

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Desenvolvimento de Processo Contínuo de Obtenção de Frutose a Partir de Sacarose

Autora: Clarissa Müller Lorenço

Engenheira Química, Unicamp, 2000.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestre em Engenharia de
Alimentos.

Campinas – SP

Janeiro/2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador
(FEA/DEA/UNICAMP)

Prof. Dr. César Costapinto Santana
Membro
(FEQ/DPQ/UNICAMP)

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
Membro
(FEQ/DPQ/UNICAMP)

Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta
Membro
(CPQBA/UNICAMP)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Obrigada pela torcida e pelo apoio incondicional.

Ao Cláudio

Sem você tudo seria mais difícil. Você é muito importante para mim!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Maugeri Filho pela orientação e encaminhamento nas atividades de pesquisa. É bom ter um modelo para se espelhar.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Bernardo, Daniel, Fernanda, Helen, Luciano, Márcio, Saartje, Thiany e Yemiko. Obrigada pela amizade e auxílio ao longo do desenvolvimento de meus trabalhos no laboratório.

Às queridas amigas Fifa e Lia, sempre atenciosas e prestativas. Nunca me esquecerei das preciosas dicas e conselhos recebidos em todas as etapas de nossa convivência.

À minha família, José, Erna, Rodrigo e Adriana, pelo exemplo que sempre foram em minha vida. Vocês sempre farão parte das minhas conquistas.

À minha família botucatuense, Fausto, Míriam, Fábio e Juliana, Renato e Raquel, pelo apoio e carinho constantes. Sem as dicas e a torcida e de vocês talvez não tivesse chegado aqui.

Ao Cláudio, por estar sempre ao meu lado. Você é meu porto seguro. Você é assim, um sonho pra mim...

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Frutose	5
2.2 Hidrólise da Sacarose	8
2.3 Enzimas	9
2.3.1 Inulinase	10
2.3.2 Imobilização de enzimas	11
2.3.3 Produção da inulinase	13
2.3.4 Caracterização da inulinase – pH e temperatura de estabilidade	14
2.3.5 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática	15
2.4 Separação da frutose	17
2.5 Zeólitas	20
2.6 Adsorção	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Microrganismo	26
3.2 Produção da Inulinase	26
3.2.1 Preparo do inóculo	26
3.2.2 Fermentação	27
3.2.3 Recuperação da enzima	27
3.3 Imobilização da Inulinase	28
3.4 Medida da atividade enzimática	29
3.4.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART)	30
3.5 Caracterização da inulinase imobilizada	30
3.5.1 Estabilidade com a temperatura	30
3.5.2 Temperatura ótima	31
3.5.3 pH ótimo	31
3.5.4 Estabilidade com o tempo	31
3.6 Síntese de frutose e glicose em leito de inulinase imobilizada	32
3.7 Preparo das zeólitas	32

3.7.1 Troca iônica	33
3.8 Separação da frutose e glicose	34
3.9 Quantificação de carboidratos por cromatografia de íons	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Produção da enzima	38
4.1.1 Fermentação	38
4.1.2 Recuperação da enzima	39
4.2 Estabilidade com o tempo da enzima recuperada	40
4.3 Caracterização da inulinase imobilizada em carvão ativado	41
4.3.1 Comportamento da atividade enzimática em função do pH (pH ótimo)	43
4.3.2 Comportamento da atividade enzimática em função da temperatura (temperatura ótima)	44
4.3.3 Estabilidade da inulinase imobilizada com o tempo em diferentes temperaturas	48
4.3.4 Determinação da temperatura ideal de processo	56
4.4 Obtenção da frutose e glicose a partir da sacarose	58
4.4.1 Coluna 1	58
4.4.2 Coluna 2	63
4.5 Separação de frutose e glicose	68
4.5.1 Ensaio preliminar de separação cromatográfica	69
4.5.2 Separação frutose-glicose com duas colunas em série	71
4.5.3 Separação de frutose e glicose com três colunas em série	72
4.5.4 Estudo da influência da concentração de açúcares	75
4.5.5 Modificação no eluente da coluna de separação de açúcares	77
4.5.6 Estudo da separação com três colunas em série e eluente etanol 15%	79
4.6 Dimensionamento de um sistema duplo de hidrólise e separação acoplados	80
5. CONCLUSÕES	84
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
7. BIBLIOGRAFIA	88

RESUMO

O mercado de consumo da frutose tem aumentado significativamente nos últimos anos, visto que este açúcar está sendo cada vez mais utilizado em substituição à sacarose devido aos benefícios fisiológicos apontados em recentes pesquisas. Dentre muitos métodos para obtenção de frutose de alto grau de pureza a partir da sacarose, a utilização de enzimas imobilizadas em biorreatores apresenta vantagens como a utilização de condições operacionais amenas e baixa formação de subprodutos. A mistura de glicose e frutose resultante pode ser separada por técnicas cromatográficas de baixo custo, como a utilização de zeólitas como adsorvente. O objetivo deste estudo foi desenvolver um processo para obtenção de frutose partindo-se da sacarose. Foi estudada a hidrólise em leite contendo a enzima inulinase imobilizada e a seguir, a separação da glicose e frutose feita em colunas de adsorção contendo zeólitas Y.

Inicialmente realizou-se a caracterização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em alginato de cálcio com adição carvão ativado e foi observado que a meia-vida da enzima é aumentada, sendo que a 50°C é de 11,1 dias, o que representa boas perspectivas de utilização industrial. Obteve-se ainda a temperatura ideal de processo para o biorreator, que é de 43°C. Com o pH fixado em 4,8, a conversão da sacarose foi estudada em um leite com 105 mL de inulinase imobilizada e tempo de residência de 6,2 horas. Nestas condições, obteve-se uma conversão de 98% e a meia-vida do leite obtido experimentalmente foi de 74 dias.

O estudo da separação da frutose e glicose em leite contendo zeólitas Y na forma bária mostrou que a condição em que se obteve a melhor eficiência de separação, de 1,62, foi utilizando-se 3 colunas em série com volume total de 117,9 cm³ e etanol 15% como eluente. Nestas condições, recuperou-se 63,5% da frutose injetada praticamente pura na saída da última coluna.

Para o processo global, de hidrólise da sacarose e separação de frutose e glicose, foram dimensionadas 3 colunas para a separação, visto que o processo de hidrólise é a etapa limitante. As colunas devem ter 75 cm de altura, diâmetro de 5,66 cm e vazão de eluição de 3,27 mL/min. O eluente é o etanol 15%.

ABSTRACT

The consumption of fructose has increased in the last few years, as this sugar is being more and more used as a substitute to sucrose, due to the fisiological benefits pointed out by recent research. Between many methods to obtain high-purity fructose starting from sucrose, the utilization of immobilized enzymes in biorrectors presents advantages, as the utilization of mild operational condition and low sub-product formation. The resulting mixture of glucose-fructose can be separated by low-cost chromatographic techniches, as the utilization of zeolyt as adsorbent. The objective of this study was to develop a process to the attainment of fructose starting from sucrose. The hidrolsys of sucrose was studied in a fixed bed containing the inulinase enzyme immobilized and also, after that, the separation of glucose and fructose in an adsorption column containing Y zeolite.

At first, it was carried out the characterization of the inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* immobilized in calcium alginate with the addition of actived carbon and it was observed that the half-life of the enzyme is increased, and at 50°C it is 11,1 days, which shows good perspectives of industrial utilization. The ideal process temperature for the biorreactor is 43°C. With the pH fixed in 4,8, the sucrose conversion was studied in a fixed bed containing 105 mL of immobilized inulinase and a residence time of 6,2 hours. In these conditions, it was obtained 98% of conversion, and the half-life of the reactor experimentally obtained was 74 days.

The study of separation of glucose and fructose in a bed containing Y zeolite in baric form showed that the best condition for this separation was 3 series columns with a total volume of 117,9 cm³ and ethanol 15% as desorbent, resulting in 1,62 of separation efficiency. In these conditions, it was recovered 63,5% of the total fructose injected.

For the global process, comprising the sucrose hidrolsys and fructose and glucose separation, it was designed 3 columns for the separation, as the hidrolsys is the limiting stage. The columns must have 75 cm height, 5,66 cm of diameter and a flow rate of 3,27 mL/min. The desorbent used was ethanol 15%.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de açúcares na forma líquida tem aumentado significativamente nos últimos anos, principalmente na indústria de refrigerantes. O açúcar líquido apresenta algumas vantagens neste segmento industrial, como facilidade de manuseio e economia no processo. O produto pode estar na forma de xarope de sacarose, xarope de açúcar invertido (mistura de açúcares simples) ou ainda como xarope enriquecido com frutose.

A frutose é o açúcar mais doce presente na natureza e é conhecida como o açúcar ideal do ponto de vista nutricional. Alguns pesquisadores apontam benefícios fisiológicos que podem ser obtidos incluindo a frutose na dieta, visto que ela aumenta a absorção do ferro no organismo, ao formar um complexo ferro-frutose, que é melhor absorvido que o ferro inorgânico (Gupta, 1994). Além disso, pode substituir a sacarose, já que esta é responsável por agravar problemas de obesidade, arteriosclerose e diabetes (Vandamme & Deryke, 1983).

O estudo da produção de xarope de frutose enriquecido a partir de sacarose tem atraído a atenção de pesquisadores, em função de sua utilização em vários segmentos industriais, como alimentício (doces, bebidas e produtos dietéticos), farmacêutico e até químico (agente redutor). Xaropes de frutose são cada vez mais utilizados como adoçantes em substituição a sacarose, como pode ser verificado em mercados como Japão e Estados Unidos, onde é obtido a partir do milho (High Fructose Corn Syrup – HFCS). A frutose tem valor econômico aproximadamente três vezes maior que a sacarose e o consumo mundial de xaropes de alta concentração de frutose aumentou de 10,2 milhões de toneladas em 1995 para 13,6 milhões de toneladas em 2000.

O processo para obtenção de xarope de frutose a partir da sacarose é feito em duas etapas.

A primeira é a obtenção da frutose, sendo que uma alternativa interessante é a hidrólise da sacarose. A sacarose é obtida comumente da cana de açúcar. Na produção do açúcar obtém-se como subproduto o melaço, que ainda pode apresentar utilização industrial. O método mais antigo e tradicional utilizado para a hidrólise da sacarose é a hidrólise ácida com ácido sulfúrico ou clorídrico. Este método é simples, porém apresenta o inconveniente de provocar a caramelização e formação de produtos secundários como o hidroximetil furfural, proveniente da decomposição da glicose. O produto final necessita portanto de tratamento para retirada de cor contaminantes. A hidrólise enzimática se apresenta como alternativa à química, entretanto tem sido pouco explorada devido à enzima invertase (hidrolisa a sacarose) ser cara, aumentando significativamente o custo do processo.

A aplicação biotecnológica de enzimas é vantajosa frente a processos físico-químicos visto que não necessita de condições drásticas de temperatura e pressão. Pode-se verificar através de estudos realizados que o comércio de enzimas industriais tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido ao avanço na tecnologia de purificação enzimática e surgimento de novos campos de aplicação. As enzimas podem ser utilizadas em indústrias de papel, detergentes e alvejantes e têxtil, entretanto o maior mercado ainda é o de alimentos e alimentação animal.

O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos vem estudando a utilização da inulinase, enzima que também catalisa a reação de hidrólise da sacarose, apresentando o atrativo de ser significativamente mais barata. As enzimas são usualmente imobilizadas para utilização em leitos catalíticos, visto que este procedimento é mais econômico pois permite a utilização em processos contínuos sem o arraste do biocatalisador. Além disso, a produtividade volumétrica é aumentada e facilita a etapa de separação dos produtos (Bailey & Ollis, 1986).

A segunda etapa, que consiste na separação da glicose e frutose, pode ser feita de várias maneiras: membranas de troca iônica (Venkatasubramanian *et al.*, 1981); cromatografia em coluna empacotada com resina (Matijasevic *et al.*, 1997); leite móvel simulado (Beste *et al.*, 2000); adsorção em zeólitas X e Y (Tu *et al.*, 1982).

