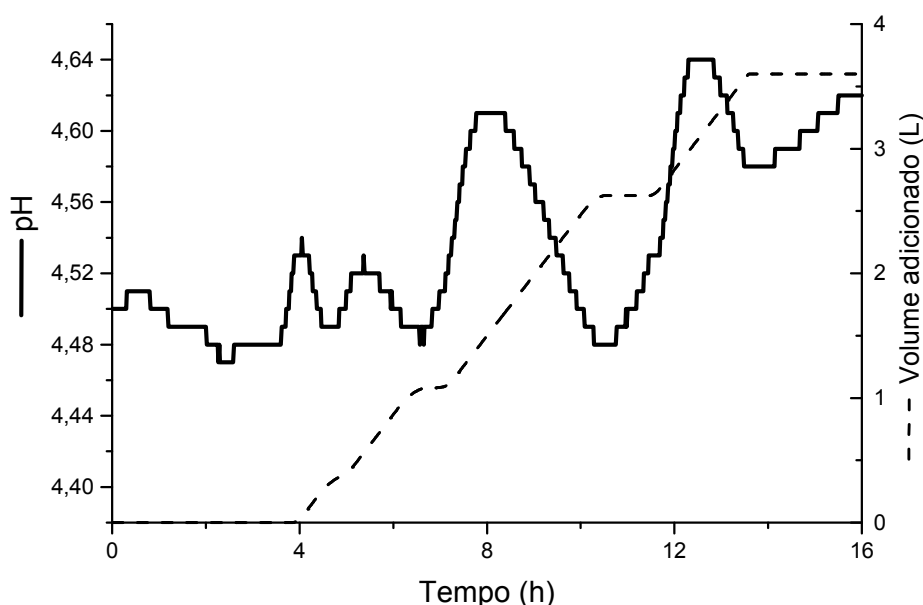


Figura 3-8 – Acompanhamento do pH e volume adicionado de solução de melaço 200 g/L a pH 4,0 nas primeiras 16 horas fermentativas.

A Figura 3-9 apresenta os resultados obtidos durante o acompanhamento deste processo fermentativo. Verifica-se que a adição rápida de melaço possivelmente provocou baixos níveis de atividade enzimática, sendo a máxima atividade obtida igual a 135 U/mL, e menor concentração final de biomassa em relação ao ensaio anterior (26 g/L).

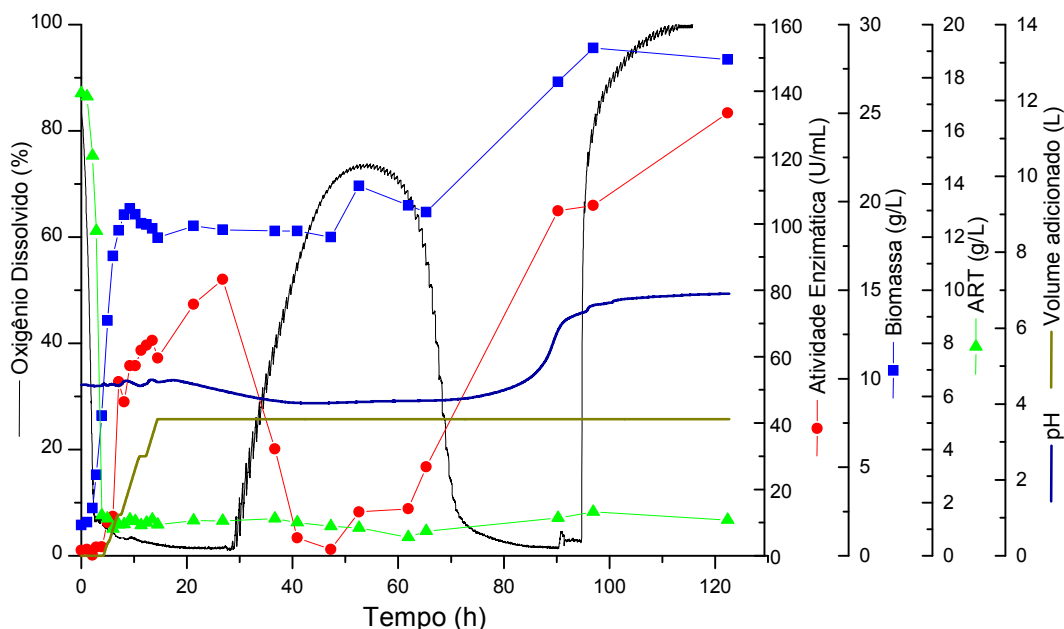


Figura 3-9 - Cinética da produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571 com alimentação definida em função do controle de pH do meio a 4,5. Agitação: 450 rpm – Aeração: 1,5 vvm – Temperatura: 36°C.

Durante as 15 horas fermentativas iniciais, o nível de etanol acumulado atinge cerca de $26,0 \text{ g.L}^{-1}$ e a partir deste instante o microrganismo inicia a degradação do etanol produzido devido ao reduzido nível de fonte de carbono (sacarose, glicose e frutose) presente no meio (Figura 3-10-a e Figura 3-10-b). Analisando a Figura 3-9 e Figura 3-10-a, observa-se que a concentração de biomassa estabiliza-se em torno de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ quando se inicia o acúmulo de acetato até $15,0 \text{ g.L}^{-1}$ após 52 horas fermentativas. Logo depois, o consumo do acetato produzido possibilita o aumento na concentração de biomassa presente no meio a $27,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Após 60 horas, um aumento do metabolismo primário do microrganismo é evidenciado pelo elevado consumo de oxigênio e o acréscimo na concentração de biomassa após um longo período sem adição de substrato no reator caracteriza a utilização de metabólicos produzidos e acumulados ao longo do processo (Figura 3-9).

