



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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Estudo de meios industriais para produção de inulinase por
Kluyveromyces marxianus var. *bulgaricus* ATCC 16045**

Helen Treichel
Engenheira de Alimentos

Orientadora : Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Helen Treichel, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de março de 2001.

Campinas, 16 de março de 2001


Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Presidente da Banca

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

Campinas
2001



20114355

UNIDADE B2
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
T717e
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 452.50
 PROC. 16.392/01
 C ☐ D ☒ X
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 11/07/01
 IN.º CPID

CM00158122-6

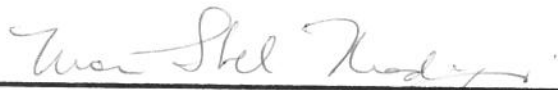
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

T717e Treichel, Helen
 Estudo de meios industriais para produção de inulinase por
Kluyveromyces marxianus var. *bulgaricus* ATCC 16045 / Helen
 Treichel. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

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

I.Inulinase. 2.Planejamento experimental. 3.Fermentação.
 4.Enzimas. II.Rodrigues, Maria Isabel. II.Universidade
 Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
 III.Título.

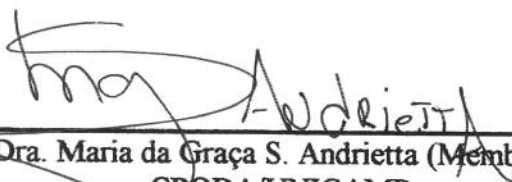
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues (Orientadora)
DEA/FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Francisco Mauger Filho (Membro-Titular)
DEA/FEA/UNICAMP



Profa. Dra. Maria da Graça S. Andrietta (Membro-Titular)
CPQBA/UNICAMP

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore (Membro-Suplente)
DCA/FEA/UNICAMP

DEDICATÓRIA

A minha mãe Lederly e ao meu pai “drasto” Francisco, pelo amor e apoio em todos os momentos.

A minha irmã Vivian, pelo companheirismo e amizade.

Ao Rogério, com todo meu amor.

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Isabel, pela paciência, compreensão e orientação no decorrer de todo o mestrado.

À Profa. Maria da Graça Andrietta e ao Prof. Francisco Maugeri Filho pelas valiosas correções e sugestões.

À Unicamp e ao Departamento de Engenharia de Alimentos desta Faculdade, por possibilitarem a complementação da minha formação.

À PRODESA Produtos Especiais para Alimentos S. A., pelo fornecimento do produto Prodexlac utilizado neste trabalho.

À toda minha família, que sempre me incentivou nesta etapa de minha vida, em especial ao tio Api e tia Vani, vó Dina, e àquelas que são da família em meu coração: Saula e Rosaline.

Àqueles que há algum tempo são também de minha família: Sr. Nelson, Sra. Judith, Gilberto, Nadia, Boni, Denise, Gabi e meu querido afilhadinho Luis Carlos (Mano).

Às amigas inseparáveis e indispensáveis, sempre: Keli e Michele Sem palavras para agradecer...

Não imagino minha vida sem poder contar com vocês!!!

Aos meus vizinhos que de braços abertos me receberam e deram a maior força no início desta etapa: Daniel, Lu, Guiga, e Rosiléa.

Ao Rodi e a Chris, pela convivência de muita paciência, compreensão e amizade. E é claro, ao Slink, que animou nosso lar...

Obrigada pelos momentos de muita diversão, descontração e amizade Raniere, Denise e Roberta.

A todos os colegas de mestrado, em especial aos amigos Julian, Gláucia, Junko, Ânoar, e Elisa.

À todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos: André, Bernardo, Daniel, D.Maria, Eliana, Fifa, Guiga, Janaína, Juliana, Lia, Luciano, Márcio, Rachel, Rafael, Reinaldo, Suzana, Thiany e Yemiko.

Aos professores da Fundação Universidade Federal de Rio Grande: Walter Augusto Ruiz, Jorge Alberto Vieira Costa, Eliana Badiale Furlong e Luiz A. A. Pinto, por acreditarem e incentivarem meus sonhos.

À CAPES, órgão financiador de bolsa de estudo, tanto na pós-graduação quanto na graduação.

À todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E acima de tudo à Deus; sem Ele tudo seria impossível.

SUMÁRIO

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. Frutose	5
2.2. Inulina	7
2.3. Inulinases	9
2.3.1. Microrganismos Produtores de Inulinase	10
2.3.2. Produção de inulinase.....	11
2.4 Conclusão	17
3. Material e Métodos	18
3.1. Produção da Inulinase.....	18
3.1.1. Preparo do inóculo	18
3.1.2. Fermentação	19
3.1.3. Planejamento Experimental.....	19
3.2. Metodologia Analítica	21
3.2.1. Determinação de Atividade da Inulinase e Invertase	21
3.2.2. Massa Seca	22
3.2.3. pH.....	22
4. Resultados e Discussão	23
4.1. Planejamento fatorial completo	23
4.1.1. Primeiro planejamento fatorial.....	23

4.1.2. Segundo planejamento fatorial.....	231
4.1.3. Terceiro planejamento fatorial	42
4.1.4. Testes intermediários.....	52
4.1.5. Quarto planejamento fatorial.....	53
4.1.6. Testes individuais retirando o K_2HPO_4 e substituindo o extrato de levedura por Prodexlac.....	64
4.1.7. Quinto planejamento fatorial.....	65
4.1.8. Sexto planejamento fatorial.....	68
4.2. Análise econômica.....	74
5. Conclusões	76
6. Sugestões.....	78
7. Referências Bibliográficas	79

RESUMO

Frutose é o açúcar natural mais doce, sendo uma alternativa segura para substituir a sacarose. A inulinase tem um importante papel na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina, que pode ser realizada em uma única etapa e render até 95% de conversão.

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio, visando obter um meio viável comercialmente, nos mesmos níveis de produção do meio convencional.

Técnicas de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foram utilizadas para otimizar o meio de cultivo para produção da enzima. Foram estudadas as variáveis concentração de melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura. Para este estudo utilizou-se quatro planejamentos fatoriais completos, sendo alcançada uma atividade enzimática máxima de 138U/mL. Após foi possível reduzir ainda mais o custo do meio, com a substituição do extrato de levedura pelo *Prodexlac*, extrato de levedura produzido pela indústria Prodesa que contém 44% de proteína, e retirando-se K_2HPO_4 do meio, atingido-se uma atividade enzimática de 113U/mL.

Verificou-se que o primeiro e segundo meios otimizados representam 13% e 1,93% do custo do meio sintético otimizado, respectivamente.

Assim neste trabalho foi possível a otimização na produção da enzima, utilizando meios alternativos, sem reduzir os níveis de produção obtidos com meio sintético, tornando ainda, o meio economicamente mais viável.

ABSTRACT

Fructose is the sweetest sugar, being a safe alternative for sucrose. Inulinase may play an important role in fructose production by enzymatic hidrolisis of inulin. The reaction occurs in a single step and it is possible to obtain up to 95% of conversion.

In this work the optimization of the conditions of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 using different carbon and nitrogen sources is carried out in order to obtain more suitable culture conditions for comercial exploration, with a similar production level to conventional culture conditions.

Factorial design and surface response analysis were used to optimize the culture conditions for inulinase production and the enzymatic reaction parameters. In the enzyme production the following variables were studied: melass, AMM and yeast extract. The use of the technique of complete factorial design, resulted in a enzymatic activity of 138U/mL. After that, it was possible to minimize the cost, changing the yeast extract by *Prodexlac*, produced by Prodesa Inc. wich contains 44% protein and removing K_2HPO_4 from the medium formulation, and with this medium the activity reached 113U/mL.

It has been show that the first and second medium formulation represented 13% and 1,93% of the cost of the previous synthetic optimized medium, respectively.

Finally, this work made possible the enzymatic production optimization, using low cost alternative medium, without reducing the production level achieved with the synthetic medium, turning this process economically more interesting.

1. Introdução

As enzimas têm sido aplicadas durante milhares de anos na forma de produtos de plantas ou de animais, e como consequência de diversos estudos elas tem sido cada vez mais utilizadas em operações industriais. Sem dúvida, a produção controlada de enzimas produzidas por microrganismos é um dos mais importantes setores da biotecnologia industrial (Bu'lock & Kristiansen, 1991).

A modificação de alimentos e outros materiais por enzimas tem ocorrido espontaneamente e deliberadamente por gerações. A aplicação biotecnológica de enzimas é vantajosa frente a processos físico-químicos por não necessitar de condições drásticas de temperatura e pressão (Vandamme & Derycke, 1983).

Em função da facilidade de produção, muitas enzimas são obtidas a partir de fermentações microbianas, suplantando a produção de origem vegetal. Isto se deve ao fato de exigirem em geral um tempo curto de produção, poderem ser obtidas em qualquer época do ano e utilizarem substratos normalmente de baixo custo. Neste contexto encontram-se as inulinases (Ettalibi & Baratti, 1987).

As inulinases são potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando a inulina como matéria-prima para obtenção desse açúcar (Ettalibi & Baratti, 1987). As inulinases também tem sido utilizadas na produção de oligossacarídeos (Kim, *et al.*, 1997).

O processo de produção de frutose por hidrólise da inulina é mais vantajoso quando comparado com o processo convencional, no qual frutose é produzida 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 apenas 45% de solução de frutose no melhor caso, pois o equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose é próximo de 50% de glicose e 50% de frutose (Kim & Rhee, 1989).

Diversos microrganismos podem ser utilizados para produzir inulinase, porém 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, 1996).

O objetivo desse trabalho foi estudar a produção da inulinase por *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045 utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio, visando obter um meio economicamente viável, mantendo os mesmos índices de atividade obtidos com o meio sintético.

Assim, foram realizadas as seguintes etapas:

- 1) Primeiro planejamento fatorial: com o objetivo de obter-se resultados preliminares; realizou-se um planejamento fatorial completo (2^3 e 3 pontos centrais), obtendo-se como resposta a atividade da inulinase. As variáveis independentes foram:

concentração de melaço, concentração de água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura. O K_2HPO_4 foi mantido constante na concentração de 1g/L, o pH em 3,5, e a temperatura em 30°C.

- 2) Segundo e terceiro planejamentos fatoriais: estes dois planejamentos foram realizados da mesma maneira que o primeiro, porém mudando os níveis das concentrações de cada substrato, sempre utilizando o anterior como base para decisão das próximas concentrações a serem utilizadas.
- 3) Testes intermediários: com o objetivo de atingir um meio otimizado para produção da inulinase; realizou-se testes individuais utilizando-se concentrações de substrato baseadas nos resultados dos três planejamentos anteriores.
- 4) Quarto planejamento fatorial: após a realização dos testes intermediários, utilizou-se o melhor resultado dos mesmos como ponto central para a realização deste quarto planejamento e assim otimizar a produção enzimática.
- 5) Testes intermediários com objetivo de redução de custo do meio de produção: após já obtido um meio otimizado, realizou-se testes individuais retirando o K_2HPO_4 e substituindo o extrato de levedura pelo Prodexlac, produto fornecido pela indústria Prodesa.
- 6) Quinto planejamento fatorial: após a obtenção de resultados satisfatórios nos testes do item 5, realizou-se um planejamento experimental para otimizar o meio de produção de menor custo. Neste planejamento o meio de cultura era composto por

melaço, AMM e Prodexlac, mantendo-se o mesmo pH e temperatura dos itens anteriores.

7) Sexto planejamento fatorial: com base no resultado do planejamento exposto no item 6; realizou-se este no qual o meio de menor custo foi otimizado.

8) Análise de custo: como etapa final fez-se um estudo de custo dos substratos utilizados, tanto no meio sintético, otimizado por Kalil (2000), como nos dois meios sintéticos otimizados no presente trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Frutose

Os oligossacarídeos são carboidratos formados de 3 a 10 unidades de monômeros de hexoses que podem ser encontrados em produtos vegetais (frutas e legumes), em leite e mel na forma livre ou combinada. Sua utilização como alimento funcional é proposta desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias. Em função disso são denominados de "probióticos" (Crittenden *et al.*, 1996).

Os frutooligossacarídeos representam um dos principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, em termos de produção. Atualmente existem vários tipos de oligossacarídeos produzidos comercialmente, podendo-se citar como exemplos: os galactooligossacarídeos, a lactosacarose e a palatinose. Normalmente são obtidos por dois processos, que não apresentam diferenças significativas no produto final. No primeiro a sacarose é utilizada como substrato, obtendo como produto frutooligossacarídeos de 2 a 4 unidades fructosil com ligações β -(2-1), com um resíduo α -D-glicosil terminal, conhecidos como kestose, nistose e 1-frutosilnistose. O segundo processo constitui-se na hidrólise enzimática da inulina, produzindo frutooligossacarídeos de cadeia longa (Crittenden *et al.*, 1996).

No início da década de 1970 houve um acentuado aumento nos preços do açúcar comum no mercado mundial, o que incentivou a pesquisa de substitutos da

sacarose. O término da legislação protecionista, em 1974, existente nos Estados Unidos, para a produção de sacarose, resultou em maior competição entre os produtores, com baixa de preços, tornando anti-econômica a produção doméstica de sacarose. Como o maior usuário de adoçantes naquele país é a indústria de bebidas carbonatadas, adoçadas até então preponderantemente com sacarose, a substituição desse açúcar pela frutose, que possui um poder adoçante maior, tornou-se altamente desejável. Por outro lado, o uso de xaropes comuns de glicose, em bebidas, nunca havia sido generalizado, havendo problemas devido à falta de doçura e contaminação bacteriana; e o uso de açúcar invertido foi adotado somente em escala reduzida. Houve portanto interesse na obtenção econômica da frutose (Reguly, 1996).

É de grande expectativa que os novos desenvolvimentos proporcionados pela biotecnologia venham contribuir para a solução dos atuais problemas energéticos e alimentícios. Para isso as fontes de carboidratos renováveis são consideradas estratégicas. A frutose é o açúcar com maior índice de doçura encontrado na natureza e a alternativa mais segura para substituir a sacarose, responsável por agravar problemas relacionados à obesidade, cariogenicidade, arteriosclerose e diabetes (Vandamme e Derycke, 1983).

A frutose aumenta a absorção do ferro como resultado da formação de um quelato complexo ferro-frutose, o qual é melhor absorvido que o ferro inorgânico (Gupta, 1994).

Frutanas depositadas como reserva de carboidratos em raízes e tubérculos de várias plantas representam boas fontes de frutose, adoçante com caloria reduzida.

Estas frutanas consistem de cadeias lineares unitárias de frutose e uma unidade terminal de glicose, todas ligadas por ligações β -2,1 frutofuranosídicas (GrootWassink, 1980).

A produção de frutose pode ser feita tanto por hidrólise ácida como enzimática. A hidrólise ácida usando HCl 2N era o processo preferido nos EUA, enquanto que a conversão enzimática é praticada há anos em alguns países da Europa e Japão (Goldstein *et al.*, citado por Costa, 1986). Cada um desses métodos tem suas vantagens e desvantagens. Na hidrólise enzimática tem-se baixo custo do catalisador, alta porcentagem de conversão (90%), tempo de residência no reator menor que o método químico, solução de açúcar invertido incolor e temperatura do processo mais baixa. O inconveniente desse método é que a operação precisa ser realizada em batelada e a enzima não pode ser reutilizada.

Na hidrólise ácida temos baixo custo do catalisador e facilidade em se usar reator tubular em processo contínuo. Como desvantagens depara-se com a baixa porcentagem de conversão (65-70%), tempo de residência elevado no reator, solução de açúcar invertido colorida e temperatura do processo elevada. A hidrólise ácida pode produzir furfural e outros agentes aromáticos indesejáveis, assim como oligossacarídeos por reações de polimerização (Wiseman, citado por Costa, 1986).

2.2. Inulina

Inulina é o mais conhecido dos gluco-frutosanos, que são polímeros de D-frutose com um resíduo de D-glicose em uma de suas extremidades.

Aproximadamente, 30 unidades de frutose formam uma cadeia, e essas são unidas por ligações β (2-1) formando uma cadeia linear como é mostrado na figura 1 (Vandamme & Derycke, 1983).