Estudos têm demonstrado que zeólitas e aluminosilicatos cristalinos com elementos do grupo I A e II A, adsorvem seletivamente em misturas de glicose e frutose (Cheng & Lee, 1992; Buttersack *et al.*, 1993), com desempenho similar às resinas de troca iônica comumente utilizadas, com a vantagem de apresentarem menor custo. Devido às propriedades adsorptivas e ao conhecimento da estrutura e composição, as zeólitas podem ser utilizadas na recuperação de açúcares (Silva, 1998).

Assim, torna-se interessante o desenvolvimento de um processo que combine a produção de frutose por via enzimática, com a utilização da inulinase e a recuperação de frutose com alto grau de pureza, tendo-se a partir de uma matéria-prima de menor custo, a sacarose, um produto com alto valor comercial, a frutose, com boas perspectivas econômicas.

Dentro deste contexto, os objetivos principais deste trabalho foram:

1. Caracterizar a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* imobilizada em carvão ativado quanto à estabilidade com a temperatura, determinação da temperatura e pH ótimos, determinação da energia de ativação e desativação e meia-vida da enzima nesta forma.
2. Estudo da hidrólise da sacarose em leite fixo com enzima inulinase imobilizada, determinando as condições para obtenção de conversão máxima.

3. Estudo do processo de separação de glicose e frutose em leito fixo contendo zeólitas Y para determinação das concentrações e vazões para se obter a melhor separação possível.

4. Estudo para operação de um sistema duplo estágio, compreendendo um estágio de hidrólise de leito fixo com inulinase imobilizada e um estágio de separação com coluna contendo zeólitas Y.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Frutose

A frutose faz parte do grupo dos carboidratos conhecidos como açúcares simples ou monossacarídeos. É o açúcar mais doce encontrado na natureza, e pode ser encontrado em frutas, mel e até em vegetais. A frutose é 1,8 vezes mais doce que a sacarose e seu alto poder edulcorante torna possível uma redução calórica na dieta.

A frutose pode ser encontrada na forma polimerizada, em um carboidrato conhecido como inulina. Este carboidrato pode ser encontrado em vegetais como chicória, dália e dente de leão (Pandey *et al.*, 1999). Na alcachofra de Jerusalém, a inulina constitui aproximadamente 80% em peso em base seca e a hidrólise da inulina de alcachofra de Jerusalém produz xaropes com mais de 75% de D-frutose (Vandame e Derick, 1983). A hidrólise da sacarose também gera xaropes invertidos de alta qualidade e muitos artigos têm sido publicados a respeito de invertases imobilizadas para este fim em suportes como alginato de cálcio (Arruda e Vitolo, 1999) e matrizes poliméricas (Selampinar *et al.*, 1997).

Os derivados fosfatados de frutose, como por exemplo, frutose-1-fosfato e frutose 1-6 difosfato, são importantes no metabolismo de carboidratos. O uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e sacarose, resulta em efeito glicêmico reduzido, podendo ser usada como adoçante em dietas de pacientes com hipoglicemia. A frutose também é apontada por Thresher *et al.* (2000) como nutriente mediador da resistência à insulina induzida por sacarose e intolerância à glicose.

A frutose possui formas tautoméricas, como a β -D-frutopiranoose, que está presente no estado cristalino. Quando dissolvida em água, ocorre uma rápida modificação, que resulta na formação dos tautômeros β -D-frutofuranose, α -D-

frutofuranose e α -D-frutopirranose. As fórmulas estruturais dos compostos estão apresentada na figura 1.

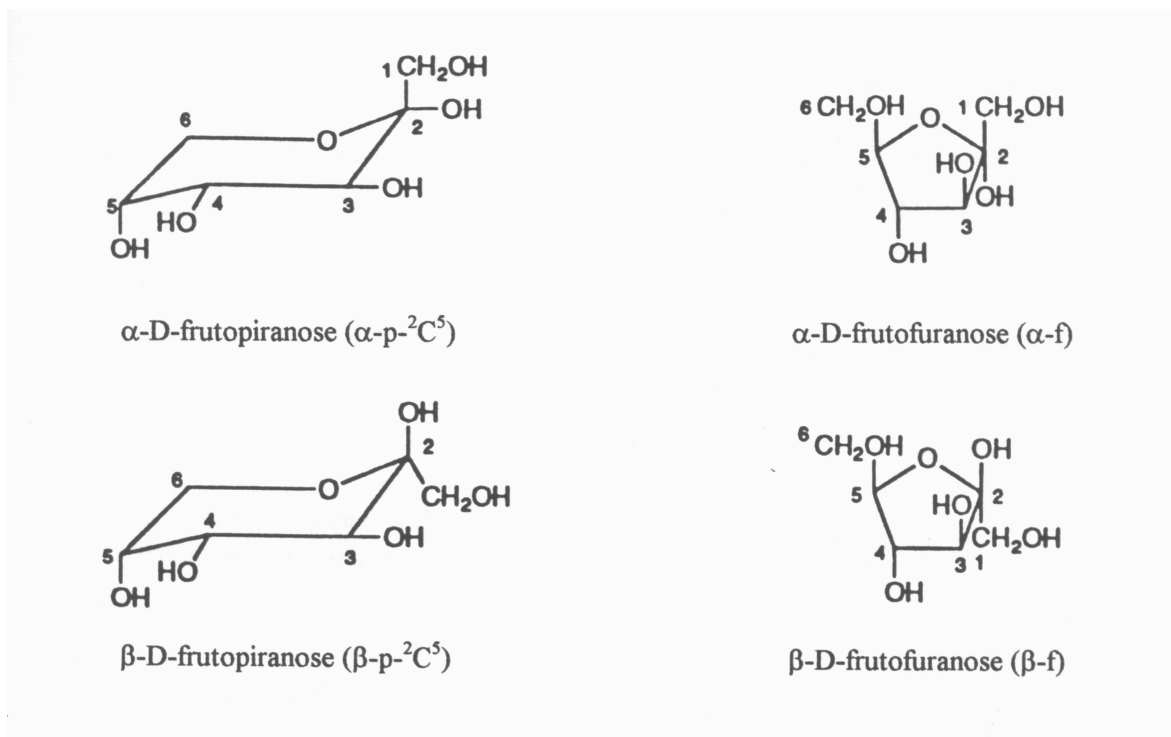


Figura 1: Formas estruturais da frutose.

Segundo Osberger (1991), o pH, a temperatura e a concentração em solução são fatores que influenciam o sabor doce de soluções de frutose em água. Dentre estes, o que tem efeito mais pronunciado sobre a transformação da forma mais doce (β -D-frutopirranose) a um estado de equilíbrio em que as formas menos doces estão presentes, é a temperatura. Assim, esse efeito pode ser minimizado mantendo condições de temperatura e acidez baixas.

A frutose é utilizada comercialmente em misturas para bolos, gelatinas e pudins dietéticos, balas, sobremesas geladas, suplementos alimentares, bebidas energéticas e para aumento da funcionalidade do amido, além de ser utilizada também na indústria farmacêutica. Os principais produtos comerciais à base de frutose estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos produtos à base de frutose. (Osberger, 1991)

Propriedades	Estado Físico	Descrição Química	% Frutose	% Água	Poder Edulcorante
Frutose cristalina	Cristalino	Cetohexose	99,5	0,2	130 - 180
HFCS 42%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	29,8	29	90 – 95
HFCS 55%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	42,4	23	95 – 100
HFCS 90%	Líquido	Dextrose, frutose e outros	69,3	23	100 – 106
Frutose líquida	Líquido	Frutose e água	77,0	23	110 - 120

A obtenção de frutose é feita através de processos que envolvem hidrólise de sacarose ou amido de milho com posterior inversão com glicose isomerase e separação da frutose da glicose, que também é produzida na reação, ou através da hidrólise da inulina, em que a frutose é produto principal.

Wenling *et al.* (1999) estudaram a produção contínua de xaropes enriquecidos em frutose com inulinase imobilizada a partir da inulina e verificaram que com uma conversão de 75% produziu-se uma mistura contendo 85% de D-frutose e 15% de D-glicose.

A inulina, apesar de apresentar uma maior produtividade de frutose do que a sacarose, é um substrato mais caro, e portanto um estudo envolvendo a produção de frutose a partir da sacarose, que é o açúcar comum de mesa, se mostra como alternativa interessante.

2.2 Hidrólise da Sacarose

A reação de hidrólise de um açúcar em um meio líquido, geralmente aquoso, na presença de um catalisador ácido, também é conhecida como reação de inversão, já que possibilita a obtenção de açúcar invertido, que é uma mistura de açúcares simples, particularmente hexoses (figura 2). Na reação de hidrólise da sacarose, obtém-se um açúcar invertido, que é uma mistura de frutose e glicose. A reação deve ser operada a baixas temperaturas (30 a 35°C), para evitar a formação de intermediários ou derivados, como o hidroximetilfurfural (HMF), polímeros, ácido fórmico, etc. Portanto, deve-se ter certeza que a reação pare no estágio de hidrólise, evitando a degradação dos açúcares e formação de derivados indesejáveis.

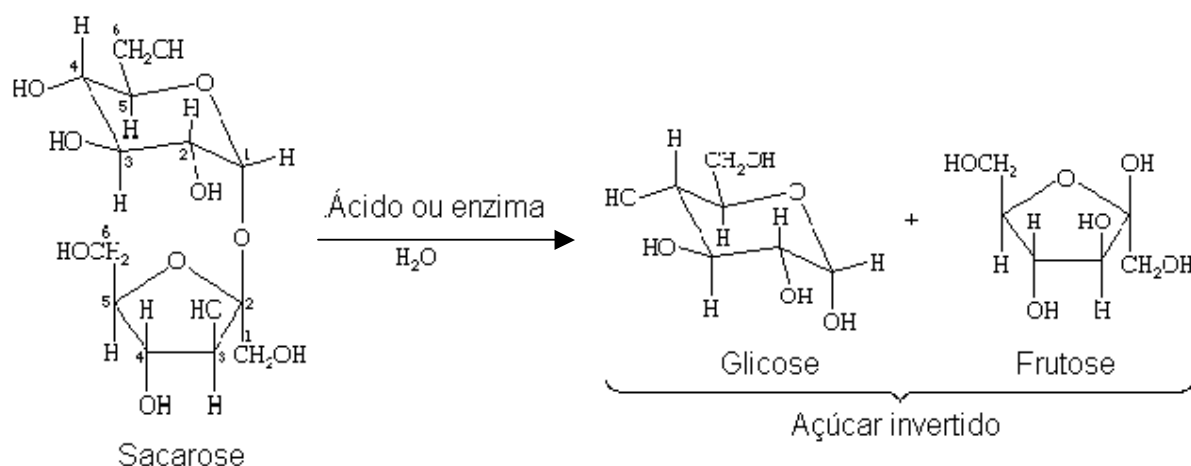


Figura 2: Hidrólise da sacarose.

A hidrólise química pode ser feita em meio ácido, ou na presença de zeólitas protonadas, como estudado por Moreau *et al.* (2000). A hidrólise em meio contendo vários tipos de zeólitas dealuminadas na forma hidrogenada apresenta alta seletividade e o catalisador age também como adsorvente de produtos indesejáveis, como o 5- hidroximetilfurfural (HMF). A quantidade deste produto pode ser reduzida a menos de 100 ppm, oferecendo uma maneira alternativa de produzir açúcar invertido descolorido. Como citado por Buttersack *et al.* (1994), a

hidrólise quando realizada com zeólitas Y dealuminadas é acelerada e a taxa de reação é a mesma de soluções diluídas. Os poros da zeólita são capazes de armazenar uma molécula de sacarose.

Outra maneira de hidrolisar a sacarose é através da rota enzimática. As enzimas mais comumente utilizadas são a invertase e a inulinase. A enzima pode estar na forma livre ou dentro do microorganismo. Segundo Krastanov (1997), a imobilização de células que apresentam atividade de invertase em lã, sob condições controladas de pH e temperatura apresentam alta produtividade e o biocatalisador se mostrou eficaz para o uso em processos contínuos.