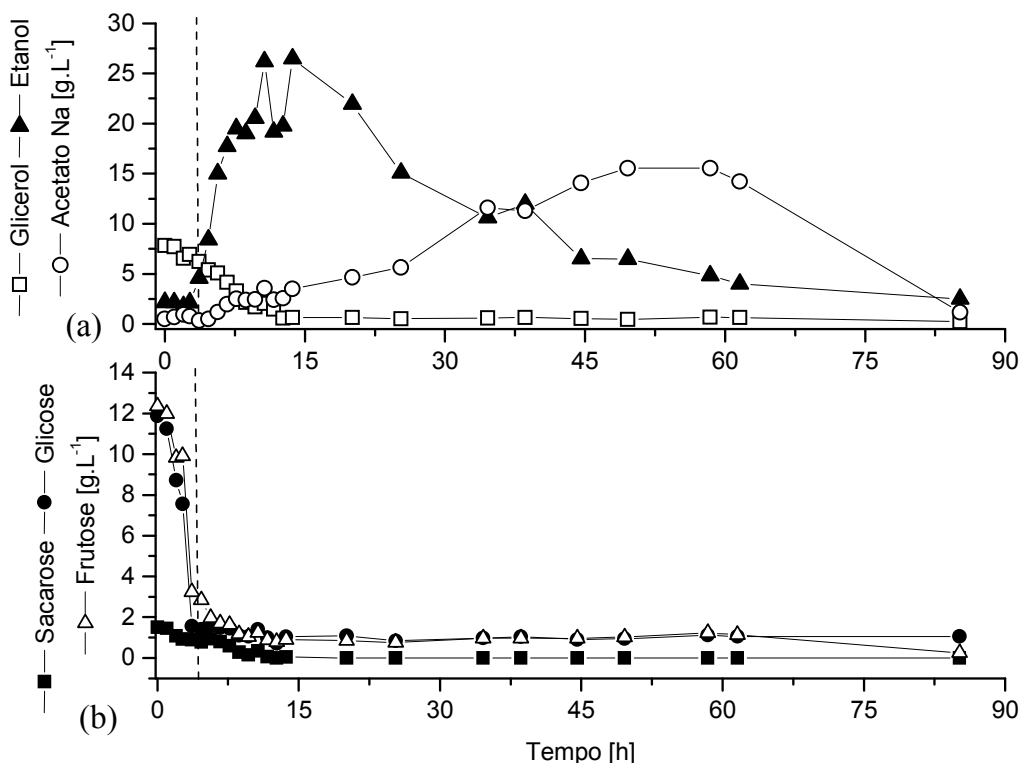


Figura 3-10 - Fermentação com alimentação por “feedback” – Controle de pH pela adição de melação 200 g/L. (a) Concentrações de glicerol (□), etanol (▲) e acetato de sódio; (b) concentrações de sacarose (■), glicose (●) e frutose (△) ao longo do processo fermentativo.

Fermentação com alimentação exponencial pré-determinada de melação de cana-de-açúcar 150 g.L⁻¹ (ART 85,0 g.L⁻¹)

A maior parte do substrato contido no meio é consumida para formação de biomassa e, por causa disso, realizou-se este ensaio considerando uma alimentação exponencial para suprir a necessidade de substrato para formação de biomassa ao longo da fermentação numa velocidade de crescimento específica (μ) constante, volume inicial de 2,2 L, concentração inicial de biomassa de 2,5 g.L⁻¹ e rendimento biomassa/substrato igual a 0,32 g.g⁻¹. Considerando os parâmetros cinéticos K_s e μ_{max} da equação de Monod (Tabela 3-2) e com o intuito de manter a concentração de substrato presente no meio em torno de 1,0 g.L⁻¹, definiu-se a velocidade de crescimento específica a 0,09 h⁻¹. A Equação 3-6 apresenta a vazão

de alimentação (F), em litros por hora, atribuída durante a fase do processo em batelada alimentada.

$$F = \left(\frac{0,09 h^{-1}}{0,32} \right) \cdot \left(\frac{2,2 L \cdot 2,5 g \cdot L^{-1}}{85,0 g \cdot L^{-1}} \right) \cdot e^{0,09 \cdot t} \quad \text{Equação 3-6}$$

A Figura 3-11 apresenta os resultados obtidos durante o acompanhamento deste ensaio fermentativo. Ao longo das 30 horas fermentativas iniciais, observa-se uma velocidade específica de produção de inulinase igual $292 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$. Entretanto, a maior vazão aplicada na fase final de alimentação exponencial, provavelmente, acarretou repressão catabólica pelo acúmulo de fonte de carbono no meio e, conseqüentemente, reduziu a velocidade específica de produção para $106 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ (Figura 3-11).