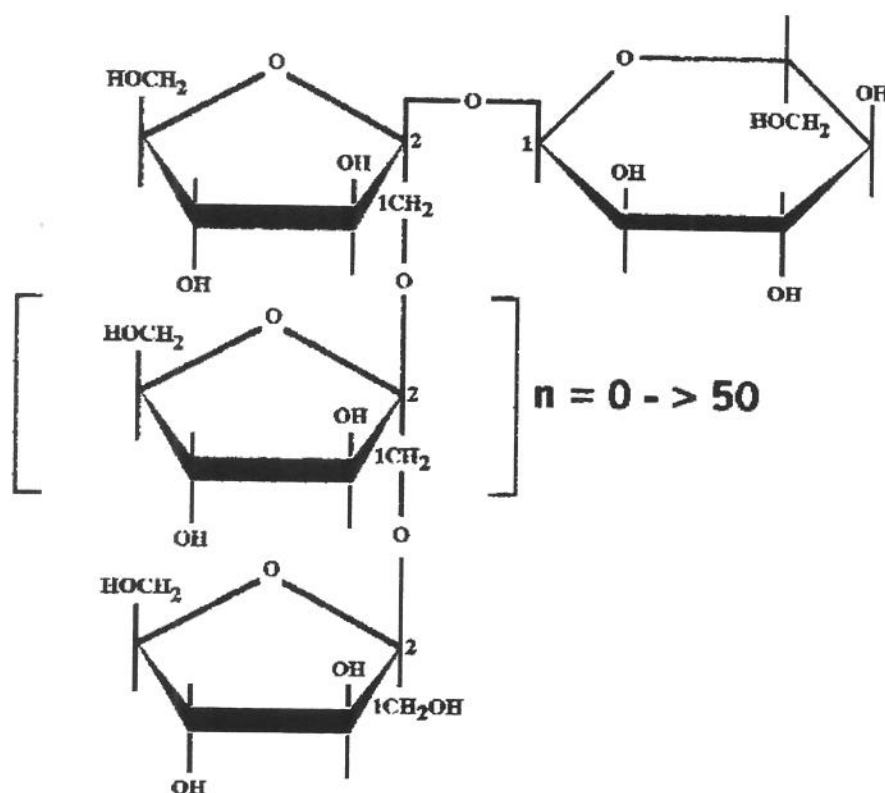


Figura 2.1: Fórmula estrutural da molécula de inulina.

Uma fonte interessante de inulina é a alcachofra de Jerusalém, que contém um polifrutano (aproximadamente 75 – 80% de massa seca) com um grau de polimerização de 3 – 30 unidades (Manzoni & Cavazzoni, 1992). Inulina também é abundante em raízes de chicória e dália (Elyachioui *et al.*, 1992).

A hidrólise da inulina pode ser feita em meio ácido (pH 1 – 2) e à temperatura de 80 – 100°C, mas como a frutose, produto desta reação, é facilmente degradada em

baixo pH, este processo fornece cor e subprodutos na forma de anidrido. O que pode ser solucionado com a hidrólise enzimática, visto que esta não apresenta esses problemas, porém leva um tempo maior para a hidrólise completa (Barthomeuf *et al.*, 1991).

2.3. Inulinases

Inulinases são 2,1- β -D frutano furohidrolase (EC 3.2.1.7.), que convertem inulina, um polímero com frutose na ligação β -2,1, à frutose. A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose, os quais tem assumido grande importância como agentes responsáveis pela doçura em alimentos e bebidas (Poorna & 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 devido às suas características fisiológicas (Rouwenhorst citado por Schneider, 1996).

A inulinase pode hidrolisar tanto a sacarose, inulina e levanas, enquanto a invertase verdadeira hidrolisa fortemente a sacarose, possuindo uma atividade muito fraca ou quase nenhuma sobre a inulina (Kushi, 1996).

As inulinases estão presentes em níveis muito baixos em vegetais tais como, *Liliaceae*, *Iridaceae*, e especialmente *Compositae* (Manzoni, 1988).

Originalmente, a classificação das inulinases está baseada na ocorrência de enzimas específicas em bactérias, fungos e plantas. Na visão de diversos autores, a inulinase é um tipo especial de invertase e deve ser classificada como tal (Rouwenhorst, 1990).

Diversas inulinases microbianas têm sido parcialmente purificadas e suas propriedades foram revisadas por Vandamme & Derycke (1983). Em contraste com as enzimas das plantas, inulinases microbianas apresentam atividade sobre a sacarose, bem como sobre a inulina. Usualmente, inulinases são classificadas como 2,1 - β - D frutano frutohidrolase (EC 3.2.1.7), mas a diferença com invertase (EC 3.1.1.26) não é clara para enzima microbiana. É geralmente aceito que a taxa de atividade sobre a sacarose em relação à inulina (S/I) caracteriza a enzima: para uma inulinase a taxa S/I é menor do que 100 (Ettalibi & Baratti, 1987).

2.3.1. Microrganismos Produtores de Inulinase

Alguns microrganismos podem ser citados como exemplos de produtores de inulinase: *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Candida kefir*. Contudo observou-se que dentre as leveduras, as do gênero *Kluyveromyces* apresentam uma melhor produtividade (Santos, 1998).

Sabe-se porém, que para um microrganismo poder ser utilizado para produzir inulinase deve-se considerar o fato desse pertencer ao grupo GRAS ("Generally

recognized as Safe") e ser aceito pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos para produtos alimentícios (Schneider, 1996).

2.3.2. Produção de inulinase

GrootWassink & Fleming (1980), produziram inulinase com *Kluyveromyces fragilis*, utilizando a sacarose como fonte de carbono e nutriente limitante. Foram utilizados 4% de sacarose, 30°C de temperatura e pH 5. A máxima produção de enzima foi obtida na menor taxa de diluição utilizada (0,09 h⁻¹). Neste trabalho, foram realizadas comparações da inulinase com a invertase em relação à algumas propriedades importantes para a indústria, e concluíram que a primeira é mais resistente à inibição pelo substrato, é mais termoestável e tem menor atividade de transferase. Logo, a inulinase de *Kluyveromyces fragilis* aparece como uma alternativa à *Saccharomyces cerevisiae*, que é a mais utilizada na indústria.

Para estudar a produção de inulinase, Manzoni & Cavazzoni (1988), utilizaram *Candida kefir*, *Candida pseudotropicalis* var. *lactosa*, *Kluyveromyces cicerisporus* e *Kluyveromyces fragilis*. Uma atividade alta de enzima (22,4-32,0 U/mL; 9,7-16,0U/mg proteína) foi observada quando as leveduras cresceram em meio contendo extrato aquoso de alcachofra de Jerusalém fresca como fonte de carbono e temperaturas de 28°C para *Candida kefir* e *Candida pseudotropicalis* var. *lactosa*. e 32°C para *Kluyveromyces cicerisporus* e *Kluyveromyces fragilis*.

Manzoni & Cavazzoni (1992), utilizaram *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* para estudar a produção da enzima inulinase, sendo as fontes de nitrogênio

alcachofra de Jerusalém ("topinambur") seca, fresca e inulina. Com uma concentração de enzima de 10UI/g foi avaliada a hidrólise destes substratos, catalisada pelas enzimas, obtendo como resultados 65,3%, 77,3% e 83,9//5, respectivamente. Além disso, os autores avaliaram a relação entre o grau de hidrólise, tempo de reação e concentração de enzima, obtendo então um modelo de hidrólise.

Rouwenhorst *et al.* (1988), determinaram a atividade da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em meio mineral com 0,25% de diferentes fontes de carbono, conforme mostra a Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Atividade da Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em meio mineral com 0,25% de diferentes fontes de carbono.

Fonte de Carbono	Taxa de Diluição (h ⁻¹)	Atividade da Inulinase (U mg de peso seco de célula)*
Inulina	0,05	58
Inulina	0,15	25
Sacarose	0,10	52
Frutose	0,10	29
Glicose	0,10	3,9
Lactose	0,13	2,8
Glicerol	0,10	9,4
Etanol	0,10	26

*Atividade da enzima foi medida utilizando sacarose como substrato

Gupta *et al.* (1994) produziram inulinase de *Kluyveromyces fragilis* NCIM 3217, obtendo atividade máxima após 36 horas, a 25-27°C, em um meio contendo 1% de inulina como fonte de carbono. Após estudos do crescimento em meios contendo

diferentes fontes de carbono: 1% de frutano, 1% de sacarose, 1% de frutose ou 1% de glicose, verificaram que a máxima produção de inulinase foi com o meio contendo 1% de frutano, seguido daquele contendo sacarose. Em testes feitos com meios contendo diferentes fontes de nitrogênio, observaram que a peptona forneceu os melhores resultados. Estudando o efeito da adição de fosfatos inorgânicos, observaram que a adição da NaH_2PO_4 (0,25% (p/v)) + KH_2PO_4 (0,25% (p/v)) em meio contendo 1% de inulina, conduziu a um aumento significativo na produção de inulinase extra-celular. A máxima atividade observada foi de 7UI/mL, com 36h de crescimento, havendo após um declínio deste valor, devido, provavelmente, à desnaturação da enzima presente no meio por enzimas proteolíticas excretadas pelo microrganismo.

Cruz-Guerrero *et al.* (1995) produziram inulinase com *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 usando como fontes de carbono inulina e glicerol separadamente. Esta inulinase foi posteriormente caracterizada, e foi determinado que esta tem uma maior afinidade com a inulina. Além disso, determinou-se que a enzima possui estabilidade à altas temperaturas, com uma vida média de 180 minutos e 50°C.

Na produção contínua de inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046, em meio com limitação de carbono, Kushi *et al.* (1996) verificaram que com o aumento da taxa de diluição, a fração de enzima encontrada no sobrenadante diminui, e consequentemente ocorre o aumento da fração ligada à parede celular. A fração de enzima ligada à célula também diminui à medida que a taxa de diluição aumenta. A atividade diminui com o incremento da taxa de diluição. Este fato sugere que a síntese

de inulinase em fermentação contínua é regulada pela concentração da açúcar residual no meio de alimentação.

Schneider (1996) estudou a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e constatou que a faixa de temperatura entre 32-37°C foi a que proporcionou melhor crescimento celular e atividade enzimática total e o controle de pH do meio em 4,5 foi favorável com respeito ao meio sem controle. A influência da concentração da inulina acima de 20g/L não é favorável à produção da enzima. A utilização de peptona não foi imprescindível à formação da enzima. No entanto, a presença de extrato de levedura é fundamental para o crescimento e, conseqüentemente, para a formação de enzima. Concentrações crescentes de uréia ou sulfato de amônio ocasionaram uma diminuição na formação de células e na síntese de inulinase. Valores crescentes do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (21 a 89 h⁻¹) foram favoráveis à formação de biomassa e à síntese de inulinase.

Poorna & Kulkarni.(1996) estudaram a produção de inulinase com *Aspergillus niger* utilizando meio sintético e quatro diferentes fontes de carbono. Foram utilizadas na concentração de 2%, glicose, frutose, sacarose e inulina. A atividade da inulinase, concentração de biomassa, pH do meio e açúcares redutores foram avaliados em cada experimento com cada diferente fonte de carbono por um período de 120 horas. Uma comparação em relação ao crescimento e atividade de inulinase foi realizada e mostrou que a inulina foi a melhor fonte de carbono, nas condições utilizadas, seguida pela sacarose. No caso da frutose e da glicose não houve produção de enzima. Com a inulina como fonte de carbono, obteve-se o máximo de produção em 60 horas,

80U/mL, e após houve um decréscimo na atividade da enzima para 28U/mL em 120 horas de experimento.

Santos (1998) trabalhou com três meios distintos, para obtenção de inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045. Optou por aquele que continha 30g/L de sacarose, 10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona e 5g/L de K_2HPO_4 , sendo o pH inicial de 3,5. Obteve uma atividade final de 7,54UI/mL e boa reprodutibilidade quando comparado ao meio que continha água de maceração de milho e melaço, apesar deste último em algumas fermentações atingir maior atividade. As condições da fermentação foram temperatura de 30°C, aeração 0,2-0,3vvm, agitação moderada e tempo de fermentação de 18 horas.

A otimização de meio de cultivo pelo método clássico envolve variação de apenas uma variável independente (tal como, nutriente, temperatura, pH) enquanto fixam-se outras em determinados níveis. Este estudo univariável é bastante trabalhoso e consome altos períodos de tempo, especialmente quando se tem um grande número de variáveis, e além disso, não garante a determinação das condições ótimas. Visando isso, um método mais prático é o planejamento fatorial fracionário (Poorna & Kulkarni, 1995).

Kalil *et al.*(1999) utilizaram a técnica de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta para otimizar o meio de cultura para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*. Ao invés de inulina, sacarose foi usada como fonte de carbono. Inicialmente, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) para determinar as variáveis mais relevantes na produção da enzima. Foram estudadas as

variáveis sacarose, peptona, levedura, pH e K_2HPO_4 , e todas mostraram-se significantes. De acordo com os resultados obtidos, as condições ótimas para produção da enzima foram: 14g/L de sacarose, 10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona e 1g/L de K_2HPO_4 . A atividade enzimática nas condições de cultura foi de 127U/mL, o que representa uma atividade 29 vezes maior do que nas condições anteriormente estudadas por Santos (1998).

Com o objetivo de estudar a metodologia de determinação da atividade da enzima inulinase com a sacarose e inulina como substrato, Medeiros *et al.* (1999), analisaram os efeitos da temperatura, concentração de substrato e pH e utilizaram a levedura *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 na produção da inulinase. Para a realização dos experimentos, primeiramente foi realizado um planejamento experimental de 1ª ordem, 2³ e 3 pontos centrais (11 ensaios) para verificar o efeito da concentração da sacarose (2-5%), pH (4,5-5,5) e temperatura (50-70°C), tendo como resposta a atividade enzimática do caldo filtrado. Após foram realizados mais dois planejamentos, sendo que no segundo, foram estabelecidas as condições ótimas de temperatura 60-68°C e pH 4,5-5, para atingir uma alta atividade enzimática de aproximadamente 110U/mL, utilizando-se a sacarose como substrato. No terceiro planejamento, com a enzima atuando sobre a inulina, o pH não apresentou nenhum efeito sobre a determinação da atividade enzimática mostrando uma flexibilidade dentro da faixa estudada. No entanto a temperatura foi a variável mais importante na faixa estudada, devendo estar entre 50-51°C para atingir uma atividade de 7,3 U/mL.

2.4 Conclusão

Neste capítulo foram apresentados trabalhos referentes a caracterização e produção da inulinase. Verificou-se que esta enzima tem merecido inúmeros estudos devido ao seu potencial de aplicação na indústria. O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, vem trabalhando nesta linha de pesquisa há alguns anos, utilizando-se a enzima obtida do microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045. No entanto, após a otimização do meio sintético, realizado por Kalil (2000), que levou a atividade enzimática a um incremento que chegou na ordem de 127U/mL, havia a necessidade de reduzir o custo do meio de cultura, visando a possibilidade de aplicação industrial. Sendo assim, a utilização de substratos industriais como melaço e água de maceração de milho surgiram como alternativa, e neste trabalho procurou-se dar enfoque a estas necessidades, sendo a metodologia utilizada detalhada no capítulo a seguir.

3. Material e Métodos

3.1. Produção da Inulinase

3.1.1. Preparo do inóculo

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 foi repicado de ágar inclinado de extrato de malte e levedura para tubo de ensaio contendo caldo do mesmo meio, em um volume de 10mL. O meio foi incubado por 24h a 30°C. Cada tubo de ensaio serviu como pré-inóculo.

A escolha deste microrganismo levou em consideração o fato do gênero *Kluyveromyces* possuir o “GRAS” (Generally Regarded Safe), que o faz aceito pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo assim recomendável para utilização em alimentos (Hensing *et alii*, 1994). Além disso, o microrganismo já havia sido testado por Costa (1986) juntamente com outras doze leveduras, tendo apresentado a maior atividade enzimática, por Santos (1998) com outras duas espécies do mesmo gênero, tendo o *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 apresentado a maior atividade enzimática e cuja enzima forneceu maior produtividade na formação de oligossacarídeos, e por Kalil (2000), quando foi otimizada a produção da inulinase através do uso de meio sintético, atingindo uma atividade enzimática de 127U/mL, em meio contendo sacarose, peptona e extrato de levedura.

O meio para obtenção do inóculo é apresentado na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Meio para obtenção do inóculo.

Componente	Quantidade (g/L)
Sacarose	20
Extrato de levedura	5
K ₂ HPO ₄	5
NH ₄ Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65

O pH do meio foi ajustado para 6,5 e preparados Erlenmeyers aletados de 500mL, contendo 100mL do mosto. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos. A cada frasco foi adicionado 10mL de pré-inóculo, e posteriormente o meio foi incubado por 24h a 30°C e 150 rpm.

3.1.2. Fermentação

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers aletados de 500mL, com 100mL do meio a ser estudado. A temperatura foi mantida em 30°C em shaker PSYCROTHERM (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, N. J.), com rotação de 150 rpm. A cada frasco foi adicionado 10% de inóculo. A resposta foi avaliada no tempo de 24, 48 e 72h. As condições dos ensaios realizados e seus resultados estão no capítulo 4.

3.1.3. Planejamento Experimental

Visando a obtenção de resultados preliminares, foi realizado um planejamento fatorial completo envolvendo três variáveis (2^3 e 3 pontos centrais), obtendo-se como

resposta a atividade de inulinase. As variáveis independentes foram: concentração de melão, concentração de água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura (tabelas 4.1 e 4.2). O K_2HPO_4 foi mantido constante na concentração de 1g/L, o pH em 3,5 e a temperatura em 30°C (Kalil, 2000). A resposta foi avaliada no tempo de 24, 48 e 72 horas.