Segundo Farine *et al.* (2001), a hidrólise da sacarose utilizando-se a invertase produz além de glicose e frutose outros cinco produtos intermediários, que podem ser separados por cromatografia de troca iônica. Além disso, a invertase, sob certas condições pode apresentar comportamento cíclico, degradando a sacarose.

Entretanto, segundo Monsan (1995), quando a hidrólise é realizada em condições de alta concentração de sacarose, ocorrem dois fenômenos inesperados: inibição pelo substrato, à medida que a concentração é aumentada e aumento da estabilidade da invertase.

2.3 Enzimas

Ao contrário de catalisadores químicos, as enzimas apresentam elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização diminui a formação de subprodutos indesejáveis. Por outro lado, as enzimas, por serem catalisadores biológicos de natureza protéica, são sensíveis à temperatura e pH e sofrem desnaturação.

As reações químicas apresentam aumento na taxa de reação com o aumento na temperatura. Entretanto, em reações enzimáticas a taxa aumenta até uma certa temperatura (temperatura ótima), depois diminui devido à desnaturação enzimática. Quanto ao pH, verifica-se o mesmo comportamento já que a atividade enzimática aumenta com o aumento do pH até atingir um máximo (pH ótimo) e depois diminui. No pH ótimo a máxima quantidade possível de enzimas está na forma ativa (Bailey, 1986).

2.3.1 Inulinase

As inulinases são 2,1-β-D frutohidrolases que convertem inulina à frutose, sendo que esta enzima é utilizada na produção de xaropes de alta concentração de frutose. Estes xaropes têm grande importância pelo poder edulcorante utilizado em alimentos e bebidas com baixo teor calórico ou dietéticos (Poorna & Kulkarni, 1995).

Inulinases são obtidas de tubérculos e raízes de plantas ou através de microrganismos, e hidrolisa a sacarose, inulina e levanas, enquanto a invertase hidrolisa principalmente a sacarose (Kushi, 1996). A atividade de inulinase é encontrada em uma grande variedade de fungos (Xiao *et al.*, 1989; Nakamura *et al.* 1997), leveduras (Hensing *et al.*, 1994; Gupta *et al.* 1994) e bactérias (Kim *et al.*, 1989), além das raízes e tubérculos de plantas, como alcachofra de Jerusalém e chicória.

Além da atividade hidrolítica frente à sacarose, a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* também apresenta capacidade de sintetizar frutooligossacarídeos, como estudado por Santos (2002). Os frutooligossacarídeos são polímeros de frutose e constituem uma classe de açúcares conhecidos como funcionais, pelos benefícios fisiológicos da sua inclusão na dieta.

As inulinases podem ser classificadas como endo ou exo-inulinases, dependendo de seu modo de ação. Exo-inulinases quebram as ligações β -(2-1) da inulina e separam a molécula de frutose a partir do terminal não redutor da cadeia. Já as endo-inulinases, além de liberar frutose, também liberam oligofrutosídeos.

As inulinases microbianas atuam sobre o substrato sacarose de modo similar à invertase, entretanto, este comportamento não é observado com as invertases, pois as mesmas apresentam fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose, como a inulina.

Segundo Grootwassink e Fleming (1980), ao contrário da invertase de leveduras, a inulinase é uma β -frutofuranosidase não-específica apresentando alta atividade sobre β -(2-1) e β -(2-6) frutanos, como também sobre a sacarose. Os autores também comentam que esta propriedade torna as inulinases como uma alternativa às invertases para uso industrial.

2.3.2 Imobilização de enzimas

Enzimas são catalisadores eficazes, entretanto apresentam algumas desvantagens em sua utilização industrial, visto que são relativamente instáveis e dificilmente recuperadas ao final do processo. Uma maneira de torná-las mais ativas e estáveis é a imobilização.

A imobilização consiste na confinção da enzima com retenção da atividade catalítica, com maior estabilidade, para que possam ser utilizadas em processos contínuos, por um maior período de tempo e facilmente separadas dos produtos.

Algumas desvantagens apontadas na utilização de enzimas imobilizadas são: custo adicional do suporte e reagentes, restrições difusionais, impedimentos estéricos e perdas de atividade durante a imobilização. Na escolha do uso da

enzima livre ou imobilizada devem ser ponderadas as vantagens e desvantagens juntamente com a análise econômica do processo.

Os métodos utilizados para a imobilização de enzimas são:

- Modificação das enzimas a uma forma insolúvel em água
- Reação de enzimas em reatores equipados com uma membrana de ultrafiltração não permeável que retém os grupamentos enzimáticos
- Ligação das enzimas a uma macromolécula, o que restringe sua mobilidade (Kennedy *et al.*, 1987).
- Oclusão em géis, fibras e membranas.

Em qualquer método de imobilização, deve-se utilizar técnicas brandas e bem controladas, respeitando a estrutura da enzima (conformação terciária e em particular o sítio ativo), as ligações criadas entre suporte e enzimas, excluindo os aminoácidos implicados diretamente na reação catalítica.

O método mais utilizado é o de ligação a um suporte. Os suportes são classificados em orgânicos e inorgânicos (Messing, 1978) e devem possuir grande área superficial, o que permite uma alta carga de enzimas, estabilidade e regenerabilidade.

Os suportes inorgânicos são mais utilizados por apresentarem as características necessárias para se imobilizar uma enzima: são estáveis à degradações física, química e térmica, possuem resistência mecânica e estabilidade estrutural, o que evita a compactação em processos contínuos e possibilitam a regeneração do suporte para reutilização (Kennedy, 1987).

Algumas alterações nas propriedades físicas e químicas da enzima podem ocorrer, resultando em mudanças na atividade, estabilidade e cinética da enzima imobilizada. A atividade enzimática decresce e a especificidade do substrato pode

se alterar. A temperatura e pH ótimos podem ou não se alterar na enzima imobilizada.

Outra técnica de imobilização que pode ser aplicada é a ligação covalente através de *cross-link*, processo que envolve a reação do grupo amino da proteína com grupos eletrofílicos presentes nos reagentes de *cross-link*. Devido à força da ligação covalente, este método resulta em uma ligação muito estável para a enzima, sem perigo de quebra. No trabalho realizado por Saito *et al.* (1997), em que se estudou a influência de grupos aldeído na estabilidade de enzima imobilizada em um suporte inorgânico, os resultados sugerem que enzimas podem ser imobilizadas em suporte por ligação de *cross-link* com glutaraldeído. Entretanto, as moléculas de glutaraldeído livres na superfície do suporte podem causar problemas, visto que estes podem levar a uma modificação na conformação enzimática e a atividade é perdida.

A imobilização de enzimas utilizando-se um agente de cross-link foi estudada por Quinn *et al.* (2001). Neste estudo, a imobilização de β -galactosidase em superfície de grafite com glutaraldeído como agente de cross-link apresentou capacidade de retenção da atividade entre 17 e 25% em relação à atividade da enzima livre e o grau de hidrólise da lactose foi de 70% a 37°C. A enzima mostrou também estabilidade operacional e de estocagem.

A hidrólise da sacarose utilizando-se inulinase de *Aspergillus ficuum* imobilizada em esferas porosas de vidro com glutaraldeído foi estudada por Ettalibi & Baratti (2001). A imobilização apresentou retenção de 77% da atividade da enzima livre e meia-vida em reator de 350 dias a 50°C.

2.3.3 Produção da inulinase

A inulinase pode ser obtida da cultura de vários microrganismos e apresenta características diversas. Alguns microrganismos que podem ser citados como

exemplos de produtores de inulinase são: *Kluyveromyces marxianus* var. *fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* (Santos, 1998). Entre os microorganismos produtores, as leveduras, principalmente do gênero *Kluyveromyces*, foram as que apresentaram uma melhor produtividade.

Silva-Santisteban (2001) estudou a produção de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus* em fermentadores de bancada, variando a agitação, aeração e tipo de agitador, e verificou que taxas de agitação superiores a 450 rpm e aeração de 1 vvm implicava em decréscimo na atividade de inulinase.

Treichel (2001) otimizou a produção de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus* 16045 em frascos agitados utilizando meios alternativos e a maior atividade foi obtida a partir de um meio contendo água de maceração de milho, melaço e Prodexlac.

Makino *et al.* (2001) estudaram diferentes linhagens de *K. marxianus* e obtiveram altos valores de atividade enzimática, se comparadas à linhagens já estudadas na literatura. A atividade máxima de 900 UI/mL após 72 horas de fermentação foi obtida com *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571.

2.3.4 Caracterização da inulinase – pH e temperatura de estabilidade

Estudos realizados com inulinases intra e extra celulares, obtidas de *Saccharomyces fragilis*, indicam que estas são razoavelmente estáveis a 50°C, mas sofrem desnaturação a 70°C. Entretanto a inulinase intra e extracelular de *Kluyveromyces marxianus* CBS6556, incubada por 8 horas a 50°C, não apresentaram nenhuma perda de atividade. Mas quando a reação enzimática ocorre a temperaturas mais elevadas observou-se uma considerável perda de atividade da enzima. A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 apresentou atividade ótima sobre o substrato inulina a 50°C. A enzima de

Kluyveromyces fragilis bruta, purificada ou imobilizada favoreceu a hidrólise máxima da inulina a 55°C (Schneider, 1996).

A inulinase de *Kluyveromyces marxianus*, intra e extracelular, apresentou atividade ótima na faixa de pH entre 4,8 – 5,2. A inulinase purificada ou imobilizada de *Kluyveromyces fragilis* mostrou atividade ótima em pH 5,5, enquanto a enzima intra e extracelular de *Saccharomyces fragilis* na faixa de pH de 5,0 a 5,5 (Schneider, 1996). A enzima obtida de *Kluyveromyces bulgaricus* extracelular apresentou uma atividade ótima no pH 5,5 e temperatura de 55°C, na forma livre (Costa, 1986; Contieiro, 1992).

Valores baixos de pH, em torno de 4,0, e temperaturas altas, ao redor de 50°C, são características desejáveis para enzimas de uso industrial, visto que estas variáveis diminuem os riscos de contaminação microbiana e reduzem a formação de cor no preparo de xaropes (Vandamme & Derycke, 1983).

Como pode ser observado da literatura, inulinases de diferentes microrganismos apresentam tais características, tornando-se interessantes para utilização industrial.

2.3.5 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

Em reações enzimáticas, um aumento na temperatura de reação aumenta a velocidade de reação, até um ponto máximo (temperatura ótima), em que a desnaturação enzimática faz a velocidade diminuir.

A velocidade pode ser relacionada com a temperatura, na parte de ativação térmica (baixas temperaturas) segundo a lei de Arrhenius.

$$k = A.e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (1)$$

em que k: velocidade

A: constante

E_a: energia de ativação

T: temperatura

R: constante dos gases

Por outro lado, em temperaturas mais altas a taxa de desnaturação não pode ser desprezível. A cinética de desnaturação normalmente é descrita como sendo de 1ª ordem e pode ser representada por

$$-\frac{dv}{dt} = k_d \cdot v \quad (2)$$

$$-\frac{1}{v} \frac{dv}{dt} = k_d \quad (3)$$

Onde v: velocidade de reação enzimática

k_d: constante de desnaturação

t: tempo

Integrando-se a equação 3, a partir do tempo 0, obtém-se

$$\ln\left(\frac{v}{v_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (4)$$

Em que v₀ : velocidade enzimática inicial

A partir da equação 4, pode-se obter a meia-vida da enzima (t_{1/2}) em uma determinada temperatura, que corresponde ao tempo decorrido para que a enzima perca 50% da atividade inicial, ou seja, v/v₀ = 0,5.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (5)$$

Deve-se considerar no entanto que a constante k_d é dependente da temperatura, segundo a lei de Arrhenius. Pode-se escrever para o k_d

$$k_d = k_{d0} \cdot e^{\frac{-E_d}{RT}} \quad (6)$$

em que k_{d0} : constante de desnaturação

E_d : energia de ativação de desnaturação da enzima.

Eventualmente pode ocorrer um aumento na atividade com o tempo, que pode ser explicado por um estado intermediário de desnaturação enzimática, no qual ela é mais ativa que a enzima original. Este mecanismo é conhecido como modelo em série ou não linear.