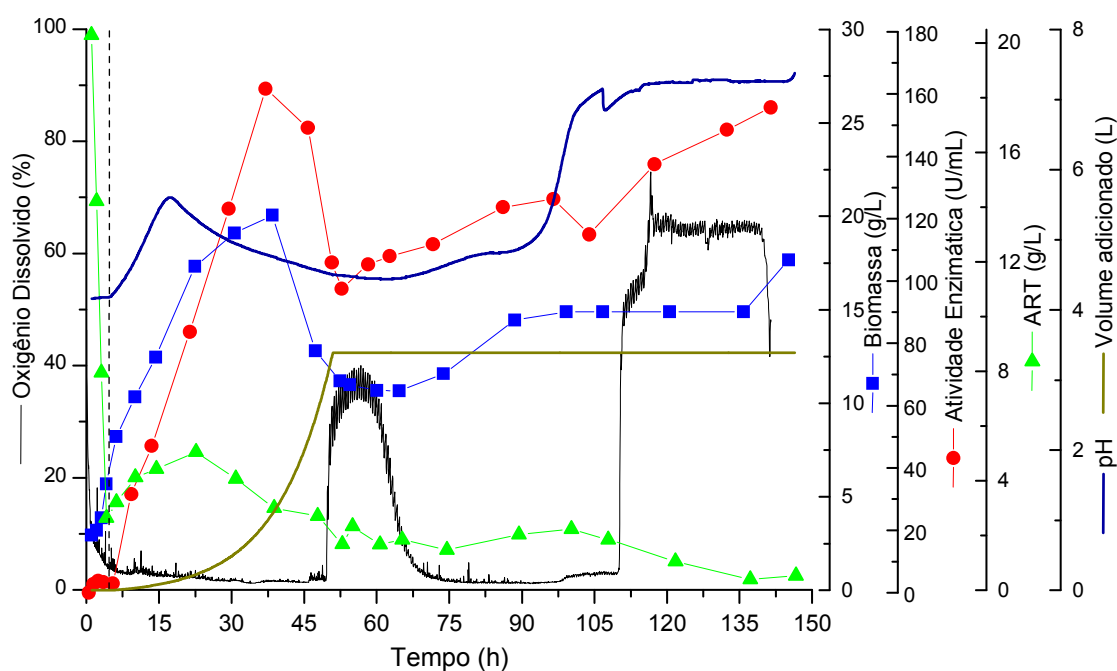


Figura 3-11 - Cinética da produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571 com alimentação exponencial pré-determinada. Agitação: 450 rpm – Aeração: 1,5 vvm – Temperatura: 36°C.

A concentração de biomassa final foi de $17,5 \text{ g.L}^{-1}$, sendo que a máxima concentração igual a 20 g.L^{-1} foi obtida em 35 horas durante a fase batelada alimentada.

A Figura 3-12 apresenta o perfil de consumo de açúcares e formação de metabólicos ao longo da fermentação. Após 60 horas, o acetato e etanol acumulados foram consumidos, gerando um acréscimo na concentração de biomassa do meio (Figura 3-11 e Figura 3-12-a). Dentre as fontes de carbono analisadas (Figura 3-12-a), verifica-se que a degradação de sacarose, glicose e frutose ocorreram nesta ordem. Sendo assim, houve um maior acúmulo de frutose durante a fase de alimentação exponencial (Figura 3-12-b).

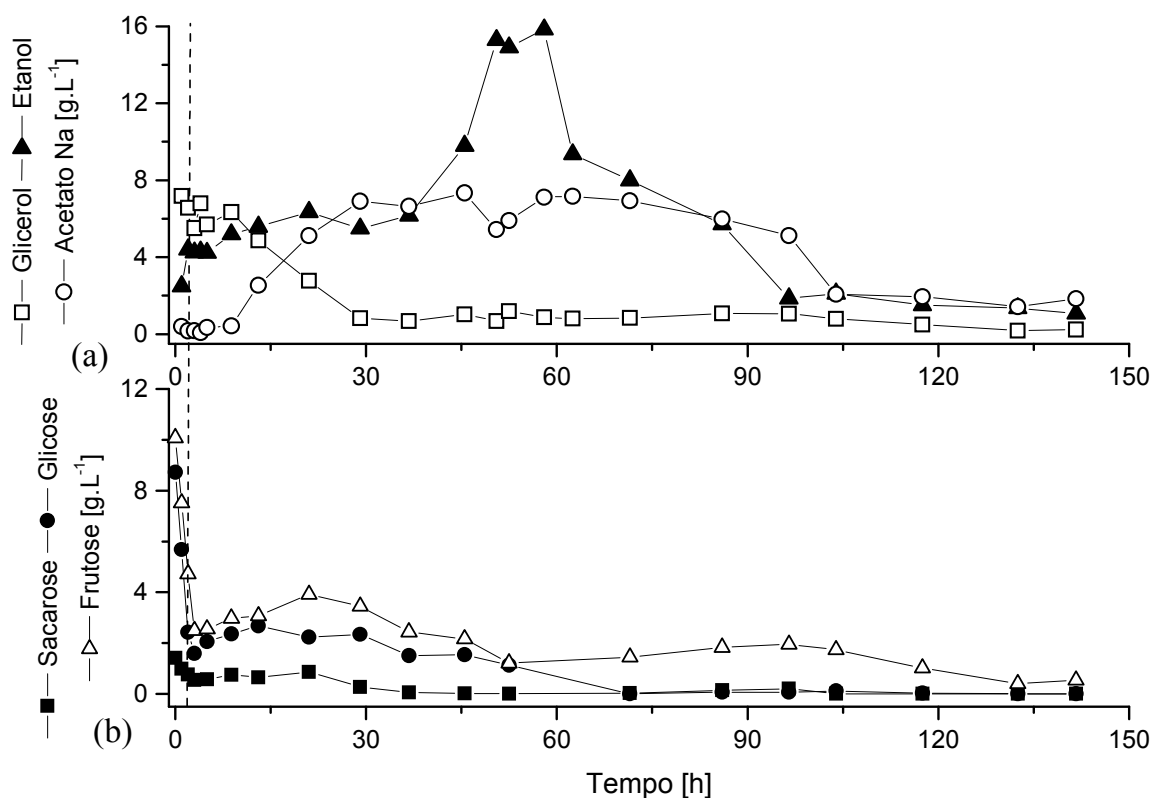


Figura 3-12 - Fermentação com alimentação exponencial pré-determinada. (a) Concentrações de glicerol (□), etanol (▲) e acetato de sódio; (b) concentrações de sacarose (■), glicose (●) e frutose (△) ao longo do processo fermentativo.