Após análise das respostas deste primeiro planejamento, foram realizados mais três planejamentos completos (2^3 ensaios, mais 8 pontos axiais e 3 pontos centrais), com o intuito de otimizar o meio complexo de produção da inulinase, visto que através da análise das respostas percebia-se que ocorria tendência de aumento na atividade da inulinase. Para acompanhamento destes planejamentos, realizou-se ainda análise de pH e massa seca.

Após a obtenção do meio otimizado foram realizados testes com o mesmo meio, porém sem o K_2HPO_4 , e substituindo-se o extrato de levedura por um hidrolizado de levedura de nome comercial *Prodexlac*[®], produzido pela indústria Prodesa. As composições aproximadas dos substratos industriais utilizados são apresentadas abaixo:

	Melão (%) ¹	AMM (%) ²	Ext. Lev. (%) ³	Prodexlac (%) ⁴
Nitrogênio total	0,5	50	10,5	44
Açúcares redutores	18	7,5	38	-
Ácido láctico	-	18	-	-
Sais	-	-	-	0,5
Cinzas	-	-	-	9
Umidade	-	-	-	21
pH	-	4,5	-	7,0

Fontes: ¹Vasconcelos, 1985, ²gentilmente cedida por Corn Products – Mogi Guaçu, ³Instituto de Química – UNICAMP, ⁴gentilmente cedida por Prodesa – Produtos especiais para Alimentos S. A.

Tendo em vista os bons resultados obtidos, foram realizados mais dois planejamentos experimentais, para que também fosse obtido um meio otimizado com esta nova composição, o que representa um custo ainda menor no meio de produção.

3.2. Metodologia Analítica

3.2.1. Determinação de Atividade da Inulinase e Invertase

A determinação de atividade foi realizada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. A reação ocorre em um frasco sob agitação e controle de temperatura a 50°C, com auxílio de um banho recíproco (DUBNOFF, Modelo 145). No frasco adicionou-se 9,0mL de solução de sacarose ou inulina a 2% em tampão acetato 0,1M pH 4,5 e 1,0mL de amostra convenientemente diluída (Kalil, 2000). Convém salientar que a determinação da atividade sobre a inulina foi determinada somente em alguns planejamentos experimentais, onde julgou-se necessário para uma melhor visualização do comportamento da enzima, devido ao alto custo da mesma. Quando comparadas as duas substâncias, a sacarose tem um custo em torno de 25 a 30 vezes inferior à inulina (Sigma, 1999).

Foram retirados 1,0mL de amostra em intervalos de tempo pré-determinados e analisou-se os açúcares redutores. Foi construída a curva de absorbância em função do

tempo e, com o auxílio da curva de calibração dos açúcares redutores foi determinada a atividade enzimática. Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar $1\mu\text{mol/mL}$ de frutose por minuto.

3.2.2. Massa Seca

A determinação de massa seca (MS) na amostra foi feita espectrofotometricamente através da leitura da absorbância 600nm, utilizando água para calibração do aparelho.

Para avaliação da massa celular foi necessário construir uma curva padrão de densidade ótica *versus* massa seca, sendo esta obtida após secagem da amostra em estufa à vácuo (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.

3.2.3. pH

Após retirada da amostra, o pH foi medido diretamente em potenciômetro.

4. Resultados e Discussão

4.1. Planejamento fatorial completo

4.1.1. Primeiro planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo utilizado para avaliar as três variáveis estudadas (extrato de levedura, melaço e água de maceração de milho), e obter resultados preliminares em termos de atividade enzimática está apresentado na tabela 4.1 e a tabela 4.2 apresenta os valores decodificados de cada nível utilizado. Para melhor visualização dos resultados é apresentada a figura 4.1 com o acompanhamento de atividade enzimática em função do tempo de fermentação.

Os cálculos para verificar o efeito das variáveis na resposta foram feitos com auxílio do programa computacional Statistica versão 5.0 (Microsoft, 1995).

Analisando-se as respostas obtidas na tabela 4.1, verifica-se um grande incremento nos valores de atividade enzimática, com máximo atingindo 75,93 U/mL para o ensaio 6 (67,9g/L de melaço, 32,1g/L de AMM e 8,2g/L de extrato de levedura). Comparado-se com os valores encontrados na literatura, quando trata-se de meio complexo contendo melaço e água de maceração de milho (AMM), Costa (1986) obteve uma atividade enzimática máxima de 14,27AI/mL e Santos (1998), uma atividade máxima de 8U/mL, para o mesmo microrganismo utilizado.

Dentre os 17 ensaios realizados nas diferentes condições, observa-se que a atividade às 72 horas variou de 16,49 U/mL a 75,93 U/mL, mostrando que há um

ganho não só na atividade enzimática, mas também na produtividade do processo, mostrando a importância de se estabelecer as condições adequadas para a produção da enzima. Deve-se ressaltar que como o objetivo deste primeiro planejamento era ter-se idéia do comportamento da produção enzimática nestes meios industriais, não foram realizadas análises de pH e massa seca neste primeiro momento.

Os ensaios foram realizados com pH e concentração de K_2HPO_4 fixadas em 3,5 e 1g/L respectivamente, pois estes parâmetros já haviam sido estudados por Costa (1986), que verificou que os ensaios onde o pH foi superior a 3,5, não foi verificada atividade superior à 19U/mL, o que também foi verificado por Kalil (2000). Ambos autores verificaram tais condições para meio sintético, porém notou-se que as conclusões também são válidas para o meio complexo do presente trabalho.

A figura 4.1 permite uma melhor visualização do aumento de atividade enzimática ocorrida durante a fermentação. Para a avaliação dos efeitos das variáveis sobre a resposta, escolheu-se o tempo de 72h, visto que o objetivo é otimizar o meio de produção, obtendo-se uma máxima atividade da enzima.

Tabela 4.1: Planejamento experimental completo codificado com atividade de inulinase (AI) nas 24, 48 e 72h de fermentação.

Ensaio	Melaço	AMM	Ext. Lev.	AI	AI	AI
				24h	48h	72h
				U/mL	U/mL	U/mL
1	-1	-1	-1	5,29	15,86	16,49
2	+1	-1	-1	2,51	9,79	44,34
3	-1	+1	-1	9,41	31,62	34,40
4	+1	+1	-1	7,73	31,52	48,25
5	-1	-1	+1	12,39	19,57	28,68
6	+1	-1	+1	17,54	55,70	75,93
7	-1	+1	+1	15,93	31,01	41,18
8	+1	+1	+1	10,79	24,29	34,55
9	-1,68	0	0	2,86	19,52	29,21
10	+1,68	0	0	2,61	39,75	40,49
11	0	-1,68	0	1,11	8,28	22,66
12	0	+1,68	0	4,04	30,06	47,95
13	0	0	-1,68	12,27	31,16	41,02
14	0	0	+1,68	12,24	39,85	52,47
15	0	0	0	10,84	36,48	36,92
16	0	0	0	11,22	27,05	34,25
17	0	0	0	9,79	33,97	35,26

Tabela 4.2: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço (g/L)	20	32,14	50	67,86	80
AMM (g/L)	20	32,14	50	67,86	80
Ext. Lev. (g/L)	1	2,82	5,5	8,18	10

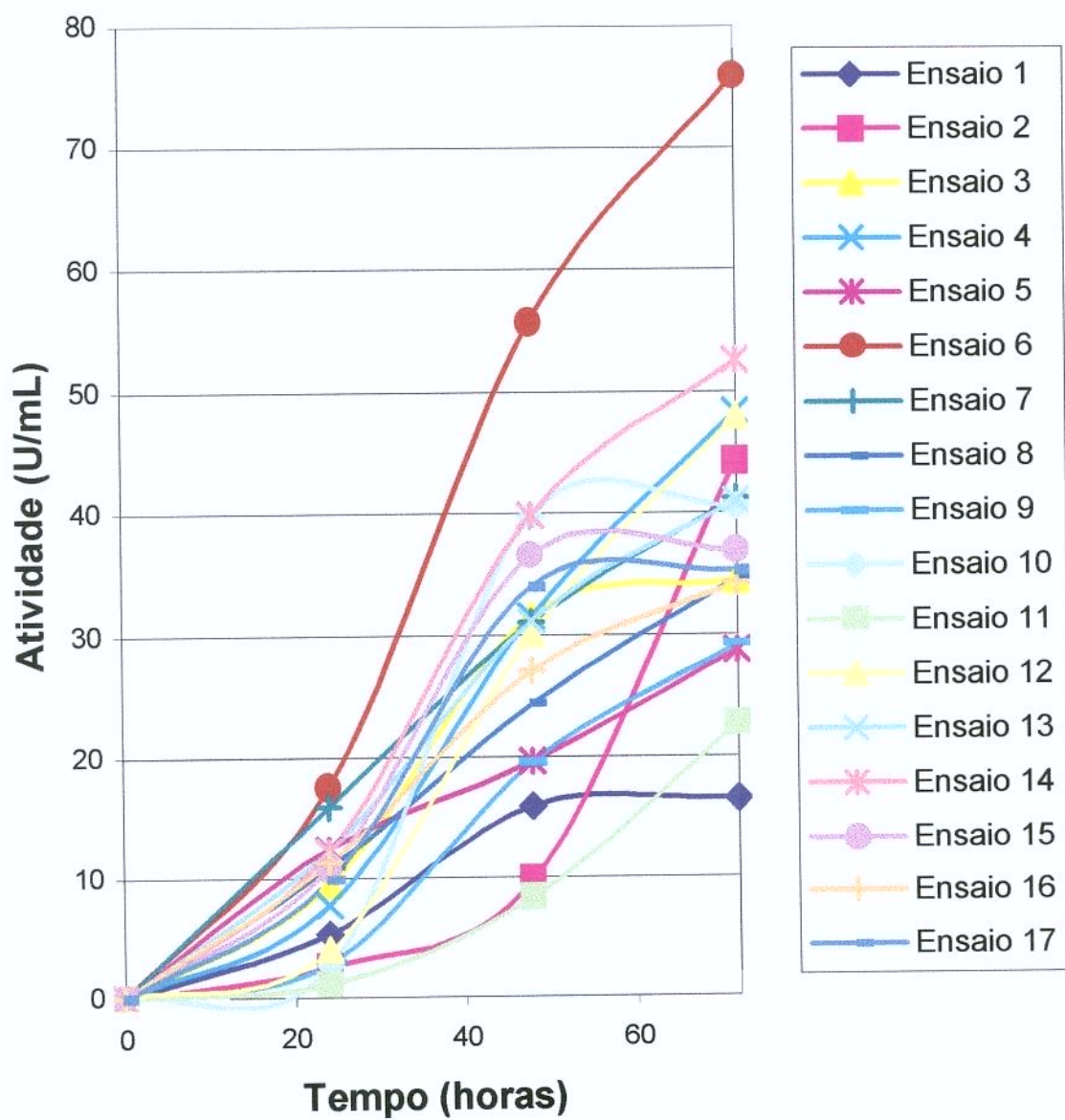


Figura 4.1: Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o primeiro planejamento fatorial completo.

A tabela 4.3 apresenta os efeitos das variáveis sobre a atividade. O melaço e o extrato de levedura apresentaram efeitos significativos na atividade enzimática. No entanto, a AMM não afetou a produção da inulinase individualmente, porém sua interação com o melaço e com o extrato de levedura, geraram efeitos negativos significativos. Estes resultados indicam que o aumento do melaço e do extrato de levedura na composição do meio de cultivo acarretam em um aumento de atividade, e o aumento da concentração de AMM provocou uma diminuição da mesma.

Este comportamento pode ser explicado pelo fato da concentração de nitrogênio total encontrada na AMM ser elevada, em torno de 50%, e terem sido utilizadas concentrações elevadas da mesma neste primeiro planejamento. Em vista disso, o próximo passo foi utilizar níveis menores de concentração da mesma.

A tabela 4.4 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a atividade da inulinase, e a tabela 4.5 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,94, e o teste F, 2,4 vezes maior que o valor tabelado, para 95% de confiança. Foi testado um modelo de segunda ordem incluindo os pontos axiais, no entanto o modelo de primeira ordem ajustou-se melhor aos dados experimentais. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste.

Tabela 4.3: Estimativa dos efeitos para a atividade de inulinase

	Efeito U/mL	Desvio padrão	t(2)	P	Lim. Conf. – 95%	Lim. Conf. +95%
Média *	39,11	0,41	96,23	0,000	37,36	40,86
(1) Melaço (L)*	20,58	0,95	21,59	0,002	16,48	24,68
(2)AMM (L)	-1,77	0,95	-1,85	0,205	-5,87	2,33
(3) Ext. lev. (L)*	9,22	0,95	9,67	0,011	5,11	13,31
1L x 2L*	-16,97	0,95	-17,80	0,003	-21,07	-12,87
1L x 3L	-0,27	0,95	-0,28	0,803	-4,37	3,83
2L x 3L*	-12,68	0,95	-13,30	0,006	-16,78	-8,57

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.4: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

	Coef. De regressão	Desvio padrão	Lim. Conf. –95%	Lim. Conf. +95%
Média *	39,11	0,41	37,36	40,86
(1) Melaço (L)*	10,29	0,48	8,24	12,34
(2)AMM (L)	-0,88	0,48	-2,93	1,17
(3) Ext. lev. (L)*	4,61	0,48	-2,56	6,66
1L x 2L*	-8,49	0,48	-10,54	-6,43
1L x 3L	-0,14	0,48	-2,19	1,92
2L x 3L*	-6,34	0,48	-8,39	-4,29

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.5.: Análise de variância para a atividade de Inulinase

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	1914,26	4	478,6	10,9
Resíduo	263,34	6	43,9	
Falta de ajuste	259,7	4		
Erro puro	3,64	2		
Total	2177,55	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,94$

$F_{0,95;4;6} = 4,53$

O modelo obtido para descrever as superfícies de resposta da atividade da inulinase está expresso na equação 4.1.

$$\text{Atividade} = 39,11 + 10,29.\text{Melaço} + 4,61.\text{Ext.lev.} - 8,49.\text{Melaço.AMM} - 6,34.\text{AMM.Ext.lev} \quad (4.1)$$

Assim, o modelo para a atividade foi utilizado para construir as superfícies de resposta para a atividade enzimática. Através da análise da figura 4.2 (a) e (b), verifica-se que a atividade enzimática é maior em maiores concentrações de melaço e menores de AMM. Na figura 4.2 (c) e (d), nota-se uma maior atividade em maiores concentrações de melaço e extrato de levedura, e na figura 4.2 (e) e (f), vê-se que as maiores atividades são obtidas com maiores concentrações de extrato de levedura e menores de AMM. Assim, as superfícies indicam que as concentrações de melaço e extrato de levedura devem ser incrementadas para que o meio otimizado para a produção da inulinase seja obtido.