2.4 Separação da frutose

Na literatura, muitos métodos são encontrados para realizar a separação de frutose de uma mistura de açúcares ou mesmo da glicose, o outro produto da hidrólise da sacarose.

Hashimoto *et al.* (1983) desenvolveram um processo para produção de xaropes de alto teor de frutose (superior a 50%, combinando a adsorção da frutose e reação com a enzima glicose-isomerase. A alimentação consistia de uma mistura equimolar de glicose e frutose e o sistema utilizado era formado por estágios de colunas de adsorção e reação alternadas e somente colunas de adsorção.

Di Luccio *et al.* (2000) investigaram a aplicabilidade de membrana de polipropileno impregnada com ácido fenilborônico na extração de frutose de uma

mistura de açúcares e concluíram que a membrana é seletiva à frutose, quando a concentração de açúcares é baixa.

Segundo Ghim & Chang (1982), a frutose tem maior afinidade com resinas catiônicas, e a glicose, com resinas aniônicas.

Os fatores que influenciam a separação de glicose e frutose foram estudados por Cheng & Lee (1992), utilizando uma coluna de leito fixo contendo zeólita Y. O critério utilizado para a quantificação da qualidade da separação foi a eficiência da separação (ES), que considera a distância média dos picos dos componentes envolvidos e a distribuição de cada pico. Observou-se que o tamanho de partícula mais adequado foi de 20 a 40 mesh ou menor, utilizando-se como eluente água deionizada. Também foi constatado que quanto menor a vazão (0,5 a 1 cm³/min) melhor a separação, pois o tempo de residência da frutose é maior, facilitando a penetração da frutose na estrutura porosa do adsorvente. A temperatura de operação da coluna deve ser de 40°C, pois a temperaturas mais elevadas (60°C) se observa o escurecimento do produto devido à mudanças na estrutura da glicose e frutose e destruição térmica da frutose.

A adsorção de sacarídeos em zeólitas Y dealuminada (Si/Al > 100) foi estudada por Buttersack *et al.* (1993), cujo princípio envolve o aumento da hidrofobicidade causado pela redução dos sítios iônicos e o caráter hidrofóbico das moléculas de açúcares. Observou-se que o coeficiente de distribuição para frutose aumentou, comparando-se com a zeólita CaY. Entretanto, não foi observada a seletividade da frutose, sendo que outros açúcares foram também adsorvidos.

Silva *et al.* (1998) estudaram a adsorção da frutose formada na síntese enzimática da dextrana em zeólitas Y. O efeito da troca iônica por íons Ca²⁺ e Ba²⁺, a razão Si/Al variando entre 1,77 e 2,59 e o tempo de troca iônica entre 5 minutos a 24 horas foram os fatores estudados. Verificou-se que as isotermas de

equilíbrio obedeceram ao modelo de Langmuir e as zeólitas Y com maior razão Si/Al e com troca por íons Ca^{2+} durante 24 horas apresentaram maior capacidade adsortiva.

Durand *et al.* (1999) desenvolveram um equipamento para produção industrial que hidrolisa o açúcar em um meio catalítico que contém um adsorvente sólido que adsorve os produtos indesejáveis, obtendo-se uma mistura de açúcares simples. Utiliza-se como catalisador e adsorvente as zeólitas pois isto reduz o custo total, visto que é empregado apenas um tipo de composto sólido com duas funções. A solução de sacarose inicial pode ser altamente concentrada, o tempo de reação é reduzido e é evitado o uso de solventes tóxicos e poluentes, além de aumentar o rendimento da reação. A temperatura em que a reação é estabelecida está na faixa de 80 a 85°C, sendo que a conversão total pode ser obtida em 2 horas.

A resina Duolite (forma cálcica) é citada por Ching *et al.* (1987) como adsorvente seletivo para frutose, apresentando em baixas concentrações isoterma de equilíbrio linear. Alternativamente, os autores citam a zeólita CaY, utilizada no processo UOP Sorbex.

Outra maneira utilizada na separação de açúcares é a cromatografia, e um processo que têm estado em evidência é o leito móvel simulado (simulated moving bed – SMB). Este processo foi primeiramente idealizado pela UOP (Sorbex) e consiste de um processo contracorrente, sem apresentar os problemas de um leito móvel real, em que sólidos estão em contracorrente apresentando problemas de ordem operacional. Muitos artigos têm sido publicados utilizando-se o SMB para separação de glicose de frutose (Klatt *et al* 2002; Beste *et al*, 2000; Azevedo & Rodrigues, 2001, Kishihara *et al*, 1992; Odawara & Noguchi, 1977).

Ho *et al.* (1987) estudaram a separação da glicose e frutose para obtenção de xaropes de alto teor de frutose através da adsorção contra-corrente simulada,

usando como adsorvente resina de troca catiônica na forma cálcica ou com zeólita CaY (Processo UOP) e ambos adsorventes se mostraram seletivos para a frutose. Foram estudados ainda outros tipos de resina, e o adsorvente CaX não apresentou seletividade para a frutose, mas todos os outros (Zerolit, Dowex, Amberlite, Duolite, CaY) mostraram adsorção preferencial da frutose.

Kishihara *et al.* (1992) estudaram a separação contínua de sacarose, glicose e frutose em um leito móvel simulado, utilizando-se como adsorvente a resina Diaion UBK 530 100 mesh e eluente água deionizada. Os produtos obtidos foram sacarose com 76% de pureza, glicose com 67% de pureza e frutose com 71% de pureza.

Matijasevic *et al.* (2000) usaram o sistema de adsorção simulado em contra corrente para separação de frutose e glicose. O sistema era constituído de quatro colunas conectadas em série e empacotadas com a resina Lewatit MDS 1368. Foram desenvolvidos modelos matemáticos para o perfil de concentração e a análise teórica destes modelos mostrou que existe uma razão ótima dos parâmetros do processo em que a efetividade de separação pode ser aumentada.

2.5 Zeólitas

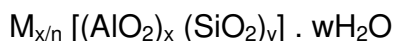
Zeólitas são sólidos tridimensionais cristalinos, contendo alumínio, silício e oxigênio arranjados em uma estrutura altamente regular, segundo Flaningen (1991). Estes aluminossilicatos contém elementos dos grupos IA e IIA, especialmente sódio, potássio, magnésio, cálcio, estrôncio e bário e são muito utilizados como adsorventes inorgânicos, devido ao seu caráter microporoso e alta estabilidade térmica (Moscou, 1991). Segundo Lee (1973), zeólitas ainda apresentam alta seletividade e capacidade de adsorção, resistência ao atrito, estabilidade química e facilidade de ser regenerada .

Fazendo-se uma revisão a respeito de zeólitas, pode-se perceber a versatilidade deste sólido poroso. As características intrínsecas a este material que permitem sua utilização em diferentes áreas são principalmente: propriedade de troca iônica, caráter microporoso com poros uniformes, seletividade de adsorção pelo tamanho molecular e habilidade de desenvolver acidez interna, ideal para a catálise orgânica.

Como o entendimento químico deste material têm aumentado, as aplicações das zeólitas também expandiram nos últimos anos. Variações na razão silício-alumínio, tamanho das unidades básicas, tamanho de poros, área superficial, cátions e metais incorporados produzem um grande número de propriedades adsorptivas e catalíticas que são úteis em diferentes áreas. São aplicadas em processos de secagem, separação (de açúcares por exemplo) e purificação e apresentam alta capacidade de adsorção. São utilizadas ainda para remover compostos orgânicos do ar, como por exemplo, reduzir emissões de SO₂ (Gupta, 2003) e na purificação de efluentes industriais, como remoção de amônia pela clinoptilolita, um tipo de zeólita natural (Jorgensen, 2003), remoção de zinco aquoso (Badillo-Almaraz, 2003) e metais pesados (Babel, 2003). Podem ser utilizadas também como catalisadores no processo de refino de petróleo e produção de petroquímicos, além de suporte para metais e reagentes ativos.

As zeólitas são constituídas por uma rede tridimensional e tetraedros de AlO₄ e SiO₄, unidos pelo compartilhamento de todos os átomos de oxigênio (Breck, 1974). Segundo Bhatia (1946), os tetraedros de silício e alumínio, denominados unidades primárias de construção, combinam-se entre si formando unidades secundárias, que podem formar cubos, prismas hexagonais ou octaedros. A estrutura final consiste de um arranjo de unidades secundárias. São conhecidas mais de 50 estruturas, que são classificadas de acordo com o tamanho do poro, sendo que os diâmetros variam de 3 a 8 Å, sendo que as zeólitas X e Y são as que apresentam maior poro (6 a 8 Å).

A fórmula estrutural da célula unitária da zeólita pode ser representada por:



em que M é o cátion de compensação de valência n, w é o número de moléculas de água e a soma x + y, o número total de tetraedros na célula unitária da zeólita, sendo que y/x varia entre 1 a 5.

A razão entre silício e alumínio também é uma forma de classificação das zeólitas. As zeólitas X e Y apresentam respectivamente baixa e média razão Si/Al, que varia de 1 a 1,5 na X e 1,5 e 3 na Y. Zeólitas com alta razão Si/Al (10 a 100) são ditas dealuminadas e caracterizam-se pela elevada hidrofobicidade.

As zeólitas podem ser naturais ou sintéticas e ambas apresentam estrutura tridimensional de aluminosilicatos. Durante 200 anos acreditou-se que as zeólitas naturais ocorriam como elementos secundários em cavidades não preenchidas das rochas, no entanto a partir da década de 50, descobriu-se a ampla ocorrência deste minerais em depósitos sedimentários, como constatou Flanigen (1991).

As zeólitas A, X e Y são sintéticas e foram descobertas por R. M. Milton e D. W. Breck (Flanigen, 1991). Segundo Bhatia (1974), possuem forma de um octaedro cúbico, que é denominado unidade de soldalita.

De acordo com Kärger *et al.* (1991), as zeólitas X e Y apresentam a mesma estrutura da rede da zeólita natural faujasita, A célula unitária destas zeólitas consiste de 192 tetraedros, formando o maior volume de poro entre as zeólitas (50% do volume do cristal hidratado) e a diferença entre elas está na proporção Si/Al e na ordenação do silício e do alumínio nos tetraedros. Esta célula unitária é caracterizada por 8 tetraedros truncados (sodalita) conectados por meio de 16 prismas hexagonais. A rede é formada por um arranjo tetraédrico de unidades sodalita interconectadas através de pontes de oxigênio de 6 membros, ou como

um arranjo de anéis duplos de 6 membros. A estrutura das zeólitas X e Y está representada na figura 3.

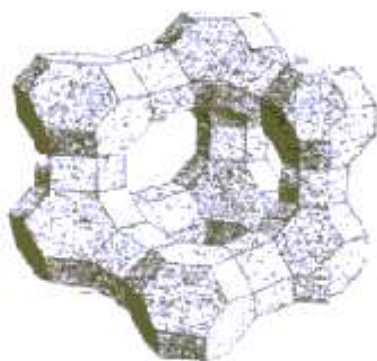


Figura 3: Estrutura da zeólita Y.

Segundo Breck (1974), a maioria das zeólitas sintéticas é homocatiônica ou dicatiônica, ou seja, possui uma ou duas espécies de cátions e devido a maior uniformidade na composição e pureza, elas são mais adequadas para fins de pesquisa e aplicações industriais do que zeólitas naturais.

2.6 Adsorção

A adsorção é um fenômeno de transferência de massa, que ocorre quando um soluto (adsorbato) se liga a um adsorvente sólido através de forças intermoleculares, que podem ser fracas (adsorção física) ou fortes ligações químicas (adsorção química).

Segundo Brocklebank (1990), nos processos de adsorção, a taxa que o soluto liga-se à superfície sólida deve exceder a taxa na qual o soluto deixa a superfície. Pode-se assumir que essas taxas são dependentes às concentrações do soluto na solução e na superfície do sólido. A análise da adsorção é baseada no equilíbrio, o qual é apresentado sob a forma de isotermas de adsorção. Apesar da existência de inúmeras equações de isotermas, como a lei de Henry e

isotermas virial, linear, de Langmuir, Brunauer-Emmett-Teller, Van der Waals e Freundlich, não existe uma equação universal de adsorção aplicável à fase adsorvida nas zeólitas em todas as condições experimentais.