Fermentação com alimentação por “feedback” – controle pH pela adição de HCl 0,1 N e melaço 300 g/L (pH 4,0)

Com base nos resultados obtidos pelos ensaios anteriores realizados com alimentação por “feedback”, procedeu-se este ensaio com o controle de pH pela adição de solução HCl 0,1 N e melaço de cana-de-açúcar 300 g/L (pH 4,0). A Figura 3-13 apresenta o perfil dos parâmetros acompanhados ao longo do processo de fermentação. A fase inicial em batelada simples ocorreu durante as primeiras 4 horas fermentativas. Logo após a tendência de queda do pH foi invertida e, assim, iniciou-se alimentação de melaço 300 g/L e HCl 0,1 N até 70 horas fermentativas. Depois disso, a bomba de alimentação de HCl 0,1 N foi desativada e o sistema foi controlado pela alimentação exclusiva de melaço 300 g/L. A velocidade específica de produção de inulinase global foi de aproximadamente $35 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$.

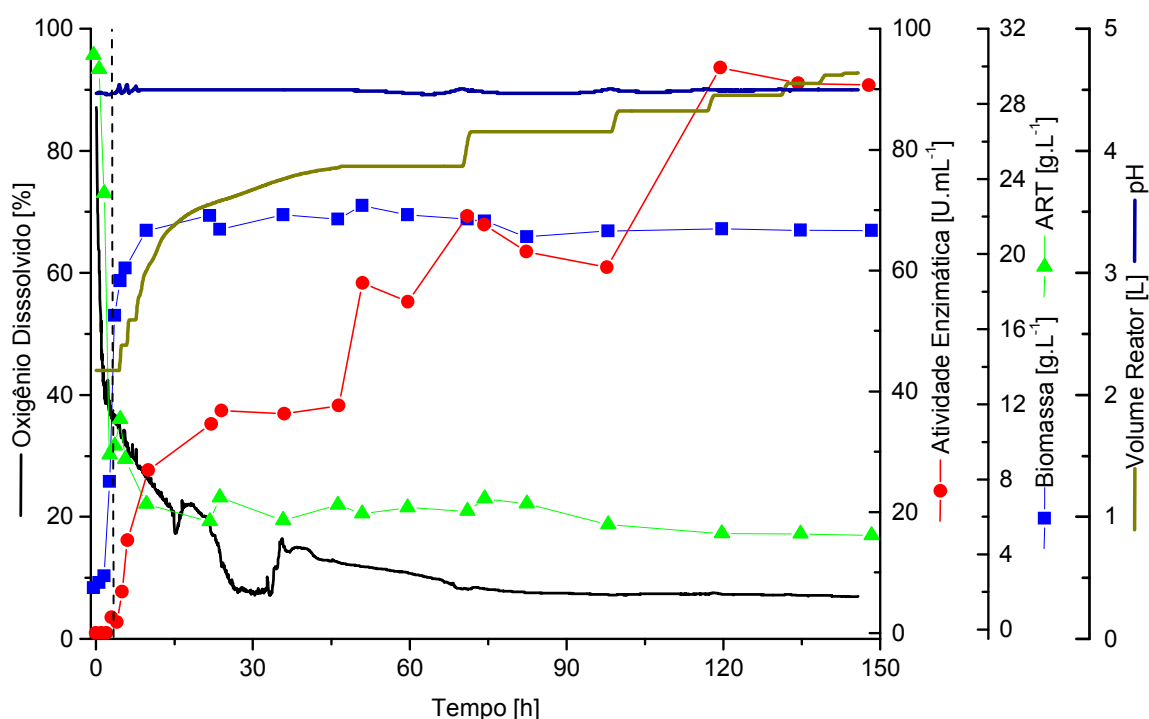


Figura 3-13 - Cinética da produção de inulinase por *K. marxianus* NRRL Y-7571 com alimentação de HCl 0,1 N e melaço 300 g/L definida em função do controle de pH do meio a 4,5. Agitação: 450 rpm – Aeração: 1,5 vvm – Temperatura: 36°C.

Observa-se que o nível de oxigênio dissolvido no meio permaneceu reduzido durante a fase de alimentação que se estendeu até o final da fermentação de 150 horas (Figura 3-13). A Figura 3-14-a apresenta o acúmulo de etanol observado até 10 horas fermentativas. Nesta etapa, a formação de etanol pode estar associada com a limitação de oxigênio durante a fase de crescimento do microrganismo (Efeito Crabtree). Percebe-se que a concentração de biomassa permanece constante ao redor de 20 g/L durante a fase em batelada alimentada (Figura 3-13) e esta condição pode estar relacionada com o acúmulo de acetato durante todo o processo, apesar do consumo de etanol e glicerol (Figura 3-14-a).