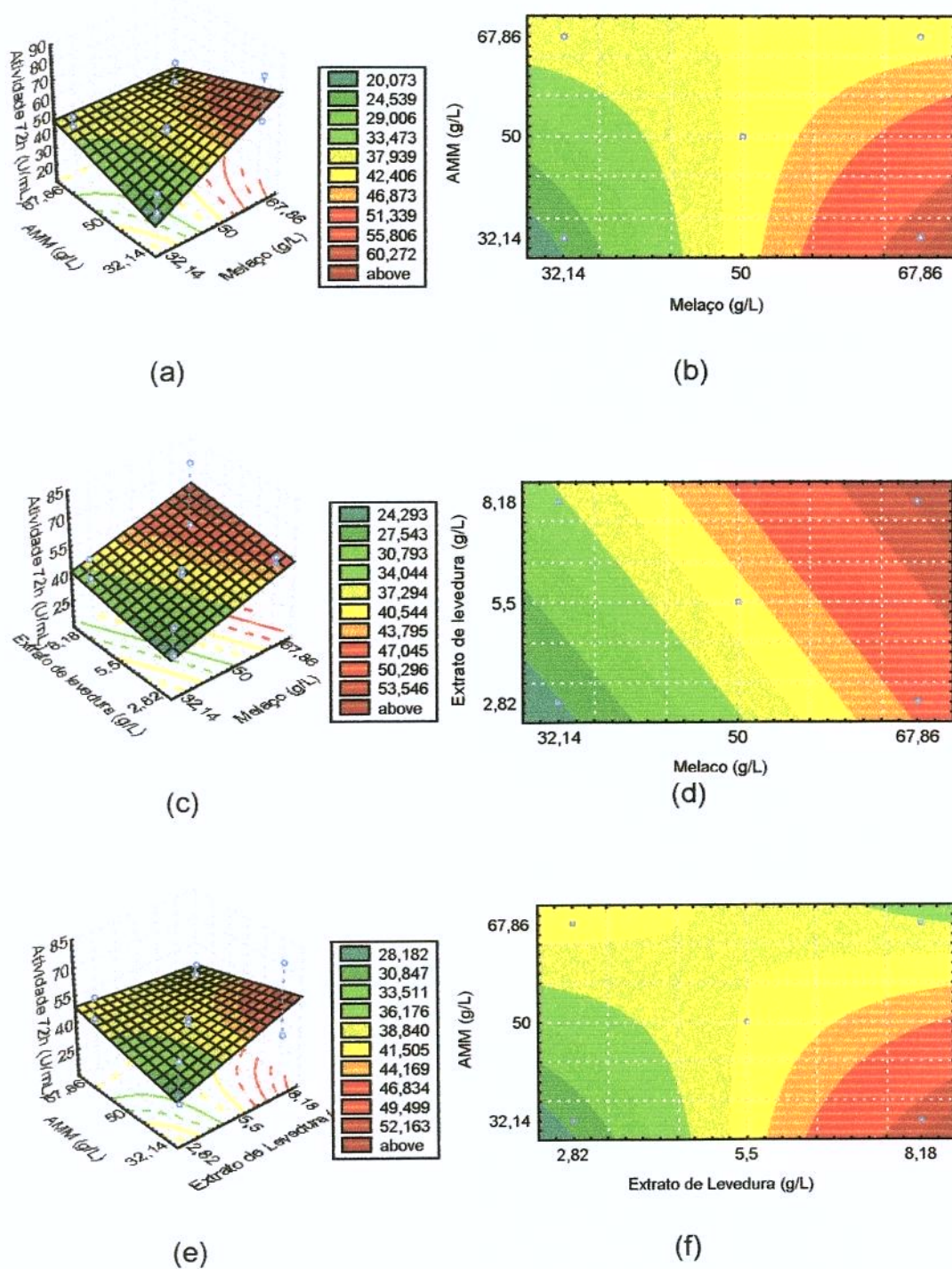


Figura 4.2: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: (a) e (b) da AMM e do melaço; (c) e (d) extrato de levedura e melaço e (e) e (f) extrato de levedura e AMM

4.1.2. Segundo planejamento fatorial

A tabela 4.6 apresenta os valores codificados deste segundo planejamento, e as respostas obtidas para a atividade enzimática, onde verifica-se que ocorreu um incremento nos valores, quando compara-se com o primeiro planejamento, sendo que o máximo obtido foi de 141,52U/mL no ensaio de número 4. Foram alterados os níveis de concentração estudados. No caso do melaço e do extrato de levedura, estas concentrações foram aumentadas, conforme indicou a análise das respostas do primeiro planejamento. Já a faixa de concentração de AMM foi alterada para um valor inferior, com exceção do nível -1,68, conforme mostra a tabela 4.7.

Na figura 4.3, percebe-se que houve novamente um aumento na atividade da inulinase com o passar das horas de fermentação.

Tabela 4.6: Planejamento experimental completo codificado com atividade de inulinase (AI) nas 24, 48 e 72h de fermentação.

Ensaio	Melaço	AMM	Ext. Lev.	AI	AI	AI
				24h	48h	72h
				U/mL	U/mL	U/mL
1	-1	-1	-1	43,16	57,81	74,61
2	+1	-1	-1	17,21	94,69	95,35
3	-1	+1	-1	45,47	60,52	120,85
4	+1	+1	-1	31,77	87,38	141,52
5	-1	-1	+1	44,51	69,63	75,58
6	+1	-1	+1	23,89	72,49	84,51
7	-1	+1	+1	29,06	43,06	52,16
8	+1	+1	+1	30,36	53,86	71,16
9	-1,68	0	0	18,97	20,46	16,43
10	+1,68	0	0	14,95	26,79	40,35
11	0	-1,68	0	12,59	23,36	79,17
12	0	+1,68	0	29,16	103,73	89,19
13	0	0	-1,68	16,91	27,48	39,62
14	0	0	+1,68	34,33	56,46	49,88
15	0	0	0	17,21	88,42	90,11
16	0	0	0	16,41	81,49	93,97
17	0	0	0	18,88	89,43	98,61

Tabela 4.7: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço (g/L)	50	60,12	75	89,88	100
AMM (g/L)	20	26,07	35	43,93	50
Ext. Lev. (g/L)	3	4,82	7,5	10,18	12

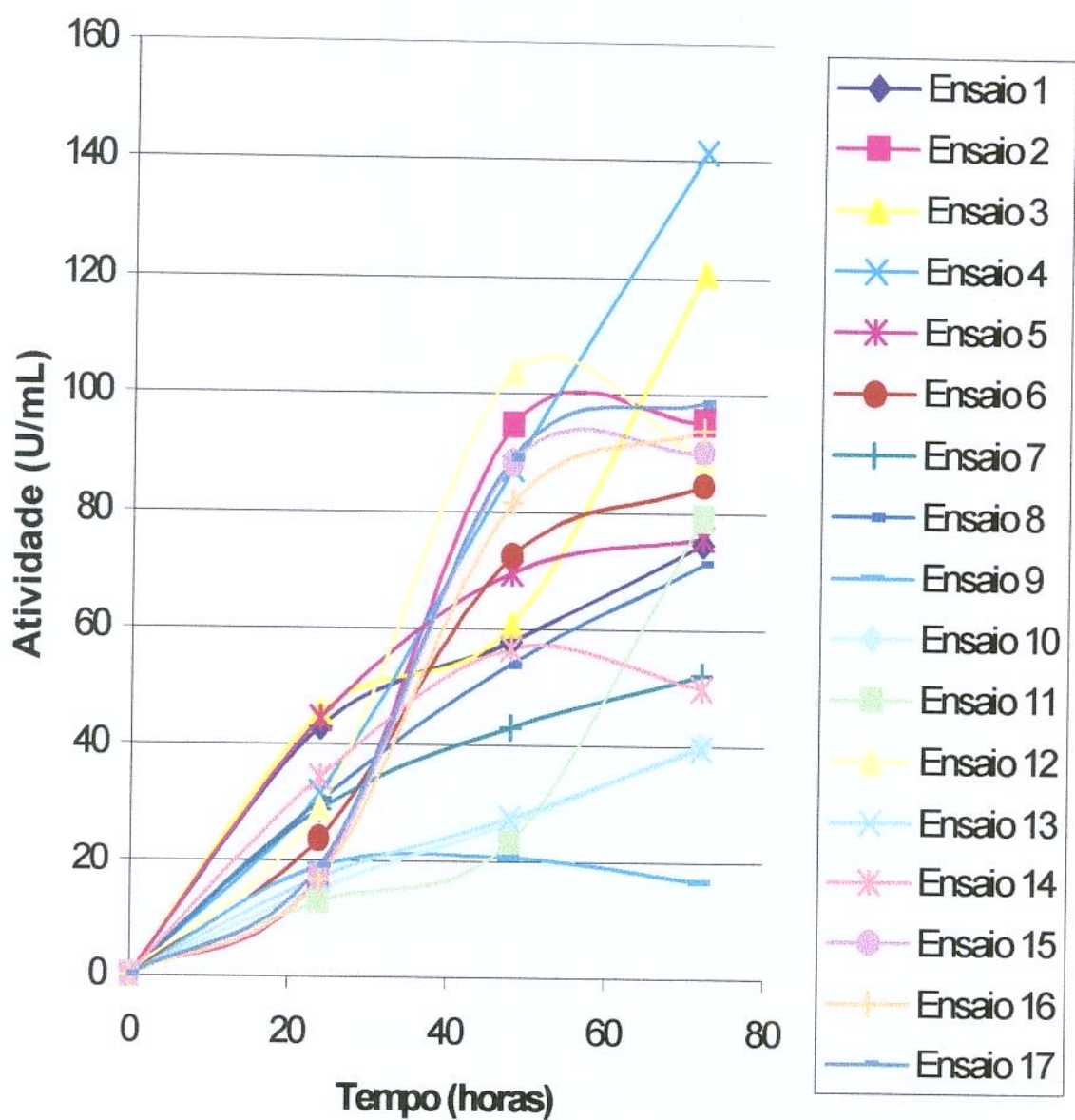


Figura 4.3: Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o segundo planejamento fatorial completo.

Os efeitos das variáveis sobre a atividade estão apresentados na tabela 4.8. O melão e a AMM apresentaram efeitos positivos sobre a atividade. No entanto, o extrato de levedura apresenta um efeito negativo, indicando que em concentrações maiores a atividade enzimática diminui. Isto pode ser verificado na tabela 4.6 onde os resultados dos ensaios 5 a 8, onde a concentração do extrato de levedura é de 10g/L (+1) apresentava atividades menores que dos ensaios 1 a 4, onde a concentração de extrato de levedura foi de 4,8g/L.

A tabela 4.9 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a atividade da inulinase, e a tabela 4.10 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,99 e o teste F (14,21 vezes maior maior que o valor tabelado) foram muito bons a 95% de confiança. Estes valores também permitem obter um modelo codificado (equação 4.2) que descreve as respostas em função das variáveis analisadas. Obteve-se então, um modelo de primeira ordem não linear para a atividade enzimática. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste.

$\text{Atividade} = 90,73 + 8,72.\text{Melão} + 7,01.\text{AMM} - 18,56.\text{Ext. lev.} - 16,20.\text{AMM}.\text{Ext.lev.}$	(4.2)
--	-------

A análise dos efeitos mostram que as concentrações do extrato de levedura devem ser diminuídas Isto pode ser explicado pelo fato do extrato de levedura possui em torno de 10,5% de nitrogênio, e assim, mesmo diminuindo a concentração da AMM, como a concentração do extrato de levedura foi aumentada, a concentração do nitrogênio continua elevada..

Tabela 4.8: Estimativa dos efeitos para a atividade de inulinase

	Efeito U/mL	Desvio padrão	t (2)	P	Lim. conf. – 95%	Lim. conf. +95%
Média *	90,73	1,28	70,70	0,0002	85,20	96,25
(1) Melaço (L)*	17,45	3,01	5,79	0,028	4,49	30,39
(2)AMM (L) *	14,02	3,01	4,66	0,043	1,07	26,97
(3) Ext. lev. (L)*	-37,12	3,01	-12,33	0,007	-50,07	-24,17
1L x 2L	2,38	3,01	0,79	0,511	-10,56	15,34
1L x 3L	-3,48	3,01	-1,16	0,367	-16,43	9,47
2L x 3L *	-32,41	3,01	-10,77	0,009	-45,36	-19,46

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.9: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

	Coef. de regressão	Desvio padrão	Lim. Conf. –95%	Lim. Conf. +95%
Média *	90,73	1,28	85,20	96,25
(1) Melaço (L)*	8,72	1,50	2,25	15,20
(2)AMM (L) *	7,01	1,50	0,54	13,49
(3) Ext. lev. (L)*	-18,56	1,50	-25,03	-12,08
1L x 2L	1,19	1,50	-5,28	7,67
1L x 3L	-1,74	1,50	-8,22	4,73
2L x 3L*	-16,20	1,50	-22,68	-9,73

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.10.: Análise de variância para a atividade de Inulinase

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	5858,00	4	1464,50	64,35
Resíduo	136,56	6	22,76	
Falta de ajuste	100,34	4		
Erro puro	36,27	2		
Total	5994,57	10		

Coefficiente de correlação: $R=0,99$

$$F_{0,95;4;6} = 4,53$$

O modelo para a atividade foi então utilizado para construir as superfícies de resposta. Analisando a figura 4.4 (a) e (b), verifica-se que a atividade enzimática é maior em maiores concentrações de melaço e de AMM, para esta faixa estudada, o que demonstra que estes níveis utilizados, podem ser incrementados. Na figura 4.4 (c) e (d), nota-se uma maior atividade em maiores concentrações de melaço, porém no caso do extrato de levedura, os níveis de concentração utilizados extrapolaram o ideal e causaram um efeito negativo prejudicando a atividade enzimática. A figura 4.4 (e) e (f), vê-se que as maiores atividades são obtidas com maiores concentrações de AMM, e novamente tem-se que a concentração de extrato de levedura deve ser diminuída. Assim, as superfícies indicam que as concentrações de melaço e AMM devem ser incrementadas para que o meio otimizado para a produção da inulinase seja obtido, e a de extrato de levedura deve ser diminuída para que possamos nos aproximar da otimização.

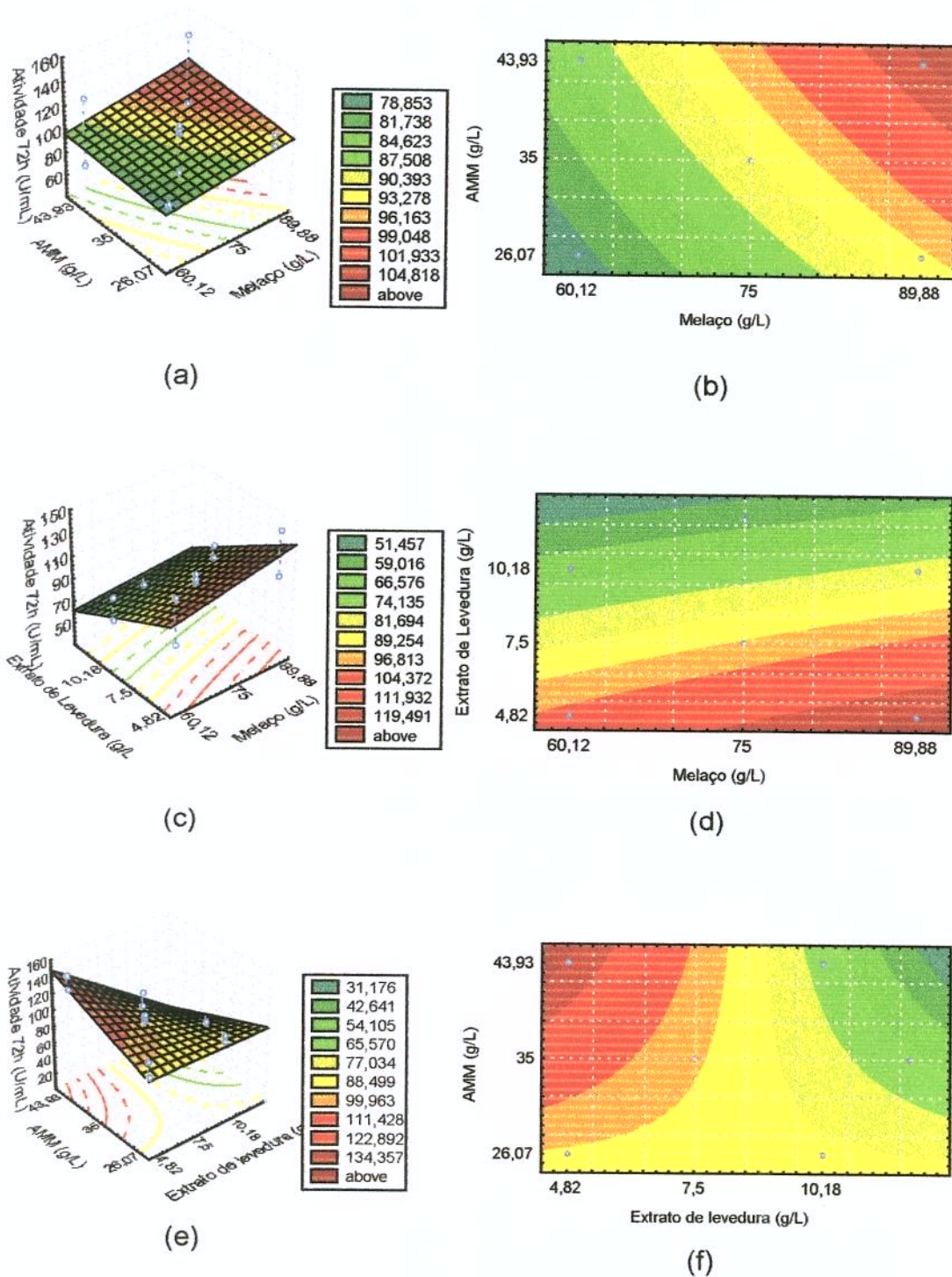


Figura 4.4: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: (a) e (b) da AMM e do melaço; (c) e (d) extrato de levedura e melaço e (e) e (f) extrato de levedura e AMM

A tabela 4.11 mostra a atividade sobre a sacarose e sobre a inulina às 72 horas de fermentação, e ainda a relação S/I, que demonstra se o que está ocorrendo é produção de invertase ou inulinase. Como, todos os valores da relação S/I são inferiores a 100, a enzima pode ser caracterizada como inulinase (Ettalibi & Baratti, 1987).

A tabela 4.12 contém os valores de pH das amostras retiradas nos três tempos durante a fermentação, nota-se através destes que o pH apresenta um leve acréscimo, acompanhando o aumento da atividade enzimática. O meio 4 que apresentou uma maior atividade em 72h de fermentação também teve um maior valor de pH, porém nota-se que observando os 17 meios de fermentação, os valores de pH em 72h não variaram consideravelmente.

A tabela 4.13 apresenta os valores obtidos de crescimento celular no decorrer da fermentação, semelhantemente ao comportamento do pH, estes valores de massa seca também acompanharam o crescimento da atividade enzimática.