As isotermas de adsorção física de gases são divididas em 5 classes, segundo Brunauer *et al.* (1940), citados por Ruthven (1984), como pode ser visto na figura 4.

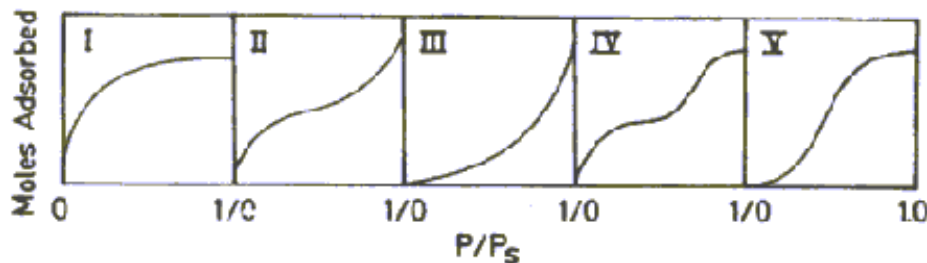


Figura 4: Classificação das isotermas, segundo Brunauer (Ruthven, 1984).

As isotermas de adsorventes microporosos como as zeólitas são geralmente do tipo I, pois existe um limite definido de saturação, que corresponde ao preenchimento dos microporos, como citado por Ruthven (1984). Como a isoterma de Langmuir é utilizada para descrever comportamentos do tipo I, é também muito utilizada a interpretação da adsorção de zeólitas. A equação que descreve a isoterma de Langmuir é a seguinte:

$$Q = \frac{Q_m \cdot C}{K_d + C} \quad (7)$$

em que Q é a concentração de adsorbato no adsorvente no equilíbrio

Q_m é a concentração máxima de adsorção

C é a concentração de adsorbato na fase líquida no equilíbrio

K_d é a constante de equilíbrio

Burkert (2003) estudou a adsorção de frutose em diferentes tipos de zeólitas trocadas com íons Ca^{2+} e a zeólita Baylith WE 894 foi a que apresentou melhor capacidade adsorptiva. A caracterização da zeólita na forma sódica (partida) através da isoterma de adsorção de nitrogênio mostrou a composição da mesma. A composição está apresentada na tabela abaixo e a razão Si/Al indica se tratar de zeólita do tipo Y.

Tabela 2: Composição da zeólita Y.

Componente	Teor (%)
Na_2O	10,57
Al_2O_3	16,96
SiO_2	58,93
Si/Al	3,07

Foi estudado também por Burkert (2003) a adsorção de frutose em zeólitas trocadas com íons Ba^{2+} e esta troca apresentou as melhores separações entre glicose e frutose e por isso será o íon utilizado para troca neste trabalho. A melhor temperatura para a separação de glicose e frutose foi de 40°C , para concentração dos componentes com concentração de 20 g/L e vazão de 0,1 mL/min.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

A enzima inulinase foi obtida de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. O microrganismo é cultivado e periodicamente repicado para meio contendo extrato de levedura e malte (3,0 g/L), peptona (5,0 g/L), glicose (10 g/L) e agar.

Este tipo de produção é aceita pelo FDA (Food and Drug Administration - USA) já que o microrganismo pertence ao grupo GRAS (Generally Regarded as Safe) e é recomendado para utilização em alimentos e produtos farmacêuticos.

3.2 Produção da Inulinase

3.2.1 Preparo do inóculo

O microrganismo foi repicado para ágar inclinado de extrato de malte e levedura, e mantido em agar por 24 horas em estufa a 30°C.

Após este período de crescimento, o microrganismo foi passado para um tubo de ensaio, contendo 10 ml de pré-inóculo, composto de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose.

Foi mantido por mais 24 horas na estufa a 30° C. Preparou-se então o inóculo, que é um meio formado por 20 g/L de sacarose, 5,0 g/L de extrato de levedura, 1,5 g/L de NH₄Cl, 5,0 g/L de K₂HPO₄, 0,65 g/L de MgSO₄.7H₂O e 1,15 g/L de KCl. O pH do pré-inóculo foi ajustado para 6,8 e a esterilização feita a 121°C durante 15 minutos.

Após as 24 horas, 10 ml do pré-inóculo foram adicionados a um erlenmeyer aletado contendo 100 ml de inóculo, mantendo-se sempre esta proporção. O inóculo foi mantido incubado por 24 horas, em shaker Psycrotherm com agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Após estas 24 horas, o inóculo estava pronto para ser adicionado ao meio de fermentação e a fermentação propriamente dita iniciada. Para uma fermentação em reator agitado de 3 L de meio definido, são necessários 300 ml de inóculo.

3.2.2 Fermentação

A fermentação foi realizada em biorreator Bioflow III com 3L de meio sintético, contendo 30 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 5 g/L de fosfato de potássio (K_2HPO_2) e o pH foi ajustado para 3,4.

A fermentação foi mantida por 72 horas a uma temperatura de 27°C e as condições de aeração e agitação utilizadas foram 1 vvm e 450 rpm respectivamente, condições estas otimizadas por Santisteban-Silva (2001).

3.2.3 Recuperação da enzima

O caldo fermentado foi centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall a 10000 rpm por 10 minutos a 5°C. Na centrifugação, as células são separadas do caldo contendo as enzimas (sobrenadante), já que as mesmas são extracelulares.

Ao sobrenadante do caldo centrifugado adicionou-se lentamente, sob agitação, etanol a -15°C até atingir uma concentração de 70% em volume de álcool. O processo deve ser realizado em reator encamisado acoplado a um banho de refrigeração, de modo a se manter a temperatura em 4°C. A agitação deve ser branda, de modo a evitar a desnaturação das enzimas.

Após a adição total do agente de precipitação, a solução foi centrifugada novamente em centrífuga Sorvall refrigerada a 10000 rpm durante 10 minutos.

O precipitado contendo a enzima purificada foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 e parte da enzima foi mantida em geladeira e parte congelada para posterior utilização.

3.3 Imobilização da Inulinase

O método utilizado para imobilização enzimática foi em gel alginato 3% com adição de 3% de carvão ativado. Foram utilizados para isto 16,5 g de água, 0,75 g de alginato de cálcio, 12,5 g de sacarose, 5 mL de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g carvão ativado.

Misturou-se o carvão, a enzima e o glutaraldeído e a solução foi deixada em agitação branda por 30 minutos, para que ocorresse a reação inicial de cross-link. Enquanto isto o alginato foi dissolvido na água com aquecimento e agitação vigorosa. Após a total dissolução, adicionou-se a sacarose. Quando o gel alcançou mais ou menos 40°C, adicionou-se a mistura de carvão, enzima e glutaraldeído.

Depois de preparada a mistura, a amostra foi então gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,2M em tampão acetato de sódio com 3,5% de glutaraldeído a 10°C com utilização de uma bomba peristáltica. O efeito da concentração da solução de gotejamento na estabilidade da inulinase foi estudado por Santos (2002) e determinou-se que a concentração 0,2 M de cloreto de cálcio seria a ideal.

Após o gotejamento e formação das cápsulas, as enzimas imobilizadas foram mantidas em geladeira até o dia seguinte na solução de gotejamento para tratamento.

Após esse tempo, as enzimas foram lavadas com água destilada e a última lavagem foi feita com tampão acetato. As cápsulas foram armazenadas em geladeira em solução de tampão acetato de sódio com 0,05 M de cloreto de cálcio para posterior utilização.

3.4 Medida da atividade enzimática

A determinação da atividade da inulinase foi relacionada com a medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. A capacidade da enzima liberar 1 $\mu\text{mol/mL}$ de frutose por minuto é definida com uma unidade de atividade enzimática por mL de solução enzimática (1 UI/mL).

O método consiste na utilização de um mini-reator encamisado sob agitação e controle de temperatura a 50° C, utilizando-se para isso um banho termostatzado Tecnal TE-184. Ao reator são adicionados 9 ml de solução de sacarose 2% em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8, 1 ml de água e 1 ml de enzima imobilizada (medida pelo deslocamento de 1 ml de água).

A reação é iniciada, jogando-se as cápsulas de inulinase imobilizada na solução de sacarose a 50°C. Retira-se 0,5 ml de amostra nos tempos 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, adicionando imediatamente a 0,5 ml do reagente DNS, que deve ser previamente preparado conforme descrito no item abaixo, e colocados no banho em ebulição durante 5 minutos.

Para determinação da atividade de enzimas livres, deve-se proceder a reação nas mesmas condições, mas utilizando-se 4,5 ml de solução de sacarose e 0,5 ml de solução enzimática convenientemente diluída. As amostras devem ser retiradas nos tempos 2, 4, 6, 8 e 10 minutos.

3.4.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

O método utilizado na determinação dos açúcares redutores totais (glicose e frutose) foi o método colorimétrico de Miller (1959) modificado. Deve-se preparar o reagente 3,5 DNS dissolvendo-se 3,74 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 6,99 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água com um pouco de aquecimento. Esperou-se esfriar e foi adicionado 5,36 g de fenol fundido a quente a 50°C e 2,93 g de metabiosulfito de sódio, diluindo-se a solução para 500 mL.

A amostra de 0,5 mL retirada do reator deve ser colocada em um tudo de ensaio contendo 0,5 mL do DNS. A solução foi aquecida a 100°C por 5 minutos para que a reação de coloração ocorra. A seguir o tubo foi colocado em banho de gelo e adicionou-se 8 mL de solução de tartarato de sódio e potássio 15,1 g/L para estabilização da cor. A seguir, foi feita a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (Micronal, modelo B342II). O branco foi feito com uma solução contendo 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de DNS.

Com isso, foi obtida uma curva de absorbância *versus* tempo. Para determinar a atividade enzimática, deve-se obter uma correlação entre a absorbância e concentração de açúcares redutores (frutose ou glicose), através da construção de uma curva padrão do açúcar estudado, utilizando-se soluções padrão do açúcar entre 0,2 a 2 g/L.

A partir da curva obtida experimentalmente e da curva padrão, pode-se determinar a atividade enzimática.

3.5 Caracterização da inulinase imobilizada

3.5.1 Estabilidade com a temperatura

Mediu-se 1 ml de esferas com enzimas imobilizadas, colocadas em tubos de ensaio com 3 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4.8 e incubadas em diferentes temperaturas. Mediu-se a atividade inicial da enzima a ser incubada.

As temperaturas testadas nos experimentos foram de 50, 55, 57,5 e 60 °C. As atividades enzimáticas foram determinadas em intervalos de tempo pré-determinados, até que a atividade estivesse em aproximadamente 50% da atividade inicial. Com estes dados foi possível calcular a constante de desnaturação da enzima na forma imobilizada, bem como o tempo de meia vida.

3.5.2 Temperatura ótima

Para determinação da temperatura ótima da enzima imobilizada, foi necessário medir a atividade enzimática em diferentes temperaturas, na faixa de 20 a 75 °C com sacarose 2% em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8. Com isso obteve-se uma curva de atividade *versus* temperatura. A temperatura ótima é aquela que apresenta atividade enzimática máxima, utilizando para isso o método colorimétrico do DNS, descrito anteriormente e banho termostatizado ajustado para a temperatura desejada.

3.5.3 pH ótimo

A medida da atividade da enzima imobilizada, pelo método do DNS, foi realizada variando-se o pH da solução de sacarose utilizada. O tampão usado na medição é de acetato de sódio 0,1M e o pH do mesmo variando na faixa de 3,6 a 5,6. A temperatura foi mantida em 50°C e o pH ótimo é o que apresenta a atividade enzimática máxima.

3.5.4 Estabilidade com o tempo

A enzima livre purificada foi parte congelada e outra parte mantida refrigerada em geladeira e a atividade foi medida ao longo do tempo pelo método do DNS. Assim é possível determinar se a enzima é estável em tais condições.

3.6 Síntese de frutose e glicose em leito de inulinase imobilizada

Após a obtenção e imobilização da inulinase, as cápsulas foram empacotadas em uma coluna encamisada para o controle da temperatura. A temperatura de operação ideal para a inulinase imobilizada, bem como o pH, foram determinados a partir do estudo de estabilidade, e serão discutidos adiante.