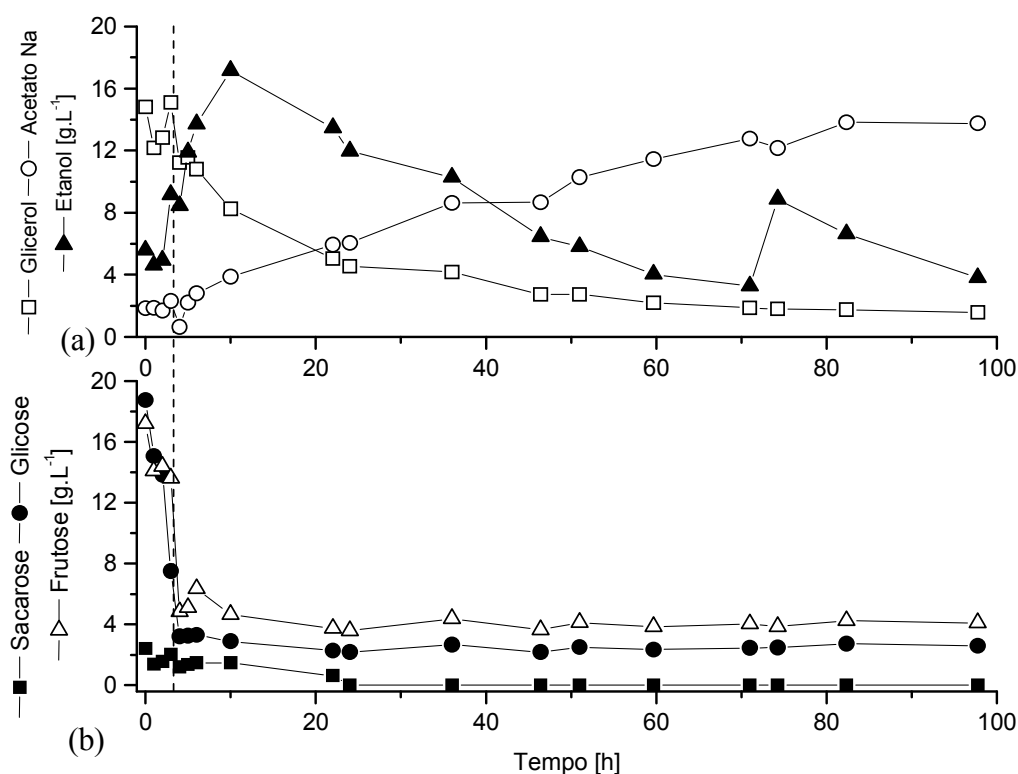


Figura 3-14 - Fermentação com alimentação por “feedback” – Controle de pH pela adição de HCl 0,1 N e melaço 300 g/L. (a) Concentrações de glicerol (□), etanol (▲) e acetato de sódio; (b) concentrações de sacarose (■), glicose (●) e frutose (△) ao longo do processo fermentativo.

A baixa atividade enzimática final obtida (90 U/mL) pode estar associada a repressão catabólica citada por PAREKH e MARGARITIS (1985) devido a elevada concentração de frutose no meio, em torno de 4,0 g/L, e de glicose

(aproximadamente 3,0 g/L) ao longo de toda fase de batelada alimentada (Figura 3-14-b).

3.5. CONCLUSÕES

Após o estudo de estratégias de alimentação do reator de bancada pela taxa exponencial pré-determinada e por “feedback” de pH, verificou-se que o processo fermentativo com alimentação para controle de pH 4,5 alcançou atividade enzimática máxima igual a 562 U/mL, utilizando-se subprodutos industriais de baixo custo. Além disso, notou-se que a taxa de produção da enzima inulinase foi maior quando as condições do meio apresentavam concentração de açúcares redutores inferior a 2,0 g/L e em altos níveis de oxigênio dissolvido.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATALA, D. I. P. **Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol.** Campinas, 2004. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BOON, M.; JANSSEN, E.; VAN'T RIET, K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 271-281, 2000.

COSTA, F.A.A. **Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras.** Campinas, 1986. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ETTALIBI, M.; BARATTI, C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26 n. 1, p. 13-20, 1987.

GROOTWASSINK, W. D.; HEWITT, G. M. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulinase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 31-41, 1983.

HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; BAARTMANS, R.; VAN DIJKEN, H. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-bath culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 42, n. 4, p. 516-521, 1994.

KABKE, K. C. P. **Otimização da Produção de inulinase em meio industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus***. Campinas, 2002. 77p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KALIL, S.J. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido**. Campinas, 2000. 141p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

MAKINO, Y. **Produção de inulinase e invertase a partir da espécie *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos**. Campinas, 2001. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MAKINO, Y. **Produção e purificação em leito expandido inulinase obtida a partir das espécies de *Kluyveromyces* para a síntese de frutooligossacarídeos**. Campinas, 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

MORI, H.; YANO, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-state. **Journal Chemical Engineering of Japan**. Tokyo, v.12, p.313-319, 1979.

PAREKH S.; MARGARITIS A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 446-448, 1985.

ROUWENHORST, R. J.; VISSER, L. E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN J. P. Production, distribution, and kinectic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1131-1137, 1988.

SANTOS, A.M.P. Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. Campinas, 1998. 91p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS, A.M.P. Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgarius*, Campinas, 2002. 161p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SCHNEIDER, A. L. S. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Florianópolis, 1998. 137p. **Tese (Mestrado em Engenharia Química)** – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SUZUKI, T; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Phenomenological background and some preliminary trials of automated substrate supply in pH-stat modal fed-batch culture using a set point of high limit. **Journal of Fermentation Techonology**. Osaka, v.69, p.292-297, 1990.

TREICHEL, H. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima. Campinas, 2004. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

TREICHEL, H. Estudo de meios alternativos para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. Campinas, 2001. 81p. **Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CAPÍTULO 4

Use of Industrial By-products for Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus* in a Fed-Batch Process

Guilherme Lopes Mendes; Francisco Maugeri; Maria Isabel Rodrigues*

**Dept of Food Engineering, FEA-University of Campinas, Campinas, SP, CEP 13083-970, CP 6121, Brazil*

Telephone number: 55-19-37884052

Fax number: 55-19-37884024

guilopes@fea.unicamp.br

Keywords: *Fed-batch, inulinase, Kluyveromyces, industrial medium.*

Artigo a ser submetido.