Tanto para os valores de pH quanto os de massa seca, foram analisados estatisticamente da mesma forma que os resultados para a atividade enzimática, porém não observou-se ajuste, considerando que os valores de coeficientes de correlação encontrados foram demasiadamente baixos.

Tabela 4.11: Relação (S/I) para o segundo planejamento fatorial

Ensaio	Atividade 72h	Atividade 72h	S/I
	Sacarose (U/mL)	Inulina (U/mL)	
1	74,61	13,25	5,63
2	95,35	8,63	11,04
3	120,85	5,14	23,52
4	141,52	4,92	28,76
5	75,58	15,15	4,99
6	84,51	4,12	20,51
7	52,16	14,55	3,58
8	71,16	7,13	9,98
9	16,43	12,14	1,35
10	40,35	10,34	3,90
11	79,17	6,92	11,44
12	89,19	4,11	21,70
13	39,62	12,75	3,11
14	49,88	4,01	12,44
15	90,11	10,14	8,89
16	93,97	9,42	9,98
17	98,61	9,94	9,92

Tabela 4.12: Acompanhamento dos valores de pH para o segundo planejamento fatorial

Ensaio	pH 24h	pH 48h	pH 72h
1	3,75	3,79	3,93
2	3,56	3,62	3,74
3	4,43	4,5	4,58
4	3,87	4,23	4,35
5	4,23	4,44	4,52
6	3,73	3,96	4,22
7	3,65	3,73	4,92
8	3,99	4,65	4,78
9	3,74	3,73	5,05
10	3,74	3,82	4,33
11	3,6	3,61	3,75
12	4,72	4,9	4,3
13	3,63	3,66	3,85
14	3,69	3,86	3,66
15	3,91	4,45	4,54
16	3,94	4,65	4,7
17	3,84	4,41	4,37

Tabela 4.13: Acompanhamento dos valores de massa seca para o segundo planejamento fatorial

Ensaio	Massa seca 24h (g/Kg)	Massa seca 48h (g/Kg)	Massa seca 72h (g/Kg)
1	4,89	5,77	8,99
2	4,59	5,83	9,45
3	4,11	6,63	9,18
4	4,7	6,79	9,79
5	5,28	6,83	8,53
6	4,40	7,30	9,38
7	3,86	6,66	8,82
8	4,67	7,11	9,27
9	3,66	5,54	7,89
10	4,21	7,21	8,95
11	3,79	5,14	7,89
12	4,73	5,93	9,99
13	3,77	5,22	7,46
14	3,68	7,30	7,69
15	4,76	5,09	9,47
16	4,32	5,15	9,12
17	4,75	6,61	9,60

4.1.3. Terceiro planejamento fatorial

Este terceiro planejamento, demonstrado na tabela 4.14 com suas respectivas respostas para atividade enzimática foi elaborado baseado nas respostas do anteriormente realizado. Através dos valores de atividade obtidos, percebe-se que não houve aumento nos mesmos e sim, valores novamente elevados, como por exemplo, o ensaio 1, que atingiu 134,05 U/mL. Na tabela 4.15 tem-se os níveis de concentração estudados, estes níveis foram decididos após minuciosa análise dos planejamentos anteriores, e concluiu-se que as faixas dos níveis deveriam ser ampliadas, visto que o objetivo era obter os maiores valores de atividade nos pontos centrais, para o meio enfim, estar otimizado. Convém salientar o caso do melão, que foi o substrato que teve seus níveis de concentração bastante modificados, sendo o nível +1 bastante elevado, já que nas análises dos planejamentos anteriores verificou-se que havia tendência de aumento na atividade enzimática, caso a concentração do mesmo fosse incrementada.

Na figura 4.3, percebe-se que houve novamente um aumento na atividade da inulinase com o passar das horas de fermentação.

Tabela 4.14: Planejamento experimental completo codificado com atividade de inulinase (AI) nas 24, 48 e 72h de fermentação.

Ensaio	Melaço	AMM	Ext. Lev.	AI	AI	AI
				24h	48h	72h
				U/mL	U/mL	U/mL
1	-1	-1	-1	38,63	55,34	134,05
2	+1	-1	-1	9,34	12,19	13,59
3	-1	+1	-1	22,30	37,74	60,23
4	+1	+1	-1	19,38	27,35	33,04
5	-1	-1	+1	15,31	46,79	59,34
6	+1	-1	+1	14,93	18,68	23,63
7	-1	+1	+1	21,92	41,65	63,02
8	+1	+1	+1	20,20	25,06	35,83
9	-1,68	0	0	17,03	15,63	28,84
10	+1,68	0	0	17,54	22,77	28,21
11	0	-1,68	0	11,49	15,34	58,85
12	0	+1,68	0	25,79	54,13	94,16
13	0	0	-1,68	14,10	19,73	71,54
14	0	0	+1,68	23,89	31,26	82,98
15	0	0	0	17,59	34,31	55,91
16	0	0	0	22,11	28,97	85,39
17	0	0	0	14,42	45,36	93,78

Tabela 4.15: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço (g/L)	60	84,29	120	155,71	180
AMM (g/L)	40	48,09	60	71,90	80
Ext. Lev. (g/L)	2	3,21	5	6,79	8

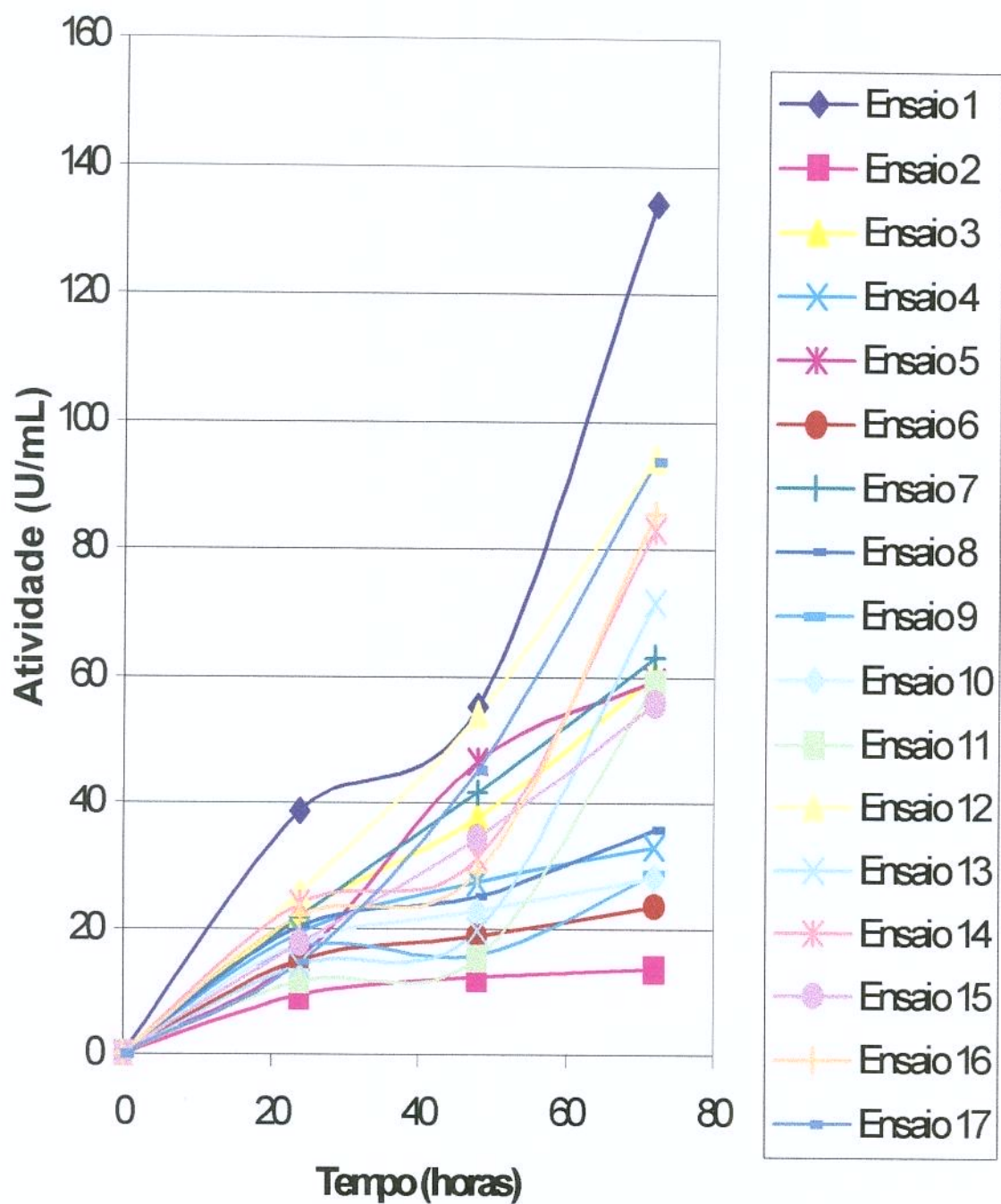


Figura 4.5: Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o terceiro planejamento fatorial completo.

A tabela 4.16 apresenta os efeitos das variáveis sobre a atividade, obtidos da mesma maneira que nos planejamentos anteriores. Analisando-se a referida tabela tem-se que a atividade da inulinase foi afetada mais significativamente (ao nível de significância de 0,05) pelo melaço, e este efeito foi negativo. Isto demonstra que os níveis selecionados para as concentrações deste substrato no meio foram acima do ideal, já que neste caso, estes níveis foram extrapolados, como já foi explicado no item 4.1.2. Da mesma forma, o extrato de levedura e a AMM tiveram efeito negativo e também significativo. No caso das interações de segunda ordem, todas as combinações apresentaram efeito positivo significativo.

A equação 4.3 representa o modelo obtido e estatisticamente significativo a 95% de confiança para o terceiro planejamento realizado.

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 46,33 - 26,32.\text{Melaço} - 4,81.\text{AMM} - 7,39.\text{Ext. lev.} + \\ & 12,72.\text{Melaço.AMM} + 10,59.\text{Melaço.Ext.lev.} + 8,78.\text{AMM.Ext.lev.} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Neste terceiro planejamento, considerando-se as composições dos substratos industriais utilizados, nota-se que as concentrações de carbono e nitrogênio foram extrapolados, causando inibição na produção da enzima inulinase, visto que a maior atividade alcançada foi no meio 1, onde as concentrações eram de melaço 84,29g/L, AMM 40g/L e extrato de levedura 3,21g/L.

Tabela 4.16: Estimativa dos efeitos para a atividade de inulinase

	Efeito U/mL	Desvio padrão	t (2)	p	Lim. conf. – 95%	Lim. Conf. +95%
Média *	46,33	0,25	185,73	0,000	45,26	47,40
(1) Melaço (L)*	-52,64	0,59	-89,98	0,000	-55,15	-50,12
(2)AMM (L) *	-9,62	0,59	-16,45	0,004	-12,14	-7,11
(3) Ext. lev. (L)*	-14,77	0,59	-25,25	0,002	-17,29	-12,25
1L x 2L	25,45	0,59	43,50	0,001	22,93	27,96
1L x 3L	21,19	0,59	36,22	0,001	18,67	23,70
2L x 3L *	17,56	0,59	30,02	0,001	15,04	20,08

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.17: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

	Coef. de regressão	Desvio padrão	Lim. conf. –95%	Lim. Conf. +95%
Média *	46,33	0,25	45,26	47,40
(1) Melaço (L)*	-26,32	0,29	-27,58	-25,06
(2)AMM (L) *	-4,81	0,29	-6,07	-3,55
(3) Ext. lev. (L)*	-7,39	0,29	-8,64	-6,13
1L x 2L *	12,72	0,29	11,47	13,98
1L x 3L *	10,59	0,29	9,34	11,85
2L x 3L*	8,78	0,29	7,52	10,04

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.18.: Análise de variância para a Atividade de Inulinase

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	8972,90	4	2243,23	6,28
Resíduo	2142,82	6	357,14	
Falta de ajuste	2141,45	4		
Erro puro	1,37	2		
Total	11115,72	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,90$

$F_{0,95;4;6} = 4,53$

O modelo para a atividade foi então utilizado para construir as superfícies de resposta. Analisando a figura 4.6 (a) e (b), verifica-se que a atividade enzimática é maior em menores concentrações de melaço e de AMM, o que demonstra que estes níveis utilizados, devem ser diminuídos. Na figura 4.6 (c) e (d), nota-se uma maior atividade em menores concentrações de melaço e no caso do extrato de levedura, os níveis de concentração utilizados extrapolaram o ideal e causaram um efeito negativo prejudicando a atividade enzimática. A figura 4.6 (e) e (f), vê-se que as maiores atividades são obtidas com menores concentrações de AMM, e novamente tem-se que a concentração de extrato de levedura deve ser diminuída. Assim, as superfícies indicam que as concentrações de melaço e AMM devem ser diminuídas para que o meio otimizado para a produção da inulinase seja obtido.

Sendo assim, partiu-se para alguns testes individuais, com diferentes combinações de concentrações de substrato no meio, visando verificar se nestas a atividade enzimática ainda apresentaria possibilidade de crescimento.

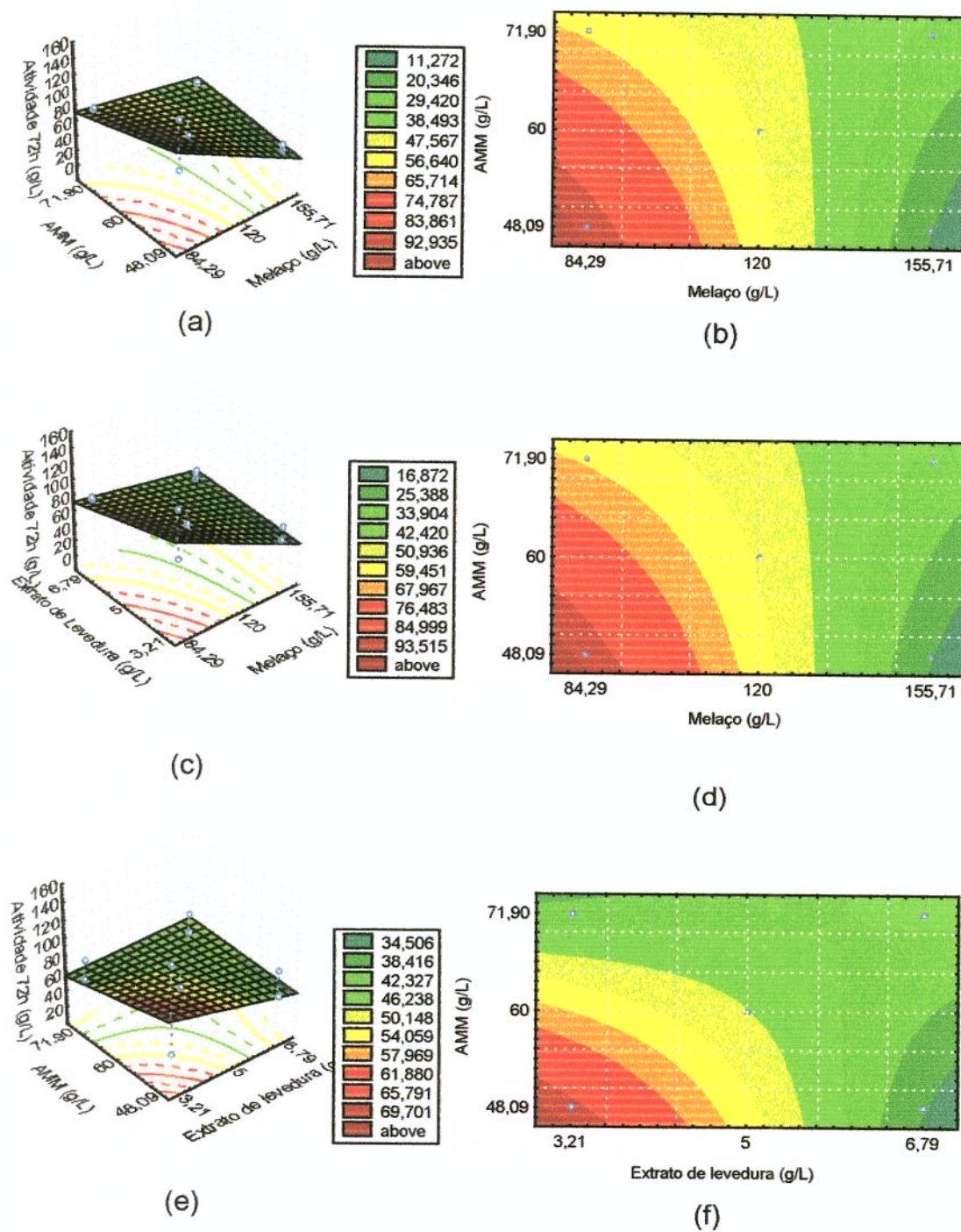


Figura 4.6: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: (a) e (b) da AMM e do melaço; (c) e (d) extrato de levedura e melaço e (e) e (f) extrato de levedura e AMM

Tabela 4.19: Relação (S/I) para o terceiro planejamento fatorial

Ensaio	Atividade 72h	Atividade 72h	S/I
	Sacarose (U/mL)	Inulina (U/mL)	
1	134,05	5,06	26,49
2	13,59	7,82	1,74
3	60,23	4,01	15,02
4	33,04	12,85	2,57
5	59,34	3,94	15,06
6	23,63	10,12	2,33
7	63,02	3,98	15,83
8	35,83	12,85	2,79
9	28,84	11,54	2,49
10	28,21	11,89	2,37
11	58,85	3,94	14,94
12	94,16	12,35	7,62
13	71,54	5,06	14,14
14	82,98	4,01	20,69
15	55,91	3,96	14,12
16	85,39	4,06	21,03
17	93,78	13,46	6,97

A tabela 4.19 apresenta a atividade sobre a sacarose e sobre a inulina às 72 horas de fermentação, e ainda a relação S/I, nota-se que o comportamento foi semelhante ao do planejamento anteriormente realizado. Conforme o meio utilizado, a enzima atua mais sobre a sacarose do que sobre a inulina.