O tamanho do leito depende da atividade enzimática obtida no suporte estudado e foi otimizado para obtenção da conversão máxima da sacarose. A vazão ideal também foi otimizada desta forma. A montagem experimental utilizada está apresentada na figura 5.



Figura 5: Foto da montagem experimental do leito de inulinase imobilizada.

O leito catalítico foi utilizado até que a atividade enzimática decaísse o suficiente para comprometer a hidrólise de sacarose e formação dos produtos desejados.

3.7 Preparo das zeólitas

A zeólita utilizada nas colunas para separação da frutose da glicose foi a fornecida pela Bayer, Baylith WE 894. O diâmetro das partículas ideal para esta separação foi determinado por Machado (2002), e compreende a faixa de 0,053 a

0,125 mm. A zeólita comercial foi moída em moinho Tecnal a 21500 rpm por 20 segundos e peneirada para se obter partículas nessa faixa de diâmetros.

Observou-se ainda que para a separação adequada de frutose e glicose, devem ser utilizadas outras formas catiônicas de zeólitas, visto que a mesma é fornecida na forma sódica. Segundo Schöllner *et al.* (1993), diferentes cátions da zeólita Y com razão Si/Al = 2,55 apresentaram a seguinte seqüência de aumento na interação com a frutose: $\text{Na}^+ < \text{La}^{3+} < \text{K}^+ < \text{Ba}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$.

3.7.1 Troca iônica

A troca iônica foi realizada utilizando-se a mesma metodologia citada por Silva (1998). Segundo estudos realizados por Burkert (2002), utilizando-se a mesma granulometria citada anteriormente, a adsorção da frutose é melhor quando a zeólita está na forma bária. Desta forma, o íon selecionado para a troca iônica na matriz da zeólita é o bário.

Primeiramente, determinou-se a umidade na zeólita comercial, utilizando-se uma mufla. A seguir foi calculada a quantidade de íons a ser trocada pelo número de equivalentes grama de Na_2O presente na zeólita (10,57% na zeólita original), bem como as quantidades de zeólita, água e solução salina para resultar em uma concentração final de 15% de sólidos, que é zeólita seca efetivamente presente no reator de troca iônica.

A quantidade de zeólita calculada foi misturada com a água e o pH da suspensão resultante, que é básico, deve ser acertado entre 5 e 6 com ácido clorídrico 10%. A seguir, misturou-se cloreto de bário dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 30%, conforme quantidade estequiométrica necessária à troca.

A suspensão final foi colocada em um reator, com uma agitação constante e branda e foi mantida por 24 horas. A temperatura ideal para a troca é de 75°C, ajustada através de um banho termostatizado acoplado ao reator de troca.

Ao final das 24 horas, a suspensão foi filtrada em um funil de Buchner e foram realizadas 2 lavagens. Na primeira, a torta foi lavada com solução 30% de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e água deionizada, nas mesmas quantidades utilizadas na troca. A segunda lavagem é feita somente com água deionizada, com o dobro do volume utilizado na troca. A temperatura das soluções de lavagem deve ser a mesma da troca, ou seja, 75°C.

Após a lavagem foi feita a secagem da zeólita trocada em estufa a 120°C por 24 horas. A zeólita deve ser peneirada novamente depois de seca para separação das partículas de menor diâmetro.

3.8 Separação da frutose e glicose

A coluna cromatográfica é preenchida com a zeólita trocada e o empacotamento é feito com água deionizada obtida em um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus e livre de gases dissolvidos, já que a água foi deixada por 30 minutos em banho de ultrassom.

A coluna cromatográfica utilizada tem as dimensões de 50 cm de altura por 1 cm de diâmetro. Esta coluna é encamisada para o controle da temperatura, e deve ser mantida a 40°C, condição esta otimizada por Burkert (2003). O número de colunas utilizadas no processo será determinado experimentalmente de modo a se obter a melhor separação possível. A montagem experimental realizada está mostrada na figura 6.

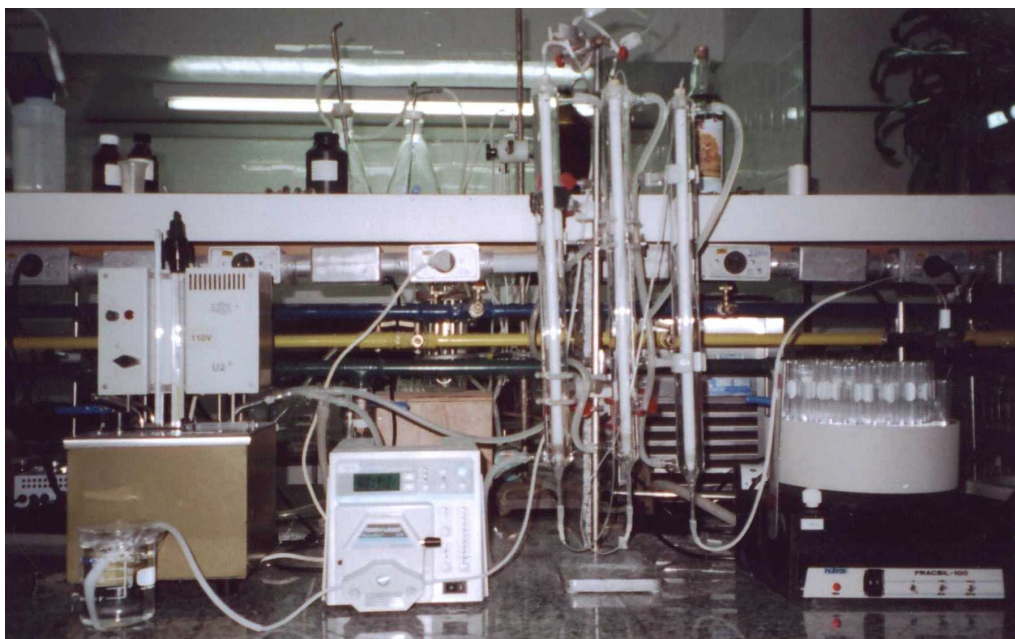


Figura 6: Foto da montagem experimental de separação de açúcares com três colunas contendo zeólita Y em série.

O eluente utilizado na coluna foi água ultrapura do sistema Milli-Q e a técnica de eluição da coluna cromatográfica foi a do pulso, em que uma determinada quantidade de amostra (geralmente uma porcentagem do volume total da coluna) é alimentada na coluna e então o eluente, que não tem afinidade com o adsorvente (zeólita) é passado na coluna até que toda a amostra tenha saído. A separação é atingida na forma de bandas.

A montagem experimental para a separação cromatográfica da frutose e glicose está mostrada na figura 7.

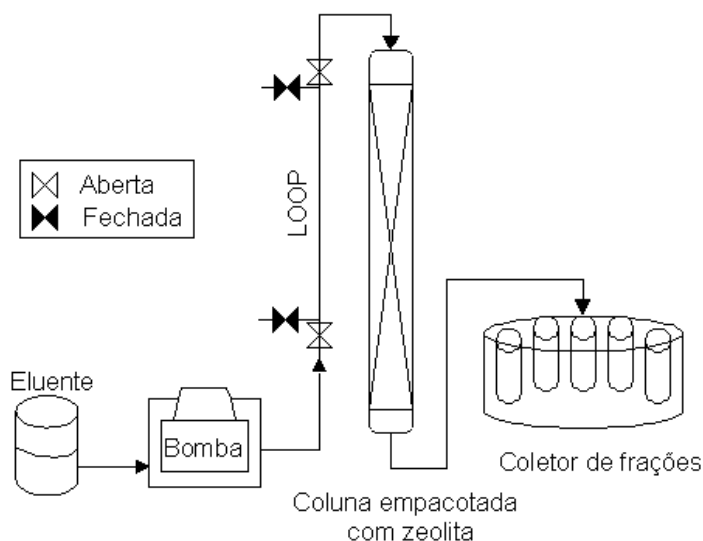


Figura 7: Montagem experimental para separação de frutose e glicose em leito de zeólita Y.

O *loop* possui o volume exato do pulso que se pretende introduzir na coluna, e a amostra que se quer separar (mistura equimolar de glicose e frutose) é colocada no *loop* com o auxílio de uma seringa, desligando-se a bomba, e fechando-se o sentido normal do fluxo e abrindo-se as entradas laterais do *loop*. Depois de completado o volume do *loop* com a amostra, volta-se ao fluxo normal, ligando-se a bomba em seguida. Desta forma o pulso é introduzido na coluna de separação.

A determinação da concentração de glicose e frutose na saída da coluna foi feita por cromatografia líquida de íons e será descrita abaixo.

3.9 Quantificação de carboidratos por cromatografia de íons

A determinação da concentração de frutose e glicose na saída da coluna de adsorção e de glicose, frutose e sacarose na saída da coluna de hidrólise foi feita através de cromatografia de íons em conjunto com detecção amperométrica, HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography – Pulsed

Amperometric Detection). O instrumento utilizado foi o Dionex DX-500 composto de detector eletroquímico ED40 com eletrodo de ouro e sistema de bombas GP 50. A coluna utilizada para a quantificação dos carboidratos é a CarboPac PA 100 (250x4 mm) com pré-coluna de mesmo nome (50x4 mm).

As condições de injeção das amostras serão:

Temperatura: ambiente

Volume de injeção: 25 µL

Vazão do eluente: 1 mL/min

Tempo de corrida: 22 min

A fase móvel utilizada na coluna era constituída de dois solventes, NaOH 50 mM e acetato de sódio 500 mM em NaOH 50 mM com água ultrapura obtida no sistema de purificação Milli-Q Plus. Foi feito um método para eluição dos carboidratos com um gradiente utilizando uma combinação dos dois solventes.

A fase móvel foi degaseificada durante meia hora em banho de ultra-som Eurosonics modelo SX-20 e a seguir por 5 minutos com nitrogênio.

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções padrão de frutose, glicose e sacarose, de concentrações 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg/L. A integração dos picos obtidos a partir de cada padrão foi otimizada com base no melhor coeficiente de regressão obtido. O software PeakNet 5.1 foi utilizado para a construção da curva de calibração a partir dos padrões injetados, além de quantificar as amostras.

As amostras foram diluídas com água Milli-Q de tal forma que as concentrações resultantes encontrem-se entre os limites utilizados na construção da curva de calibração. Para a diluição das amostras utilizou-se o diluidor Dilutor Dispenser 402 Gilson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção da enzima

4.1.1 Fermentação

A fermentação foi realizada utilizando-se meio sintético otimizado por Santos *et al.* (2002) e foi mantida por 72 horas, a uma temperatura de 27°C. Amostras foram retiradas durante a fermentação para monitoramento da atividade de inulinase no meio de cultivo das células.

A fermentação realizada por Santos *et al.* (2002) em *shaker* mostrou que as melhores condições seriam com temperatura de 23°C resultando em uma atividade de 301 UI/mL. No entanto, realizando-se a fermentação com o mesmo meio sintético, mas ao invés de *shaker* realizar em fermentador Bioflo III na temperatura de 27°C, observou-se uma maior atividade de inulinase ao final de 72 horas, que foi de 334,1 UI/mL, como pode ser observado da tabela 3 e figura 8.

Tabela 3: Aumento da atividade de inulinase no meio fermentativo.

<i>Tempo (horas)</i>	<i>Atividade Enzimática (UI/mL)</i>
0	0
24	227,7
32	249,5
48	265,9
56	268,8
72	334,1

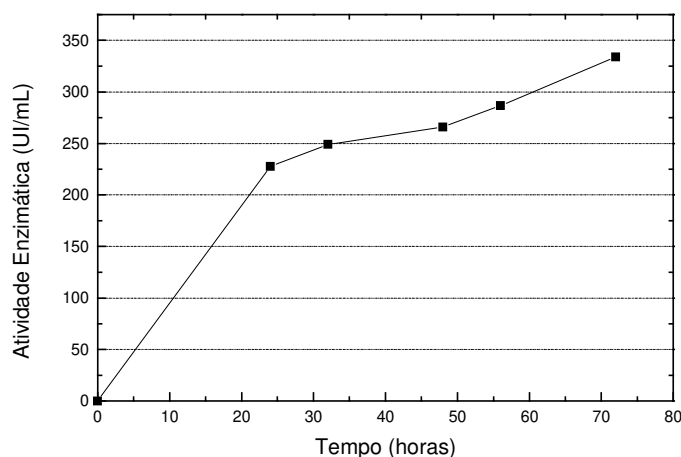


Figura 6: Aumento da atividade enzimática ao longo da fermentação.