4.1. Abstract

Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 was cultivated in fed-batch process to overproduce inulinase on an economical and ecological alternative medium composed of industrial by-products as sugar-cane molasses and corn steep liquor. The fermentation was started in batch wise on medium with 188.0 g/L of corn steep liquor, 30.0 g/L of sugar-cane molasses (20 g/L of total reduced sugar) and 7.5 g/L of yeast extract to enhance biomass concentration. After depletion of sucrose, indicated by a steep rise of pH, the fed-batch phase was initiated. The feeding strategy was applied to control pH-stat at 4.55 by the automatic addition of 200 g/L sugar-cane molasses and HCl 0.5 N. High dissolved oxygen and low sugar concentration in medium are shown to be a good condition for inulinase production and an ethanol pulse has enhanced the specific inulinase production of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. The inulinase activity in the fed-batch process using industrial by-products reached 974 U.mL⁻¹ and a biomass concentration of 31.0 g.L⁻¹.

Nomenclature

rpm revolution per minute (min⁻¹)

S/I sucrose/inulin activities

v/v inoculum/broth volume

vvm air volume per broth volume per minute (min⁻¹)

4.2. Introduction

Inulinase has been very well studied due to its recognized potential for the production of syrups with an high fructose content and for the synthesis of oligosaccharides, considered prebiotic compounds [1].

A number of fungal, yeast, and bacterial strains have been used for the production for inulinases. Among them, fungal strains belonging to *Aspergillus* sp. (filamentous fungus) and yeast strains belonging to *Kluyveromyces* sp. (diploid yeast) are apparently the most common and preferred choice [1]. The advantage of studying inulinase production by *Kluyveromyces* sp. consists in the high productivity obtained even in synthetic medium [2, 3], than using an industrial medium [4]. Besides *Kluyveromyces marxianus* seems to be more resistant to the influence of shear stress in inulinase production than other yeasts [5]. The best source of carbohydrate for inulinase production is the inulin [6], however the cost of this inductor can achieve about 1.500 times higher than the sucrose from molasses. Moreover, Brazil has abundance of by-product of the food industry as sugar-cane molasses and corn steep liquor and, therefore, using an industrial medium for inulinase production has enormous ecological and economical advantages. Molasses and corn steep liquor consist of water, sucrose, proteins, vitamins, amino acids, organic acids and heavy metals such as iron, zinc, copper, manganese, magnesium, calcium, etc.

In addition, experiments with nitrogen-limited cultures confirmed that synthesis of the inulinase is negatively controlled by the residual sugar concentration, indicating that synthesis of the enzyme is a result of a derepression/repression mechanism [7]. Increases in sugar concentration during continuous fermentation can eventually lead to the accumulation of pyruvate and promote greater glycolytic fluxes, resulting in the reduction of the final biomass yields [8]. Hensing *et al.* [2] verified that *K. marxianus* CBS 6556 has a tendency

to product pyruvate and acetate in fermentation medium with high sugar concentration. By contrast, fed-batch fermentation allows for high biomass yields by preventing the imbalance of glycolytic metabolism over oxidative metabolism (substrate inhibition). In fed-batch, highly concentrated medium can be added to a reactor containing partially fermented medium with low sugar contents, since the substrate is fed to the reactor and the concentrated medium is constantly diluted.

The aim of the present work was to study the feeding strategy for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in a fed-batch process using low cost medium containing sugar-cane molasses and corn steep liquor.

4.3. Materials and Methods

4.3.1. Microorganism and Inoculum

Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 was preserved in malt-agar slants. The microorganism was activated in tubes with 10 mL volume of medium composed of 3 g/L malt extract, 3 g/L of yeast extract, 5 g/L of peptone (Difco, Sparks, USA) and 10 g/L of glucose (Ecibra, São Paulo, Brazil), incubated for 24 hours at 30 °C. Each tube was transferred to the inoculum medium composed of 20 g/L of sucrose (Synth, Diadema, Brazil), 5 g/L of NH₄Cl (Merck, Darmstadt, Germany), 1.15 g/L of KCl (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil) and 0.65 g/L of MgSO₄·7H₂O (Ecibra, São Paulo, Brazil) at pH 6.8, maintained in incubator shaker (New Brunswick Scientific Innova 4430, Edison, USA) for 24 hours at 30 °C and 300 rpm.

4.3.2. Pretreatment of industrial by-products

Sugar-cane molasses was obtained from Esther Sugar Factory (Campinas, Brazil) and corn steep liquor kindly supplied by Corn Products Brasil (Mogi Guaçu, Brazil). In

order to remove flocculants agents and to viably the downstream phase, they were treated separated in a concentration of 200 g/L with 4 % (w/w) activated carbon ANFC (Carvorite, Irati, Brazil) at 60 °C, 300 rpm for 10 minutes and posterior filtration and centrifugation at 10 krpm for 15 minutes at 4 °C (Dupont Sorvall RC 26 Plus, Boston, USA).

4.3.3. Fed-batch fermentation

Fed-batch cultivation was performed in a batch bioreactor (New Brunswick Scientific Bioflo3000, Edison, USA) with working volume of 5.0 L at 36 °C, 1.5 vvm aeration and at a pitched blade up impeller speed of 450 rpm [5]. Initially, batch growth was carried out with 2.0 L of culture medium composed of 188.0 g/L of corn steep liquor, 30.0 g/L of sugar-cane molasses and 7.5 g/L of yeast extract, at initial pH 4.5 (no pH control). The fermentation was started with 10% (v/v) inoculum. After depletion of sucrose, indicated by a steep rise of pH, the fed-batch phase was initiated. In this phase, *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 was cultivated in the pH-stat at 4.55 by the automatic addition of 200 g/L sugar-cane molasses and HCl 0.5 N. The dissolved oxygen was measured with polarographic sensor (Mettler Toledo InPro 6000, Schwerzenbach, Switzerland).