Tabela 4.20: Acompanhamento dos valores de pH para o terceiro planejamento fatorial

Ensaio	PH 24h	pH 48h	pH 72h
1	3,57	3,99	4,78
2	3,50	3,61	3,73
3	3,97	4,03	4,52
4	3,80	3,93	3,99
5	3,62	3,82	3,94
6	3,73	3,86	3,97
7	3,65	3,93	4,22
8	3,59	3,85	3,89
9	3,74	3,78	3,82
10	3,74	3,82	3,89
11	3,6	3,61	3,96
12	3,82	3,94	4,13
13	3,63	3,76	3,95
14	3,69	3,86	3,96
15	3,91	4,05	4,24
16	3,94	4,06	4,27
17	3,95	4,01	4,17

A tabela 4.20 contém os valores de pH das amostras retiradas nos três tempos durante a fermentação, novamente o pH foi acompanhando o crescimento da atividade enzimática, sendo o valor mais elevado de pH obtido no meio que apresentou a maior atividade enzimática, porém novamente os valores de pH não variaram consideravelmente entre os 17 meios utilizados.

Tabela 4.21: Acompanhamento dos valores de massa seca para o terceiro planejamento fatorial

Ensaio	Massa seca 24h (g/Kg)	Massa seca 48h (g/Kg)	Massa seca 72h (g/Kg)
1	4,91	7,77	10,01
2	3,59	5,81	7,45
3	4,10	6,60	8,18
4	3,71	5,79	8,72
5	3,88	5,89	8,52
6	4,41	6,30	8,33
7	4,56	6,65	8,81
8	4,67	7,11	9,27
9	3,62	5,63	7,99
10	3,21	5,51	7,95
11	3,78	5,64	8,03
12	4,63	6,14	8,99
13	3,76	6,02	7,96
14	4,12	7,38	8,56
15	4,23	6,54	9,54
16	4,32	6,15	9,42
17	4,35	6,61	9,60

A tabela 4.21 apresenta os valores obtidos de crescimento celular no decorrer da fermentação, semelhantemente ao comportamento do pH, estes valores de massa seca também acompanharam o crescimento da atividade enzimática.

4.1.4. Testes intermediários

Com o intuito de verificar se a atividade enzimática ainda poderia sofrer um incremento, foram realizadas análises com diferentes meios, expostos na tabela 4.22. Estes meios têm valores de concentração intermediária aos usados no planejamento anterior, pois principalmente em relação ao melaço, os níveis utilizados anteriormente foram bastante altos. Com os resultados obtidos, verificou-se que o ensaio de número 5, consistia na combinação ideal entre os três substratos utilizados, onde foi obtido um valor de 132,79U/mL para a atividade enzimática. Após isso, decidiu-se realizar um quarto planejamento experimental, onde as concentrações deste ensaio serão as dos pontos centrais.

Tabela 4.22: Resultados obtidos nos testes intermediários

Ensaio	Melaço (g/L)	AMM (g/L)	Ext. Lev. (g/L)	Atividade 48h (U/mL)	Atividade 72h (U/mL)
1	80	60	4	21,82	26,43
2	90	30	5	40,98	128,49
3	100	50	6	65,19	66,20
4	110	40	3	62,52	59,34
5	90	45	4	55,94	132,79
6	100	50	4	38,79	56,16
7	110	55	4	43,93	57,94
8	120	60	4	28,11	57,05

4.1.5. Quarto planejamento fatorial

Considerando que as concentrações dos substratos no ponto central já haviam sido definidas nos testes individuais demonstrados no item 4.1.4, definiu-se os demais níveis e realizou-se um quarto planejamento, os resultados das atividades estão na tabela 4.23, e os níveis estudados na tabela 4.24.

A figura 4.7 mostra a evolução nos valores de atividade durante a fermentação.

Neste quarto planejamento realizado, verificou-se os parâmetros quadráticos sendo válidos estatisticamente, ajustando-se ao modelo.

A tabela 4.25 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a atividade da inulinase, e a tabela 4.26 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,89, e o teste F (3,63 vezes maior que o valor tabelado) podem ser considerados bastante satisfatórios a 95% de confiança, e permitem obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas. Através da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática (equação 4.4).

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 136,11 + 6,09.\text{Melaço} - 18,71.\text{Melaço}^2 + 4,03.\text{AMM} - 12,02.\text{AMM}^2 + \\ & 1,12.\text{Ext. lev.} - 19,25.\text{Ext. lev.}^2 + 0,18.\text{Melaço}.\text{AMM} + 1,79.\text{Melaço}.\text{Ext.lev.} - \\ & 16,53.\text{AMM}.\text{Ext.lev.} \end{aligned} \quad (4.4)$$

Tabela 4.23: Planejamento experimental completo codificado com atividade de inulinase (AI) nas 24, 48 e 72h de fermentação.

Ensaio	Melaço	AMM	Ext. Lev.	AI	AI	AI
				24h	48h	72h
				U/mL	U/mL	U/mL
1	-1	-1	-1	21,35	44,98	64,04
2	+1	-1	-1	41,68	69,29	89,07
3	-1	+1	-1	54,26	95,78	111,06
4	+1	+1	-1	64,56	109,79	118,55
5	-1	-1	+1	54,31	82,53	102,44
6	+1	-1	+1	62,41	94,49	116,39
7	-1	+1	+1	33,42	48,41	65,06
8	+1	+1	+1	59,47	81,31	98,01
9	-1,68	0	0	34,18	47,76	68,83
10	+1,68	0	0	40,42	55,56	71,03
11	0	-1,68	0	27,09	53,08	78,64
12	0	+1,68	0	34,32	86,34	98,99
13	0	0	-1,68	25,84	44,92	63,63
14	0	0	+1,68	39,77	59,47	73,19
15	0	0	0	58,13	78,13	137,99
16	0	0	0	56,97	76,79	135,71
17	0	0	0	48,51	77,44	139,39

Tabela 4.24: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço (g/L)	70	78,09	90	101,9	110
AMM (g/L)	30	36,07	45	53,93	60
Ext. Lev. (g/L)	2	2,81	4	5,19	6

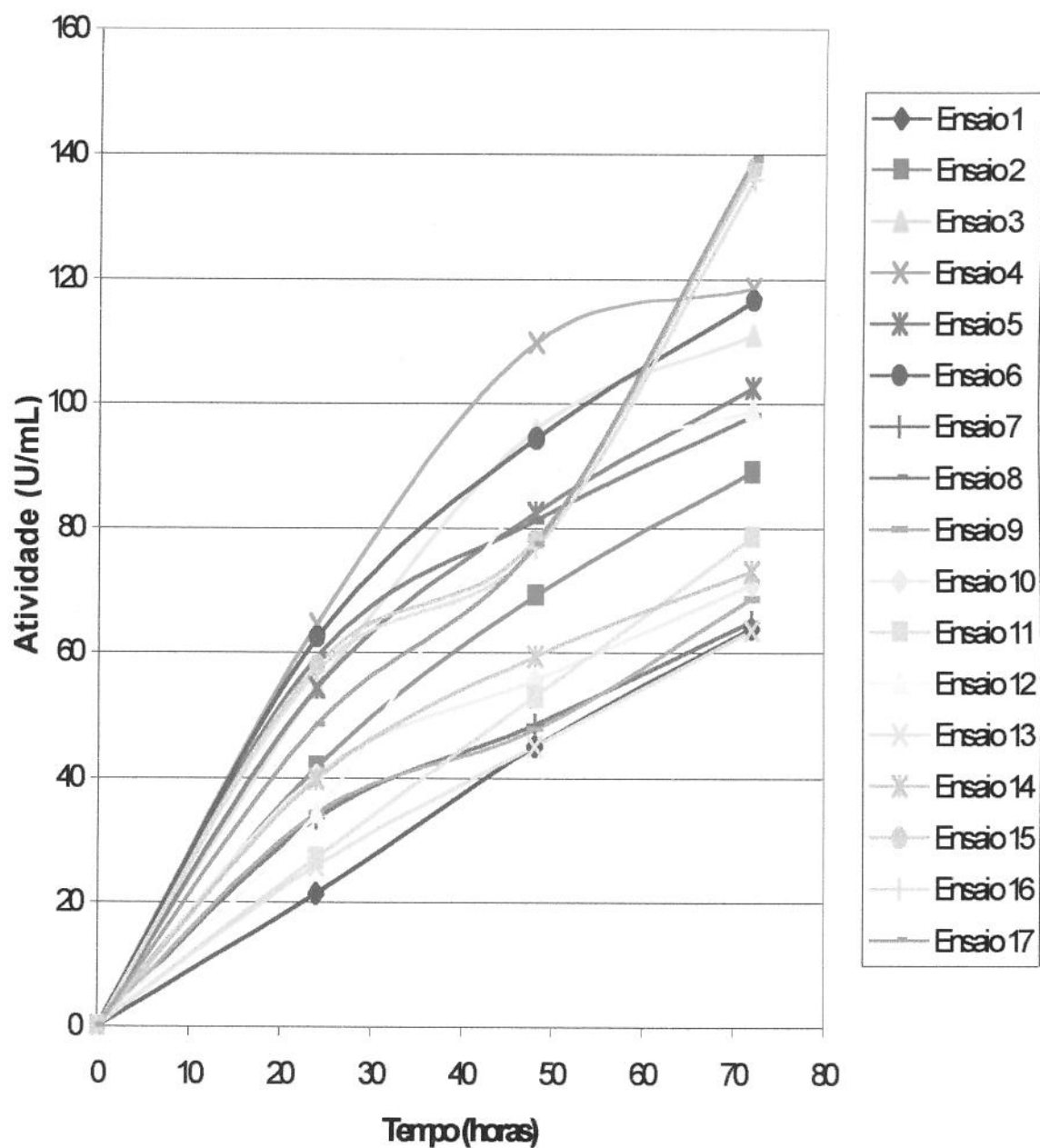


Figura 4.7: Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o quarto planejamento fatorial completo.

Tabela 4.25: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

	Coef. De regressão	Desvio padrão	Lim. conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média *	136,11	1,07	131,51	140,72
(1) Melaço (L)*	6,09	0,50	3,93	8,26
Melaço (Q)*	-18,71	0,55	-21,09	-16,33
(2) AMM (L) *	4,03	0,50	1,86	6,19
AMM (Q) *	-12,02	0,55	-14,40	-9,63
(3) Ext. lev. (L)	1,12	0,50	-1,05	3,28
Ext. lev. (Q)*	-19,25	0,55	-21,63	-16,86
1L x 2L	0,18	0,66	-2,64	3,01
1L x 3L	1,79	0,66	-1,03	4,62
2L x 3L*	-16,53	0,66	-19,36	-13,71

Tabela 4.26.: Análise de variância para a Atividade de Inulinase

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	9322	4	2330,5	11,83
Resíduo	2364,19	12	197,02	
Falta de ajuste	2357,29	10		
Erro puro	6,90	2		
Total	11686,19	6		

Coefficiente de correlação: $R=0,89$

$$F_{0,95;4;12} = 3,26$$

Após as análises, o modelo para a atividade foi então utilizado para construir as superfícies de resposta. Analisando a figura 4.8, verifica-se que o meio de cultura para produção da inulinase deve ser fixado em: melaço 90g/L, AMM 45 g/L, extrato de

levedura 4g/L, K_2HPO_4 1g/L e pH3,5. Nestas condições a atividade de inulinase alcançou, com meio complexo, 137,7 U/mL, o que é um valor elevado, comparável ao atingido por Kalil (2000), que foi de 127 U/mL, em meio sintético.

Nas tabelas 4.28 e 4.29 percebeu-se novamente, após análise estatística, que mesmo os valores de pH e massa seca serem maiores nos meios que apresentaram maiores atividades enzimáticas (pontos centrais), não houve ajuste a um modelo, visto que novamente obteve-se coeficientes de correlação muito baixos.

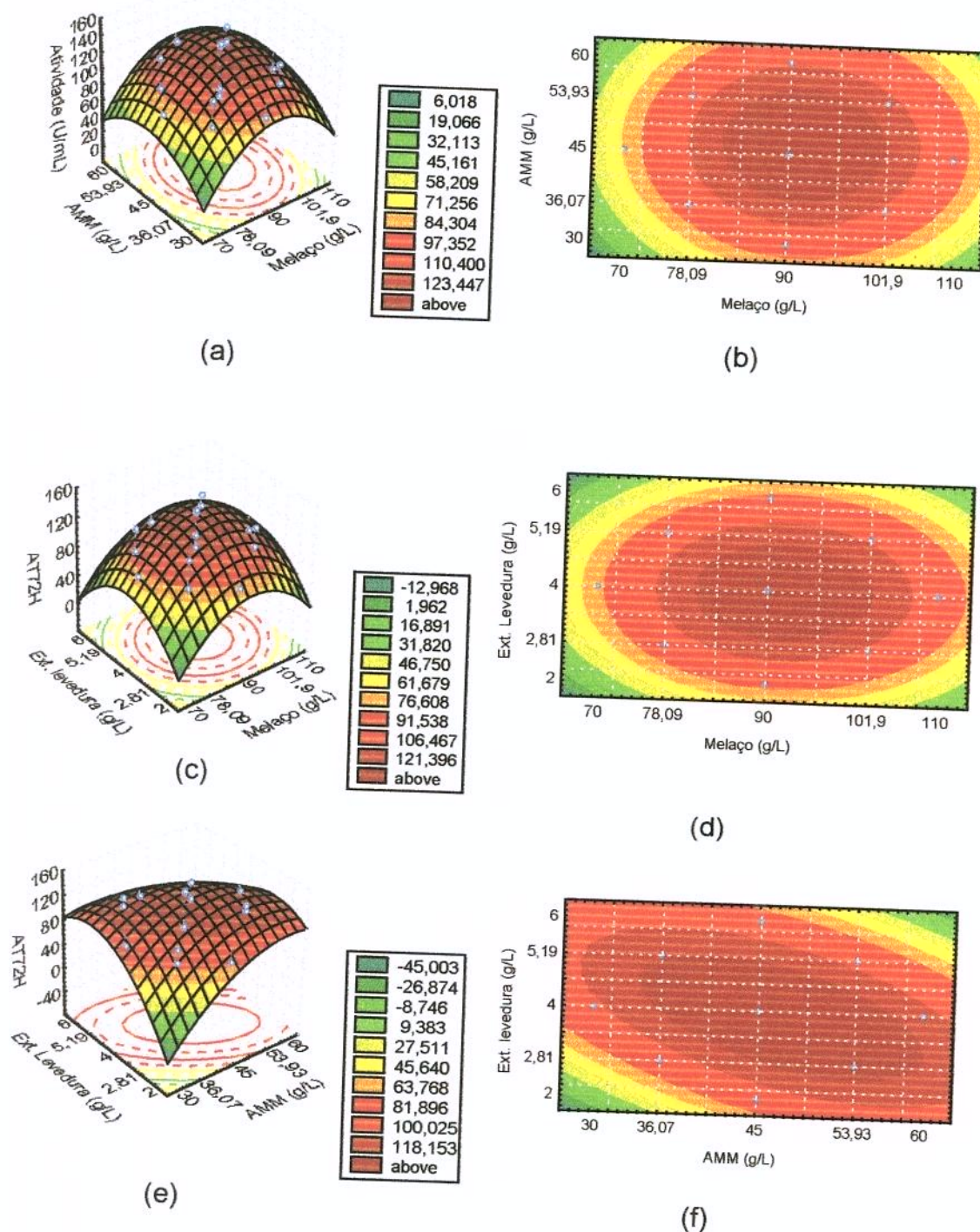


Figura 4.9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: (a) e (b) da AMM e do melaço; (c) e (d) extrato de levedura e melaço e (e) e (f) extrato de levedura e AMM

Tabela 4.27: Relação (S/I) para o quarto planejamento fatorial

Ensaio	Atividade 72h Sacarose (U/mL)	Atividade 72h Inulina (U/mL)	S/I
1	64,04	13,23	4,84
2	89,07	5,44	16,37
3	111,06	10,52	10,56
4	118,55	12,37	9,58
5	102,44	13,49	7,59
6	116,39	13,48	8,63
7	65,06	14,16	4,59
8	98,01	9,31	10,53
9	68,83	13,41	5,13
10	71,03	8,42	8,44
11	78,64	8,34	9,43
12	98,99	9,69	10,22
13	63,63	12,12	5,25
14	73,19	8,12	9,01
15	137,99	4,51	30,50
16	135,71	4,37	31,05
17	139,39	4,63	30,11

A tabela 4.27 mostra a atividade sobre a sacarose e sobre a inulina às 72 horas de fermentação, e ainda a relação S/I. Nota-se o mesmo comportamento observado nos planejamentos anteriores.