4.1.2 Recuperação da enzima

O caldo fermentado contendo a enzima foi centrifugado e congelado a -4°C para posterior recuperação enzimática. Após 20 dias de congelamento, todo o caldo fermentado (2,5 litros) foi descongelado e a atividade medida. O caldo apresentou atividade de 319,1 UI/mL, um pouco inferior ao valor obtido após as 72 horas de fermentação, que foi de 334,1 UI/mL. Isso ocorre devido à desnaturação enzimática, que deve ter ocorrido no processo de congelamento e descongelamento.

Após a adição de etanol e centrifugação, obteve-se uma massa enzimática depositada que foi dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 4,8. A recuperação com etanol resultou num volume final de 300 mL de solução enzimática com uma atividade de 1839,3 UI/mL. Com o conhecimento dos volumes antes e após a recuperação e as atividades nestes dois momentos, pode-se calcular a eficiência de recuperação por este método, equação 8.

$$E.R = \frac{(Atividade\ enzimática \cdot Volume)_{depois}}{(Atividade\ enzimática \cdot Volume)_{antes}} \quad (8)$$

A eficiência de recuperação calculada para o processo descrito foi de 69%. Santos (2002) otimizou a purificação de inulinase de *K. marxianus* em FPLC com resina aniônica Q-Sepharose FF e obteve rendimentos de 86% em pH 6,0. Considerando-se que a recuperação com etanol é mais rápida e mais barata, pode-se dizer que esta recuperação apresentou resultados satisfatórios, dentro do escopo deste trabalho.

4.2 Estabilidade com o tempo da enzima recuperada

A enzima recuperada foi mantida refrigerada em 10°C, em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8, e a sua atividade foi monitorada ao longo do tempo. Os resultados estão mostrados na tabela 4 e figura 9.

Tabela 4: Estabilidade da inulinase livre ao longo do tempo de estocagem.

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Atividade (UI/mL)</i>
0	1839,3
14	1608,9
42	1465,3
67	1336,5
81	1215
116	1132,1
139	1093,5
189	939,5
259	616,1

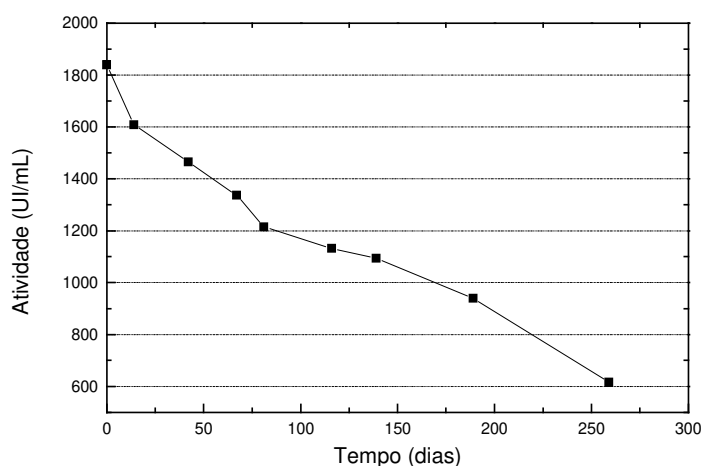


Figura 9: Atividade enzimática ao longo do tempo de estocagem.

Pode-se ver pela tabela 4 e figura 9 que com 4 meses de estocagem a inulinase perdeu aproximadamente 38% de sua atividade original. Santos (2002) também realizou este estudo e observou boa estabilidade com 4 meses de estocagem, sendo que a atividade apresentada ao final deste tempo foi de 99,91%.

Esta diferença deve-se provavelmente ao método utilizado na purificação enzimática. Santos utilizou a purificação por FPLC com resina, o que deve ter retirado muitas impurezas, que no caso da recuperação com etanol devem ter sido precipitadas junto com as enzimas e contribuído para uma desnaturação mais rápida e uma menor estabilidade com o tempo.

Pode-se concluir portanto que o método de purificação empregado deve ser estudado de acordo com a finalidade desejada. Purificando-se a enzima com etanol, têm-se uma recuperação barata e rápida, entretanto, a recuperação não é tão eficiente como quando se utiliza o FPLC, o que impacta na estabilidade da inulinase estocada em geladeira.

4.3 Caracterização da inulinase imobilizada em carvão ativado

A imobilização da inulinase foi feita em carvão ativado 3% conforme procedimento descrito anteriormente. Utilizou-se diferentes concentrações de enzima livre na solução enzimática para imobilização para determinação da melhor condição para utilização no leito catalítico. Imobilizou-se soluções com 50, 100 e 140 UI/mL de atividade enzimática e após o tratamento de imobilização determinou-se a atividade das cápsulas. A atividade foi medida após 48 horas da lavagem final para garantir que a enzima já estivesse estável na forma imobilizada.

Com os valores da atividade de partida da solução enzimática e da atividade final da enzima imobilizada é possível calcular a eficiência de imobilização.

Os valores de atividade final das cápsulas e eficiência estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Atividade retida após imobilização da inulinase em alginato de cálcio.

Atividade Solução Enzimática (UI/mL)	Atividade média das cápsulas (UI/mL)	Eficiência imobilização (%)
50	3,68	27,9
100	5,26	20,5
140	5,74	15,2

Da tabela 5, observa-se que a eficiência de imobilização, que traduz a capacidade de retenção da atividade na imobilização, diminui com o aumento da atividade da solução enzimática de partida. Esse efeito pode talvez ser explicado pela saturação do gel com o complexo enzima-carvão-glutaraldeído, que acima de um certo valor, não consegue mais nada reter em seu interior.

Pode-se notar também que a atividade retida é baixa, entre 3,68 e 5,74 UI/mL de cápsulas. Essa atividade é baixa para utilização em leitos catalíticos, entretanto, verificou-se que o carvão utilizado para esta imobilização não era o mais apropriado, e todas as imobilizações feitas em testes preliminares apresentaram atividade oscilando em torno deste valores.

Como observou-se que a atividade enzimática das cápsulas partindo-se de uma solução com 140 UI/mL e de 100 UI/mL resultaram em valores muito próximos, para a caracterização da inulinase imobilizada utilizou-se apenas as soluções de 50 e 100 UI/mL. Neste trabalho, os resultados serão discutidos usando-se a nomenclatura 50 UI/mL e 100 UI/mL, baseada na enzima livre de partida.

4.3.1 Comportamento da atividade enzimática em função do pH (pH ótimo)

O estudo de pH ótimo foi feito utilizando-se apenas um tipo de tampão, o acetato de sódio 0,1 M e pH ajustado para a faixa de 3,6 a 5,6, variando-se de 0,2. A atividade da inulinase imobilizada foi medida como descrito anteriormente e a temperatura foi mantida em 50°C. Os resultados estão apresentados na tabela 6 e figura 10.

Tabela 6: Variação da atividade enzimática com o pH.

<i>pH</i>	<i>Atividade enzimática 50 UI/mL</i>	<i>Atividade enzimática 100 UI/mL</i>
3,6	2,75	4,38
3,8	2	4,49
4	2,44	4,21
4,2	2,31	4,27
4,4	2,72	4,13
4,6	2,53	4,09
4,8	2,24	4,46
5	2,46	4,7
5,2	2,5	4,18
5,4	2,38	4,1
5,6	2,29	4

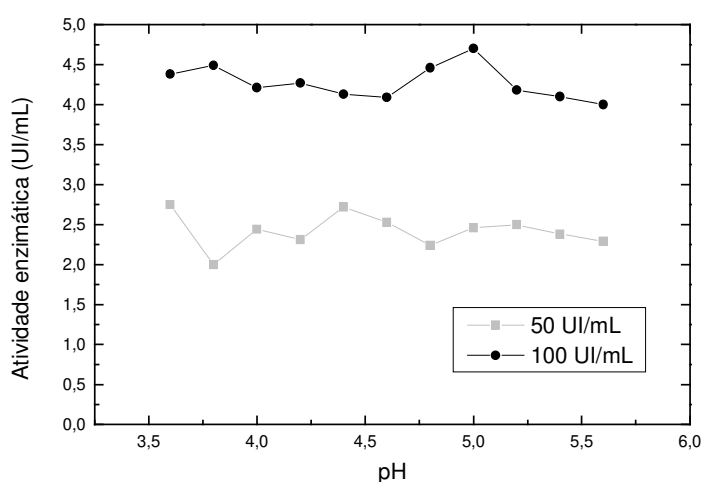


Figura 10: Atividade enzimática em função do pH do meio para os dois tipos de imobilização.

Como pode ser verificado pela figura 10 que dentro da faixa estudada não se obteve um máximo de atividade, sendo que os valores oscilaram entre um valor médio.

Este estudo será utilizado para determinar as condições de operação da inulinase imobilizada no leito catalítico, e como não foi obtido um valor máximo de atividade na faixa de 3,6 a 5,6, o pH será fixado em 4,8, que é o valor utilizado para a medida da atividade enzimática.

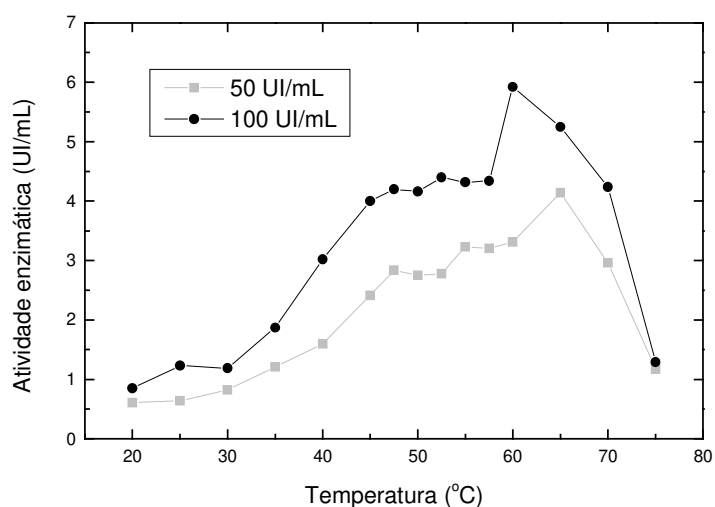
Santos (2002) estudou o pH ótimo da inulinase imobilizada somente em alginato de cálcio, sem a adição do carvão ativado e encontrou o pH ótimo em 4,4. A enzima livre apresentou pH em 4,8. Esta variação ocorre, quando a enzima se encontra imobilizada, devido ao efeito de atração de íons pela matriz do suporte.

4.3.2 Comportamento da atividade enzimática em função da temperatura (temperatura ótima)

A atividade enzimática foi medida em diferentes temperaturas ajustando-se o banho termostaticado para a temperatura desejada. A faixa estudada foi de 20 a 75°C e o procedimento para a medida foi descrito no item 4.5.2. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7 e figura 11.

Tabela 7: Variação da atividade enzimática com a temperatura.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Atividade enzimática 50 UI/mL</i>	<i>Atividade enzimática 100 UI/mL</i>
20	0,61	0,85
25	0,64	1,23
30	0,82	1,19
35	1,21	1,87
40	1,6	3,02
45	2,41	4
47,5	2,84	4,2
50	2,75	4,16
52,5	2,78	4,4
55	3,23	4,32
57,5	3,2	4,34
60	3,31	5,92
65	4,14	5,25
70	2,96	4,24
75	1,17	1,29

**Figura 11:** Perfil de atividade para a inulinase imobilizada em função da temperatura.

A partir da figura 11, percebe-se que as duas imobilizações mostraram a mesma tendência, com um patamar seguido de um máximo. Isso pode ser explicado pela termodinâmica do processo de imobilização, que pode causar este tipo de comportamento. A temperatura que apresenta o máximo de atividade,

temperatura ótima, é de 60°C para a enzima livre de partida de 100 UI/mL e de 65°C, para a de 50 UI/mL.