4.3.4. Metabolite analyses

Concentrations of sucrose, glucose and fructose during fermentations were determined by a HPLC device consisting of 9010 Solvent Delivery System, RI-4 Refractive Index Detector, 9095 Auto-sampler (Varian, Walnut Creek, USA), SPH99 Column Thermostat (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), Millennium Chromatography Manager v. 2.10 (Waters, Milford, USA), on an anionic exchange HPX87H column

(Biorad Laboratories, Hercules, USA) at 30 °C using a sulfuric acid solution (pH 1.4) as a mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min.

4.3.5. Inulinase assay

Activity was assayed as follows: 1 mL enzyme solution was mixed with 9 mL of 2% sucrose or inulin in acetate buffer 0.1 M pH 4.5. The mixture was maintained at 50 °C and the rate of appearance of fructose was determined by the DNS method [9]. One unit of inulinase activity is defined as the amount of enzyme which hydrolyses 1 μ mol of sucrose per min under the conditions above mentioned (sucrose as substrate) or amount of enzyme catalyzing the liberation of 1 μ mol of reducing sugar per min, under the conditions above mentioned (inulin as substrate). Inulinase have different hydrolytic activities on sucrose compared to the hydrolytic activities on inulin. This behavior is represented by the S/I (sucrose/inulin activities) ratio: Values of S/I lower than 50 are a characteristic behavior of an inulinase, and higher than 50 are representative of an invertase [10]. The optimization work was carried out by measuring only the sucrose hydrolytic activity.

4.3.6. Biomass and cells viability

The biomass was determined by an indirect dry weight method, by comparing the cell suspensions optical density at 600 nm to a standard curve, which was previously prepared with the same microorganism produced in the same culture medium.

4.4. Results and Discussion

The bioreactor, containing 2.0 L of medium, was inoculated with 200 mL of inoculum to a final density of 0.75 g.L⁻¹. Cells were then grown batchwise for 4.7 h until a biomass concentration of 6.9 g.L⁻¹ (Figure 4-1-a) and the entire carbon source was consumed (Figure 1-b). Hereafter the fed-batch phase of the fermentation was initiated

(Figure 4-1-c). The feed rate of molasses and HCl 0.5 N required to maintain a pH medium at 4.55 increased slowly probably because of the degradation of acid by-products formed during sucrose consumption. After 18.0 h of fermentation, the requirement of sugar-cane molasses and HCl 0.5 N was temporarily ceased. At this moment, the feed of HCl 0.5 N was stopped and the pH control continued only with sugar-cane molasses until 24.9 h, when the working volume of bioreactor was reached.

According to result of Yepez Silva-Santisteban [5], it is interesting to notice that the biomass concentration profile is similar to the one of enzymatic activity, showing that enzyme production is related to the biomass concentration. After the beginning of the fed-batch phase, the specific production rate of inulinase by biomass concentration was $0.18 \text{ U.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ until 101.8 h. Nevertheless, the ethanol pulse applied at 101.8 h provided an enhancement in the enzyme production while the biomass concentration stayed constant. Therefore, the specific production rate of inulinase increased to $0.45 \text{ U.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, thus there is a good chance that this process with an high biomass concentration may ensure an high inulinase production and an ethanol pulse could increase the specific inulinase production.