Tabela 4.28: Acompanhamento dos valores de pH para o quarto planejamento fatorial

Ensaio	pH 24h	pH 48h	pH 72h
1	3,64	3,84	4,03
2	3,75	4,01	4,12
3	3,83	4,10	4,21
4	3,91	4,23	4,26
5	3,82	4,15	4,19
6	3,89	4,20	4,15
7	3,58	3,89	3,99
8	3,84	4,03	4,03
9	3,53	3,91	3,89
10	4,55	3,75	3,96
11	3,60	3,72	3,99
12	3,54	4,09	4,10
13	3,58	3,90	4,02
14	3,50	4,10	4,04
15	3,82	4,10	4,32
16	3,80	4,13	4,29
17	3,76	4,21	4,37

A tabela 4.28 contém os valores de pH das amostras retiradas nos três tempos durante a fermentação, nota-se através destes que o pH vai crescendo, acompanhando o aumento da atividade enzimática.

Tabela 4.29: Acompanhamento dos valores de massa seca para o quarto planejamento fatorial

Ensaio	Massa seca 24h (g/Kg)	Massa seca 48h (g/Kg)	Massa seca 72h (g/Kg)
1	3,91	4,23	5,70
2	4,23	5,70	7,45
3	4,24	6,02	8,99
4	4,32	6,66	8,01
5	4,20	6,51	8,88
6	4,35	6,99	8,77
7	4,15	4,99	6,02
8	4,36	6,66	7,99
9	4,04	4,98	6,03
10	4,11	5,04	6,41
11	3,94	5,10	7,02
12	3,95	6,66	7,99
13	3,96	4,26	6,91
14	3,88	4,54	7,02
15	3,99	6,89	9,02
16	4,10	6,91	9,21
17	4,13	6,94	9,15

A tabela 4.29 apresenta os valores obtidos de crescimento celular no decorrer da fermentação, nota-se que estes valores de massa seca também acompanharam o crescimento da atividade enzimática.

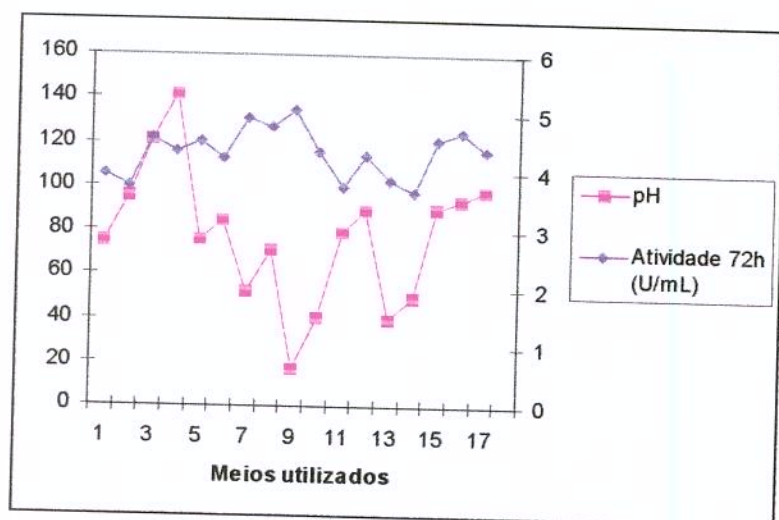


Figura 4.10: Comportamento do pH comparado a atividade enzimática em 72h de fermentação.

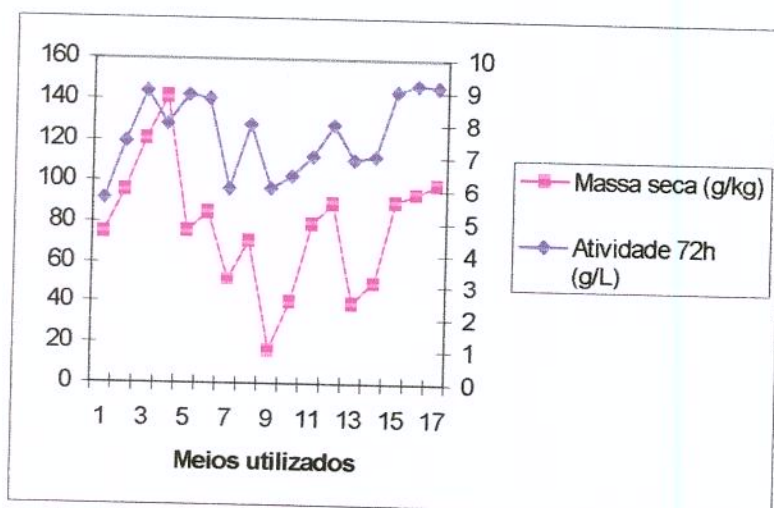


Figura 4.11: Comportamento da massa seca comparado a atividade enzimática em 72h de fermentação.

As figuras 4.10 e 4.11 permitem uma melhor visualização do comportamento dos 17 meios de fermentação em relação ao pH e a massa seca, quando comparadas as atividades enzimáticas obtidas em 72h de fermentação.

4.1.6. Testes individuais retirando o K_2HPO_4 e substituindo o extrato de levedura por Prodexlac

Tendo em vista que o principal objetivo do presente trabalho é reduzir o custo do meio de produção da inulinase, foram realizados alguns testes individuais retirando do meio de cultura o K_2HPO_4 , e substituindo o extrato de levedura, substrato de maior custo no meio de produção previamente otimizado, pelo *Prodexlac*, produto cedido pela indústria Prodesa S.A., cuja composição está apresentada no item 3.1.3 do capítulo Material e Métodos.

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 4.30 e 4.31, e mostram que no caso da retirada do fosfato, a atividade decresce muito pouco, quando comparado com os ensaios 15 a 17 da tabela 4.23 que apresentaram um valor médio de 137,7U/mL nas mesmas concentrações de melaço, AMM e extrato de levedura. Isto é certamente interessante tendo em vista o custo do *Prodexlac*, que é apresentado no item 4.2, do mesmo capítulo. Estes ensaios foram realizados em triplicata para que pudesse ser verificado a reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 4.30: Teste do meio otimizado, sem a presença do K_2HPO_4

Ensaio	Melaço (g/L)	AMM (g/L)	Ext. Lev. (g/L)	Atividade 72h (U/mL)
1	90	45	4	119,47
2	90	45	4	119,95
3	90	45	4	127,21

Tabela 4.31: Teste do meio otimizado, substituindo o extrato de levedura por Prodexlac

Ensaio	Melaço (g/L)	AMM (g/L)	Protexase (g/L)	Atividade 72h (U/mL)
1	90	45	5,2	100,29
2	90	45	5,2	88,86
3	90	45	5,2	90,17

4.1.7. Quinto planejamento fatorial

A partir dos resultados dos testes individuais do item 4.1.6, decidiu-se fazer mais um planejamento experimental, testando o meio sem o K_2HPO_4 e substituindo o extrato de levedura pelo *Prodexlac*. A tabela 4.32 e a tabela 4.33, mostram os resultados e os níveis utilizados, respectivamente.

A figura 4.12 mostra o incremento na atividade da enzima com o decorrer do tempo de fermentação.

Tabela 4.32: Planejamento experimental completo codificado com atividade de inulinase (AI) nas 24, 48 e 72h de fermentação.

Ensaio	Melaço	AMM	Prodexlac	AI 24h U/mL	AI 48h U/mL	AI 72h U/mL
1	-1	-1	-1	52,86	70,75	88,74
2	+1	-1	-1	17,27	19,29	37,64
3	-1	+1	-1	42,17	57,41	63,37
4	+1	+1	-1	31,80	50,15	78,02
5	-1	-1	+1	28,17	71,94	72,54
6	+1	-1	+1	28,35	41,45	52,29
7	-1	+1	+1	62,06	98,50	103,63
8	+1	+1	+1	31,98	37,52	44,55
9	0	0	0	31,56	86,83	97,55
10	0	0	0	32,93	83,38	88,98
11	0	0	0	36,38	85,05	93,97

Tabela 4.33: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1	0	+1
Melaço (g/L)	70	90	110
AMM (g/L)	30	45	60
Prodexlac (g/L)	5	5,5	6

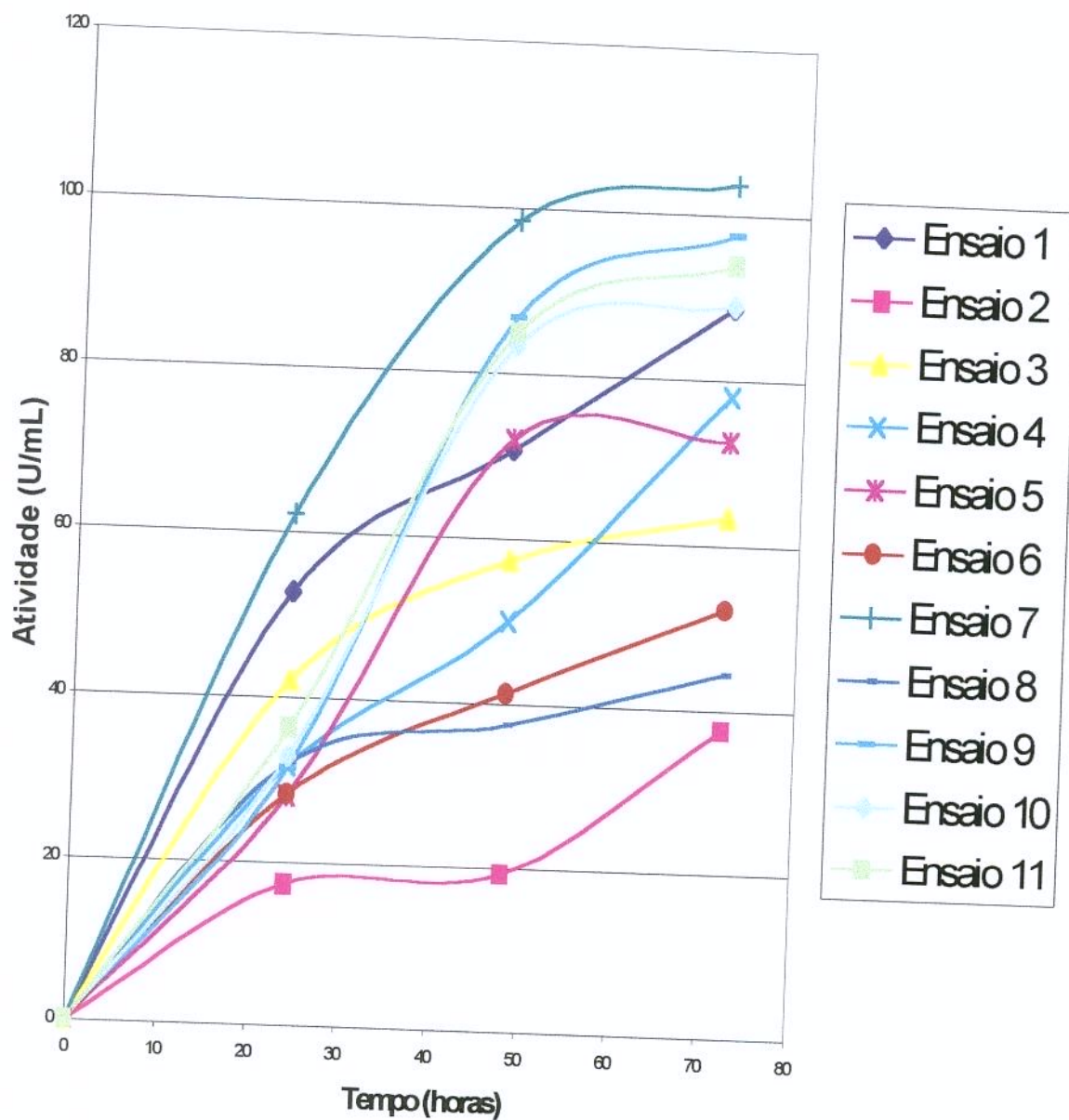


Figura 4.12: Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o quinto planejamento fatorial completo.

Após análise das respostas, obteve-se a tabela 4.34, na qual verifica-se um coeficiente de correlação muito baixo, não permitindo então a validação do modelo, demonstrando grande falta de ajuste. Logo, através dos efeitos, partiu-se para um sexto planejamento, alterando-se a faixa de estudo do melaço e do *Prodexlac*.

Tabela 4.34: Estimativa dos efeitos para a atividade de inulinase

	Efeito U/mL	Desvio padrão	t (2)	P	Lim. conf. – 95%	Lim. conf. +95%
Média *	74,66	1,30	57,53	0,000	69,08	80,25
(1) Melaço (L)	-28,95	3,04	-9,51	0,011	-42,04	-15,85
(2) AMM (L)	9,59	3,04	3,15	0,088	-3,51	22,69
(3) Prodexlac (L)	1,31	3,04	0,43	0,709	-11,79	14,41
1L x 2L	6,73	3,04	2,21	0,158	-6,37	19,83
1L x 3L	-10,72	3,04	-3,52	0,072	-23,82	2,38
2L x 3L	2,09	3,04	0,69	0,564	-11,01	15,18

* fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Coeficiente de correlação: R=0,66

4.1.8. Sexto planejamento fatorial

As tabelas 4.35 e 4.36 demonstram as condições de realização deste sexto planejamento, e nota-se que as maiores atividades obtidas no mesmo estão nos pontos centrais, sendo que estas ficam em torno de 113,5U/mL. Conclui-se então, que com essas novas mudanças no meio, tem-se um meio de menor custo também otimizado composto por: melaço 80g/L, AMM 50g/L e *Prodexlac* 4,5g/L.

A figura 4.13 facilita a visualização do comportamento da atividade durante as 72h de fermentação.

Tabela 4.36: Planejamento experimental completo codificado com atividade de inulinase (AI) nas 24, 48 e 72h de fermentação.