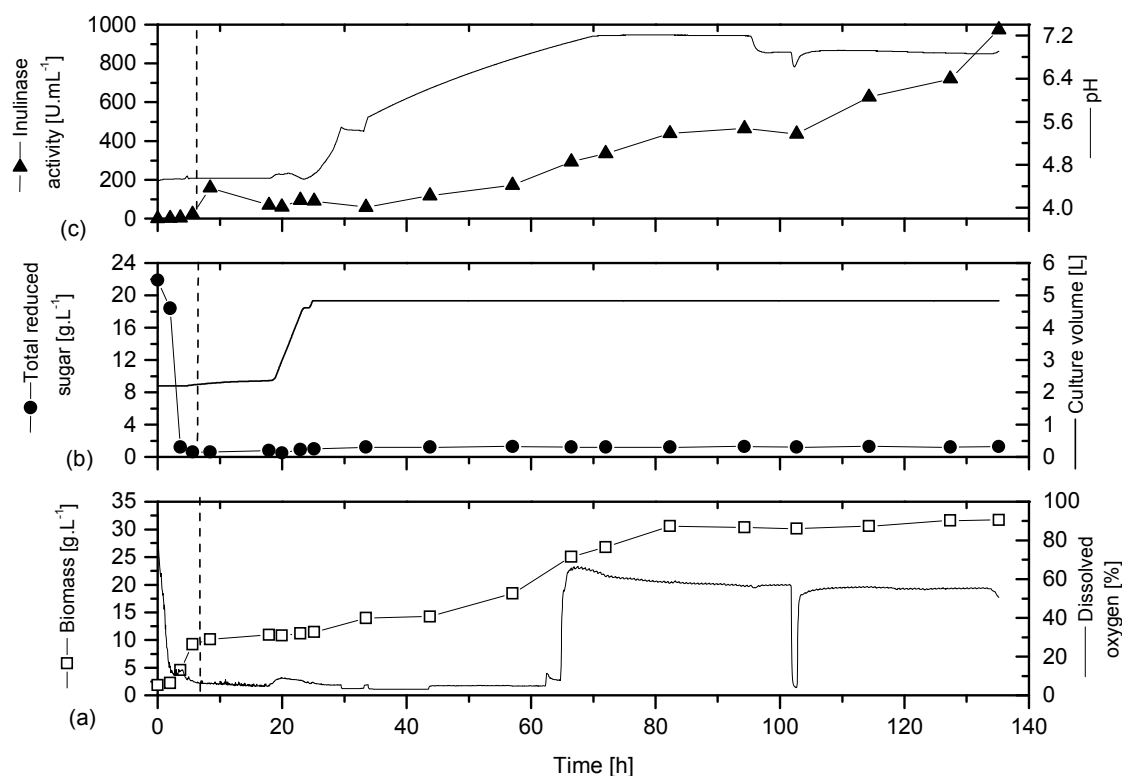


Figure 4-1. Fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 at 36 °C, 450 rpm and 1.5 vvm. (a) Inulinase activity (▲) and pH (—). (b) Total reduced sugar (●) and culture volume (—). The feed of molasses and HCl 0.5 N was started after 4.7 h. Changes in the feed rate were made to maintain a pH medium at 4.55. The feed of HCl 0.5 N was stopped after 18.0 h and so was the feed of molasses after 24.9 h. An ethanol pulse of 4 mL was applied at 101.8 h. (c) Biomass (□) and dissolved oxygen (—).

Fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 at 36 °C, 450 rpm and 1.5 vvm resulted in a biomass concentration of 31.6 g.L⁻¹ after 135 h. As observed during fermentation, the concentration of total reduced sugar was well below 2 g.L⁻¹ over the whole fermentation period, except for the initial batch phase (Figure 4-1-b). The occurrence of these sugars is due to extracellular hydrolysis of the sucrose by inulinase [2,7]. The inulinase activity in the culture supernatant reached 974 U.mL⁻¹ (Figure 4-1-a).

The oxygen dissolved in the medium reached levels of 50% after 65.0 h (Figure 1c) and in the last hours of fermentation it was noticed an higher increase of enzymatic activity. Thus, the depletion of substrate levels in the medium may reduce the requirement of oxygen transfer could provide an high inulinase production.

4.5. Conclusions

High dissolved oxygen and low sugar concentration in medium are shown to be a good condition for inulinase production and an ethanol pulse has enhanced the specific inulinase production of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. The inulinase activity in the fed-batch process using industrial by-products reached 974 U.mL⁻¹. The use industrial by-products composed by sugarcane molasses and corn step liquor seem to be an important alternative to inulinase production.

4.6. Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge the financial support of FAPESP (São Paulo-Brazil).

4.7. References

1. Pandey, A., C. R. Soccol, P. Selvakumar, V. T. Soccol, N. Krieger and J. D. Fontana. Recent developments in microbial inulinases - Its production, properties, and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 81: 35-52.
2. Hensing, M., H. Vrouwenvelder, C. Hellings, R. Baartmans and H. Vandijken. Production of Extracellular Inulinase in High-Cell-Density Fed-Batch Cultures of

- Kluyveromyces marxianus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 1994, 42(4): 516-521.
3. Kalil, S. J., R. Suzan, F. Maugeri and M. I. Rodrigues. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2001 94(3): 257-264.
 4. Makino, Y., P. S. C. Lima, F. M. Filho and M. I. Rodrigues. Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on Streamline((R)) DEAE resin. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2005, 22(4): 539-545.
 5. Silva-Santisteban, B. O. Y. and F. Maugeri. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. Enzyme and Microbial Technology. 2005, 36(5-6): 717-724.
 6. Poorna V, Kulkarni PR. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional desing. Bioresource Technol. 1995, 54, 315-320
 7. Rouwenhorst, R. J., L. E. Visser, A. A. Vanderbaan, W. A. Scheffers and J. P. Vandijken. Production, Distribution, and Kinetic-Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS-6556. Applied and Environmental Microbiology. 1988, 54(5): 1131-1137.
 8. Belem, M. A. F. and B. H. Lee. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. Process Biochemistry. 1999, 34(5): 501-509.
 9. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 1959, 31, 426-428.
 10. Vandamme, E. J. and Derycked G. Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties, and Applications. Adv. Appl. Microbiol. 1983, 29, 139-176.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, propôs-se o aumento de produtividade de inulinase em processo fermentativo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados, de modo a serem realizados estudos desde a definição do pré-tratamento mais adequado para os meios industriais, estratégias de alimentação do reator de bancada para produção de inulinase após definida a melhor condição de pré-tratamento em frascos agitados, viabilidade de purificação da inulinase em leito expandido diretamente do caldo bruto fermentado. Neste contexto as conclusões obtidas foram:

1. O pré-tratamento de água de maceração de milho e melaço de cana-de-açúcar mais adequado foi realizado nas seguintes condições: concentração de carvão ativo Carvorite tipo ANFC de 4% (p/p), temperatura do processo igual 60°C, sob agitação de 150 rpm durante 10 minutos e posterior filtração e centrifugação a 10.000 rpm numa faixa de temperatura entre 4 e 6°C por 15 minutos, com os substratos numa concentração de 200 g/L;
2. O estudo do pré-tratamento do meio (*upstream*) viabilizou o processo de purificação direta do caldo bruto fermentado em coluna de leito expandido (*downstream*);
3. A atividade enzimática de inulinase obtida em reator de bancada, operando em batelada alimentada com agitação de 450 rpm (pás inclinadas), aeração de 1,5 vvm, temperatura de 36°C, foi igual a 974 U/mL em fermentação com alimentação para controle de pH a 4,5 pela adição de melaço 200 g/L e HCl 0,5 N, utilizando-se subprodutos industriais de baixo custo;
4. Após a exaustão completa de metabólicos primários e secundários da etapa fermentativa, pulsos de etanol no meio parecem aumentar a velocidade específica de produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.