Ensaio	Melaço	AMM	Prodexlac	AI 24h U/mL	AI 48h U/mL	AI 72h U/mL
1	-1	-1	-1	30,52	50,86	67,54
2	+1	-1	-1	50,58	70,79	81,72
3	-1	+1	-1	45,12	52,17	76,12
4	+1	+1	-1	57,56	68,52	89,23
5	-1	-1	+1	46,87	52,91	72,04
6	+1	-1	+1	58,25	66,86	87,31
7	-1	+1	+1	36,98	44,79	70,63
8	+1	+1	+1	50,12	66,66	94,46
9	-1,68	0	0	30,22	39,79	49,79
10	1,68	0	0	65,18	75,63	89,04
11	0	-1,68	0	40,56	48,69	61,58
12	0	1,68	0	52,32	53,60	69,04
13	0	0	-1,68	24,05	29,06	31,33
14	0	0	1,68	30,15	34,54	27,99
15	0	0	0	59,87	96,56	112,24
16	0	0	0	60,23	98,45	114,65
17	0	0	0	63,21	97,23	113,82

Tabela 4.37: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1,68	-1	0	+1	1,68
Melaço (g/L)	50	62,14	80	97,86	110
AMM (g/L)	30	38,09	50	61,90	70
Prodexlac (g/L)	3	3,61	4,5	5,39	6

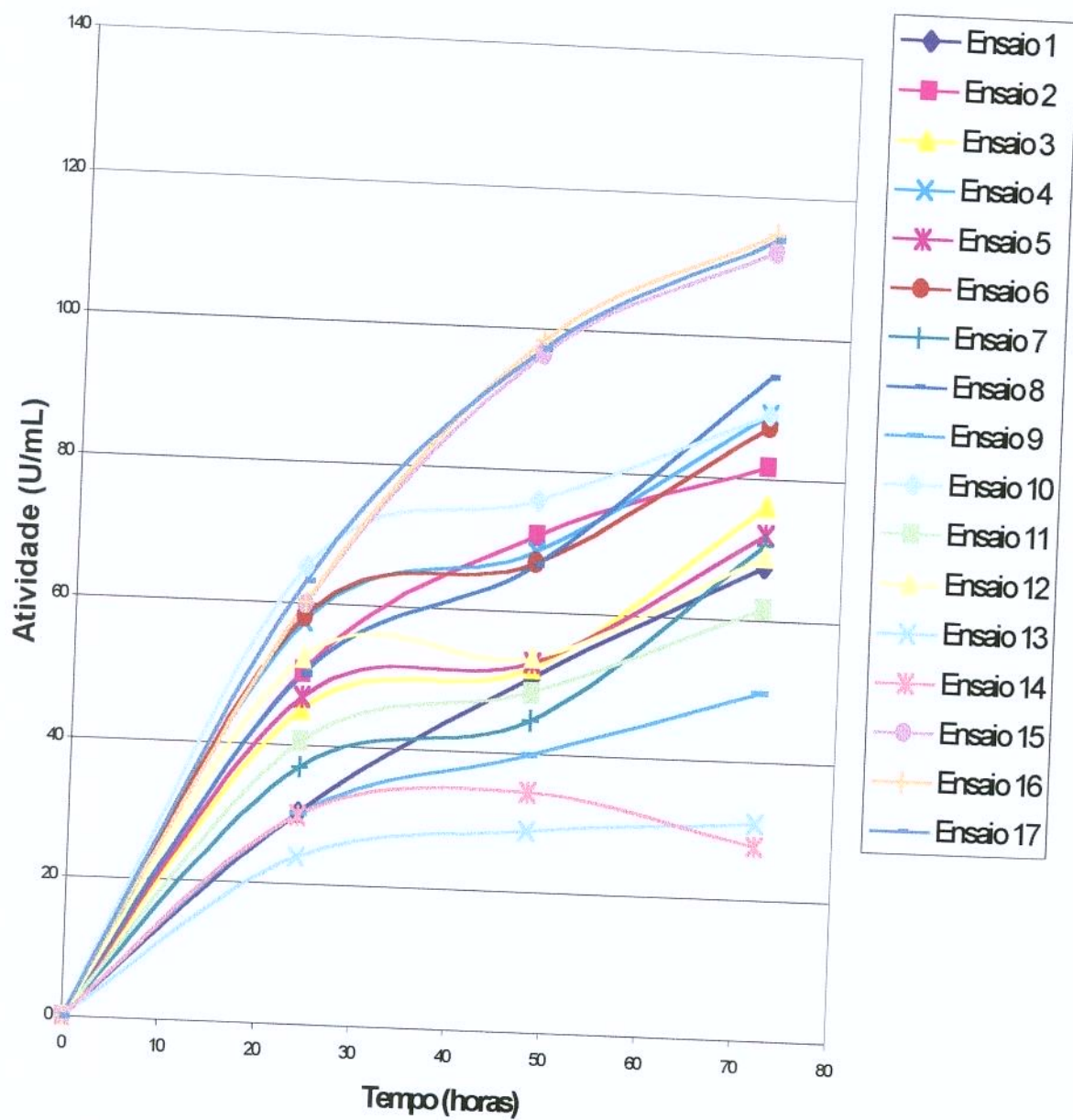


Figura 4.13: Acompanhamento da atividade enzimática nas 24, 48 e 72h de fermentação para o sexto planejamento fatorial completo.

A tabela 4.37 apresenta coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a atividade da inulinase, e a tabela 4.38 apresenta a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,85, e o teste F (2,43 vezes maior que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 95% de confiança. Através da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática (equação 4.5).

$$\text{Atividade} = 111,58 + 10,36.\text{Melaço} - 8,97.\text{Melaço}^2 + 2,01.\text{AMM} - 10,43.\text{AMM}^2 - 23,06.\text{Prodexlac}^2 \quad (4.5)$$

Tabela 4.37: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

	Coef. De regressão	Desvio padrão	Lim. conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média *	111,58	0,71	108,54	114,61
(1) Melaço (L)*	10,36	0,33	8,93	11,78
Melaço (Q)*	-8,97	0,37	-10,54	-7,40
(2)AMM (L) *	2,01	0,33	0,58	3,43
AMM (Q) *	-10,43	0,37	-11,99	-8,85
(3) Prodexlac (L)	-0,06	0,33	-1,48	1,37
Prodexlac (Q)*	-23,06	0,37	-24,63	-21,49
1L x 2L	0,06	0,43	-1,80	1,92
1L x 3L	0,85	0,43	-1,01	2,71
2L x 3L	-0,92	0,43	-2,78	0,94

*fatores estatisticamente significativos (95% de confiança)

Tabela 4.38.: Análise de variância para a Atividade de Inulinase

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	7682,1	4	1920,53	7,93
Resíduo	2904,71	12	242,06	
Falta de ajuste	2901,71	10		
Erro puro	3,00	2		
Total	10586,81	6		

Coeficiente de correlação: $R=0,85$

$$F_{0,95;4;12}= 3,26$$

Após as análises, o modelo para a atividade foi então utilizado para construir as superfícies de resposta. Analisando a figura 4.14, verifica-se que o meio de cultivo para produção da inulinase atingiu a atividade máxima ao redor de 113U/mL, novamente um ótimo valor, comparável novamente ao atingido por Kalil (2000), que foi de 127 U/mL, porém com meio sintético.

Esta máxima atividade obtida é um pouco inferior ao meio otimizado que contém extrato de levedura ao invés do Prodexlac. Isto pode ter ocorrido devido a diferente composição dos mesmos. O Prodexlac possui concentração protéica superior, porém a composição deste produto e do extrato de levedura em relação aos aminoácidos e vitaminas, podem ser distintas.

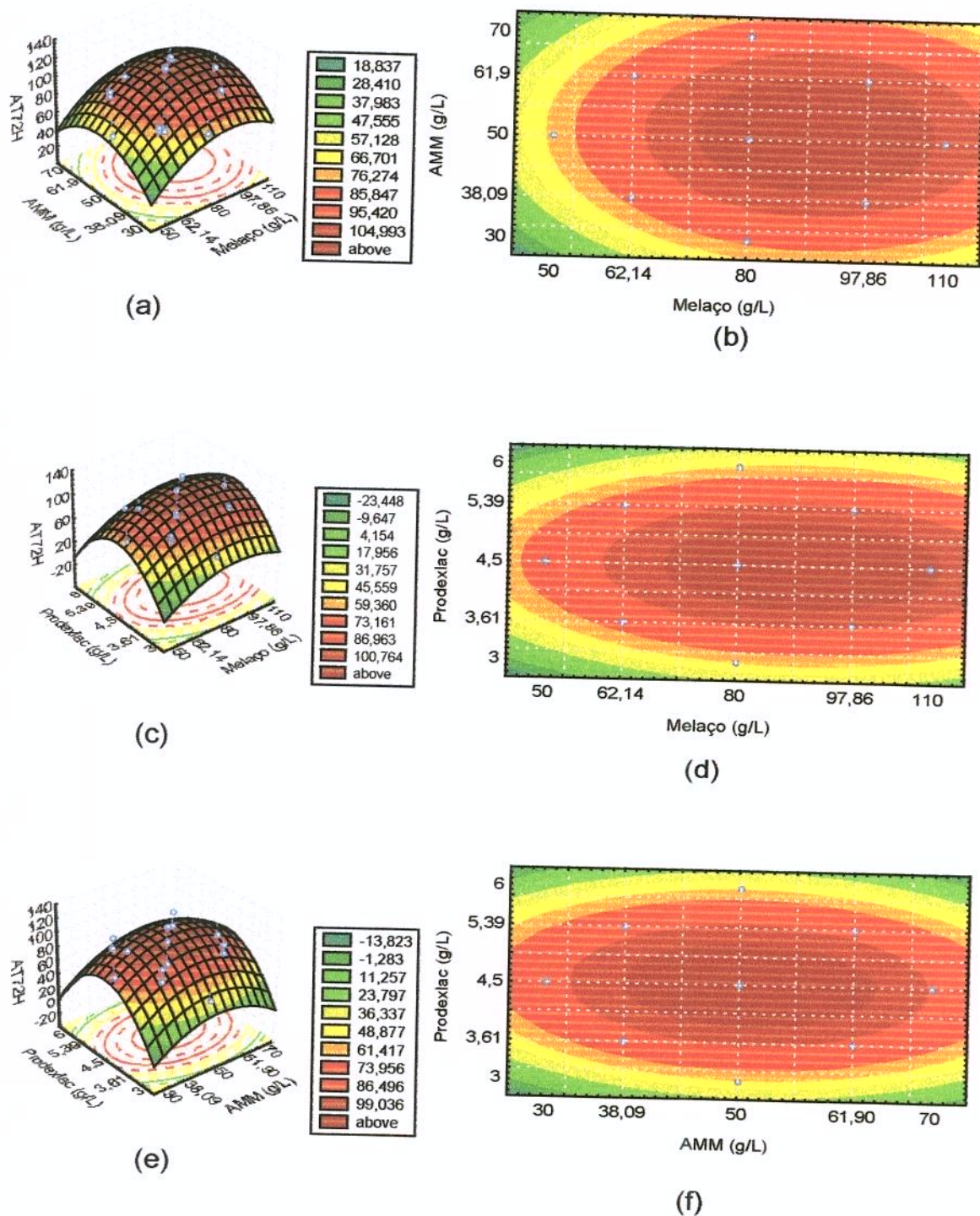


Figura 4.14: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: (a) e (b) da AMM e do melaço; (c) e (d) extrato de levedura e melaço e (e) e (f) extrato de levedura e AMM

4.2. Análise econômica

Após terem sido otimizados dois meios de cultivo distintos, era de grande importância fazer uma comparação nos custos destes meios, já que o objetivo principal deste trabalho era obter um meio mais viável comercialmente, do que o meio convencional (sintético).

A tabela 4.39 apresenta os meios de cultura otimizados por Kalil (2000) (Meio 1) e os dois meios otimizados neste trabalho (Meio 2 e Meio 3) utilizando fontes de carbono e nitrogênio economicamente mais viáveis. Verifica-se que o custo do Meio 2 é 13% do custo do Meio 1 e do Meio 3 é de 1,93%, sem haver tido perda nas atividades enzimáticas.

Este resultado é muito interessante em termos de produção industrial, tornando o processo economicamente viável.

Observando-se a tabela 4.39, nota-se que embora houve uma queda de 18% na atividade da enzima, a redução do custo entre os meios 2 e 3 foi considerável, ou seja, 5,2 vezes. Salienta-se que esta diferença na atividade enzimática pode ser resultante de pequenas variações durante o preparo do inóculo e meios de fermentação e execução das análises.

Para verificar-se se este fato é significativo industrialmente seria necessário verificar se as enzimas produzidas comportam-se da mesma forma, nestes dois diferentes meios, principalmente em relação aos frutoligossacarídeos produzidos, o que será objeto de estudo na continuidade deste trabalho.

Tabela 4.39: Análise econômica comparando meio sintético com meios complexos otimizados neste trabalho

	Meio de cultura g/L	Custo R\$/L	Custo total R\$/L	Atividade U/mL	(R\$/U)
Meio 1	Sacarose – 14g/L	0,53			
	Ext. de lev. – 10g/L	3,55	14,50	127	0,11
	Peptona – 20g/L			(Kalil, 2000)	
	K ₂ HPO ₄ – 1g/L	10,27			
		0,15			
Meio 2	Melaço – 90g/L	0,18			
	AMM – 45g/L	0,027	1,78	138	0,013
	Ext. de lev. – 4g/L			(neste trabalho)	
	K ₂ HPO ₄ – 1g/L	1,42			
		0,15			
Meio 3	Melaço – 80g/L	0,16			
	AMM – 50g/L	0,03	0,28	113	0,0025
	Prodex. – 4,5 g/L	0,09		(neste trabalho)	

5. Conclusões

Neste trabalho propôs-se a otimização de produção da enzima inulinase, obtendo-se um produto com alta atividade enzimática, utilizando meios industriais de modo a minimizar custos de produção, ocasionados principalmente pela elevada concentração de peptona e extrato de levedura presentes no meio sintético.

A metodologia do planejamento fatorial mostrou-se muito útil para a otimização da produção da enzima inulinase, não só na obtenção de melhores valores na atividade enzimática, mas também em termos econômicos, aumentando o rendimento e a produtividade da fermentação.

Após a realização de quatro planejamentos fatoriais (2^3 , mais 8 pontos axiais e 3 pontos centrais), sendo as variáveis independentes o melaço, a AMM e o extrato de levedura, mantendo-se constantes a concentração de K_2HPO_4 em 1g/L e pH em 3,5, foi possível otimizar um meio de produção para a enzima inulinase com a seguinte composição: melaço 90g/L, AMM 45g/L, extrato de levedura 4g/L, K_2HPO_4 1g/L e pH 3,5. Com este meio foi obtida uma atividade enzimática de 138g/L, ultrapassando assim o valor atingido com o meio sintético (127g/L).

Com o intuito de reduzir ainda mais o custo do meio de cultura, o K_2HPO_4 pode ser retirado do meio e o extrato de levedura substituído pelo *Prodexlac*. Através da realização de testes intermediários e dois planejamentos experimentais, sendo o primeiro 2^3 , mais 3 pontos centrais e o segundo 2^3 , mais 8 pontos axiais e 3 pontos

centrais, foi possível otimizar este meio de custo ainda inferior. O meio otimizado tem a seguinte composição: melaço 80g/l, AMM 50g/L, *Prodexlac* 4,5g/L e pH 3,5.

Verificou-se que o primeiro e segundo meios otimizados representam 13% e 1,93% do custo do meio sintético otimizado, respectivamente.

Assim, neste trabalho foi possível a otimização na produção da enzima, utilizando meios industriais, sem reduzir os níveis de produção obtidos com meio sintético, tornando ainda, o meio economicamente mais viável.

6. Sugestões

Sugere-se para trabalhos futuros, estudar a influência da agitação e aeração do processo em sistema batelada e verificar a produção da enzima em sistema batelada alimentada ou em processo contínuo.

Verificar se ao usar-se meios industriais, as enzimas produzem os mesmos frutoligossacarídeos, independente da composição do meio.

Estudar a viabilidade de purificação da enzima inulinase diretamente do caldo bruto, composto pelo meio complexo, para verificar possibilidade de aplicação industrial.

7. Referências Bibliográficas

- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.72, n.6, p.491-494, 1991.
- BU'LOCK, J. & KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia Básica**. Zaragoza (España): Editora Acribia, S.A. 1987. 557p.
- COSTA, F.A.A. **Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras**. Campinas, 1986. 106p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v.32 p.353-361, 1996.
- CRUZ-GUERRERO, A.; GARCIA-PEÑA, I.; BARZANA, E.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMEZ-RUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A Wild Inulinase Hyperproducing Strain. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n. 2, p. 159-163, 1995.

- ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.26, p.13-20, 1987.
- ELYACHIOUI, M.; HORNEZ, J.P.; TAILLIEZ, R. General properties of Extracellular Bacterial Inulinase. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, n. 6, p. 514-519, 1992.
- GROOTWASSINK, J.W.D. & FLEMING, S.E. Non-specific β -fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. **Enzyme Microbiology Technology**, v.2, p.45-53, 1980.
- GUPTA, A.N.; DAVINDER, P.S.; KAUR, N. e SINGH, R. Production, Purification and Immobilization of Inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.59, p.377-385, 1994.
- 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.

- KALIL, S.J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; Optimization of Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. **Biotechnology Letters**, in press, 1999.
- KIM, C.H. & RHEE, S.K. Fructose Production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. **Biotechnology Letters**, v.11. n.3. p. 201-206, 1989.
- KUSHI, R.T.; HOJO, O.; TREVISAN, H.C.; MONTI, R.; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, São Carlos. **Anais XI SINAFERM**, 1996, p. 309.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Extracellular Inulinase from Four Yeasts. **Lebensm-Wiss-Technology**, v. 21, p. 271-274, 1988.
- MANZONI, M. & CAVAZZONI, V. Hidrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.54, p. 311-315, 1992.
- MEDEIROS, J.; KALIL, S.J.; COSTA, F.; NAKASHIMA, E.B.; CABRAL, A.S.; ZAVICKIS, F.P.; SILVA, J.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Estudo da Influência da Concentração de Substrato, pH e Temperatura na Determinação da Atividade Enzimática da Inulinase, Florianópolis. **Anais ENPROMER**, 1999, p.350-351.

- POORNA, V. & KULKARNI, P.R. A study of Inulinase Production in *Aspergillus niger* using Fractional Factorial Design. **Bioresource Technology**, v. 54, p.315-320, 1995.
- REGULY, C.J. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas-RS: Editora Universitária - UFPel, S.A., 1996. 222p..
- ROUWENHORST, R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J. Stucture and Properties of the Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n. 11 p. 3337-3345, 1990.
- ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; VAN DER BAAN, A.A.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J. Production, distribuction and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.5, p. 1131-1137, 1988.
- 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, 1996. 102p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SIGMA. **Biochemicals and Reagents**. St. Louis, 1999.

VANDAMME, E.J. & DERYCKE, D.G. Fermentation Process, Properties and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p. 139-176, 1983.