Com o perfil de atividade enzimática em função da temperatura, pode-se determinar a energia de ativação da reação catalisada pela inulinase. A velocidade de reação é dada pela equação de Arrhenius (equação 1) que só se aplica à parte da curva correspondente à ativação em função da temperatura, no caso de reações enzimáticas. Desta forma, construindo-se um gráfico de $1/T$ versus $\ln v/v_0$ pode-se obter a energia de ativação E_a .

Os dados utilizados na construção do gráfico estão apresentados na tabela 8 e calculou-se o $\ln v/v_0$ para as duas imobilizações feitas, partindo-se de 50 e 100 UI/mL de enzima livre. A velocidade inicial v_0 foi determinada na condição padrão de medida de atividade enzimática, a 50°C e pH 4,8.

Tabela 8: Dados para obtenção da energia de ativação da inulinase imobilizada.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Temperatura (K)</i>	<i>(1/T)*10³ (K⁻¹)</i>	<i>ln v/v₀ 50 UI/mL</i>	<i>ln v/v₀ 100 UI/mL</i>
20	293	3,413	1,361	1,623
25	298	3,356	1,313	1,254
30	303	3,300	1,066	1,287
35	308	3,247	0,676	0,835
40	313	3,195	0,397	0,356
45	318	3,145	-0,013	0,075
47,5	320,5	3,120	-0,177	0,026
50	323	3,096	-0,145	0,035

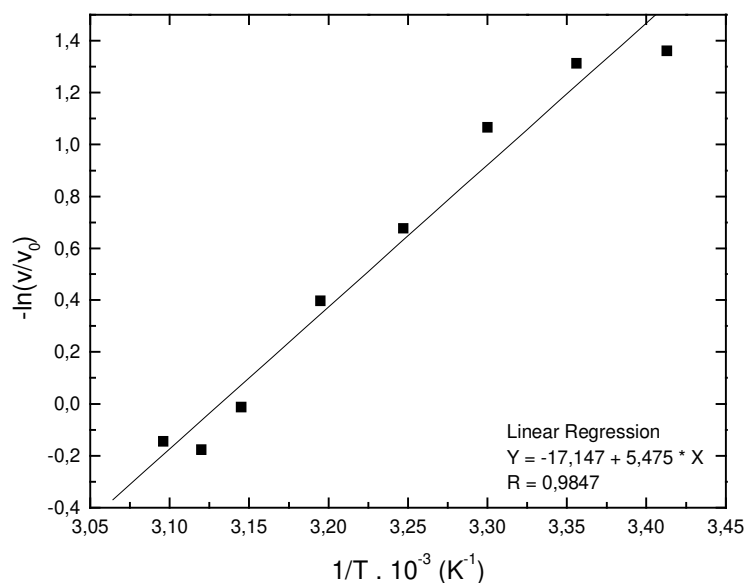


Figura 12: Linearização do perfil de temperatura para a enzima imobilizada 50 UI/mL.

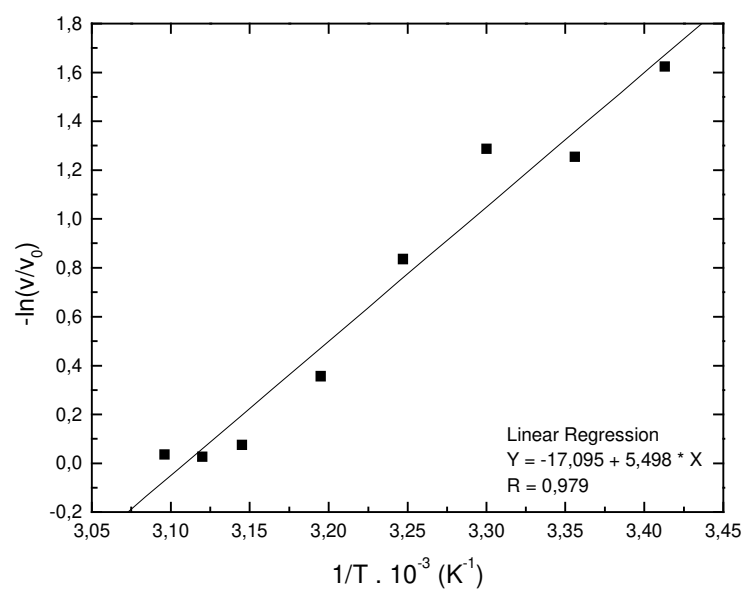


Figura 13: Linearização do perfil de temperatura para a enzima imobilizada 100 UI/mL.

Com o coeficiente angular, que é igual a E_a/R , determina-se a energia de ativação para os dois casos estudados.

Tabela 9: Energias de ativação para a inulinase imobilizada.

	<i>Inulinase 50 UI/mL</i>	<i>Inulinase 100 UI/mL</i>
Energia de ativação (kcal/mol)	10,878	10,929

As energias de ativação para as duas imobilizações feitas, com 50 e 100 UI/mL de inulinase livre, apresentaram valores bastante próximos.

4.3.3 Estabilidade da inulinase imobilizada com o tempo em diferentes temperaturas

O estudo da estabilidade com o tempo é bastante útil no projeto de bioreatores, já que com estes dados é possível calcular a energia de desativação e tempo de meia-vida, obtendo-se modelos para predição destas características da enzima imobilizada.

A inulinase imobilizada foi incubada em tampão acetato de sódio 0,1 M nas temperaturas de 50, 55, 57,5 e 60°C e a atividade foi medida ao longo do tempo, até que a atividade tivesse decaído a aproximadamente 50% da atividade inicial. O estudo foi realizado apenas com a inulinase imobilizada a partir da solução de 100 UI/mL, já que a atividade retida pelas cápsulas foi maior do que partindo-se de 50 UI/mL e o estudo em biorreatores exige maior atividade enzimática. Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados abaixo nas tabelas 10 a 15.

Tabela 10: Diminuição na atividade enzimática com o tempo na temperatura 50°C.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Atividade Enzimática (UI/mL)</i>
0	5,93
24	6,35
48	5,64
72	4,81
98	4,27
122	4,51
146	4,57
170	3,45
194	3,67
242	3,7
266	3,1
304	3,09
333	2,37

Tabela 11: Diminuição na atividade enzimática com o tempo na temperatura 55°C.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Atividade Enzimática (UI/mL)</i>
0	6,96
5	5,09
10	4,51
24	4,68
29	4,62
61	3,64
80	3,9
98,5	3,64
122,5	2,43
146,5	2,19
170,5	2,28

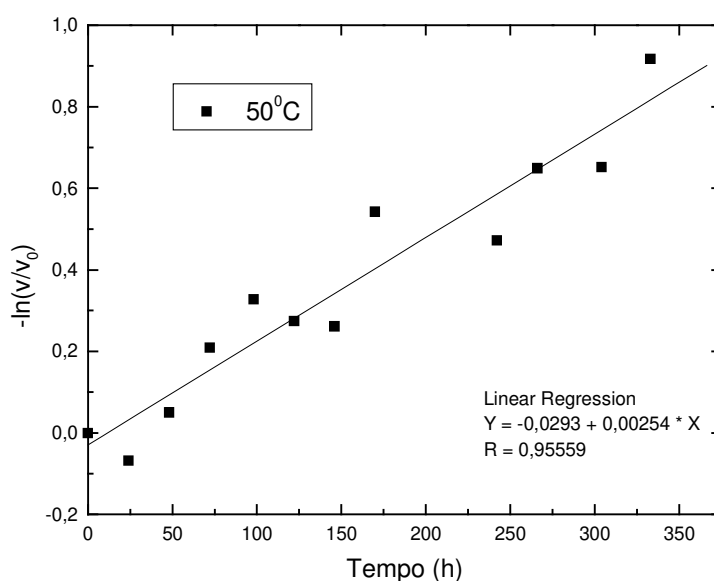
Tabela 12: Diminuição da atividade enzimática com o tempo na temperatura 57,5°C.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Atividade Enzimática (UI/mL)</i>
0	3,37
1,5	2,47
5	2,45
7	2,09
26	2,28
28	1,91
49	1,6
51	1,66
75,5	1,16

Tabela 13: Diminuição da atividade enzimática com o tempo na temperatura 60°C.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Atividade Enzimática (UI/mL)</i>
0	3,23
3	2,48
4,5	2,01
5,5	2,02
6,15	1,82
8,15	1,73
10	1,03

A partir dos dados obtidos experimentalmente, determinou-se a constante de desnaturação k_d experimental para cada temperatura com o auxílio do gráfico de $\ln v/v_0$ versus tempo e utilizando-se a equação de Arrhenius linearizada. Utilizou-se o recurso de ajuste linear do software Microcal Origin 5.0 para a determinação dos coeficientes angulares da reta obtida, já que este valor é igual a constante de desnaturação como pode ser observado pela equação 6. As figuras 14 a 17 mostram individualmente para cada temperatura o procedimento para o cálculo de k_d e a figura 16 reúne os dados de todas as temperaturas, como comparação.

**Figura 14:** Obtenção da constante de desnaturação a 50°C.

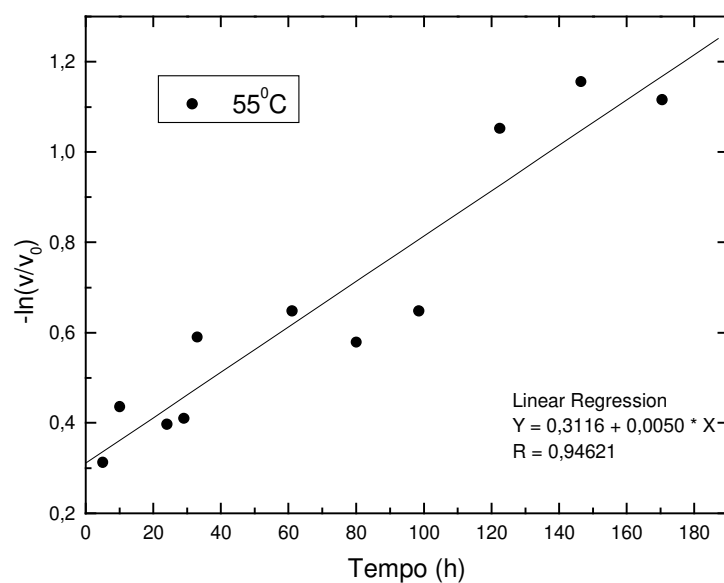


Figura 15: Obtenção da constante de desnaturação a 55°C.

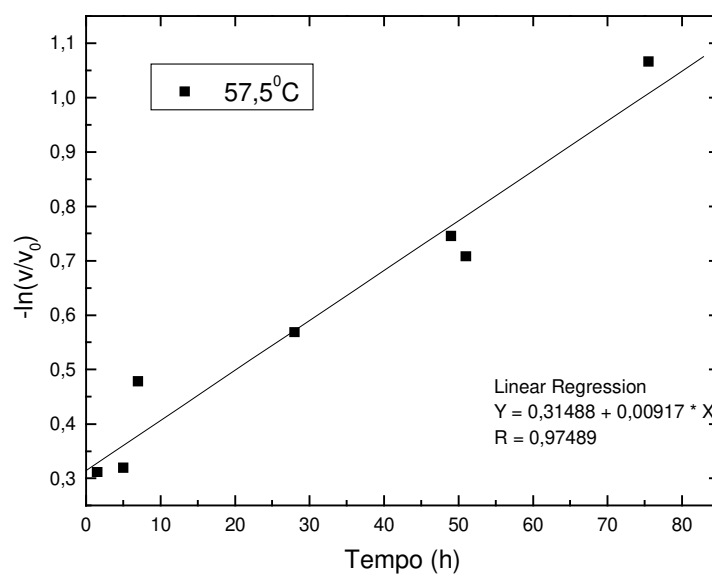


Figura 16: Obtenção da constante de desnaturação a 57,5°C.

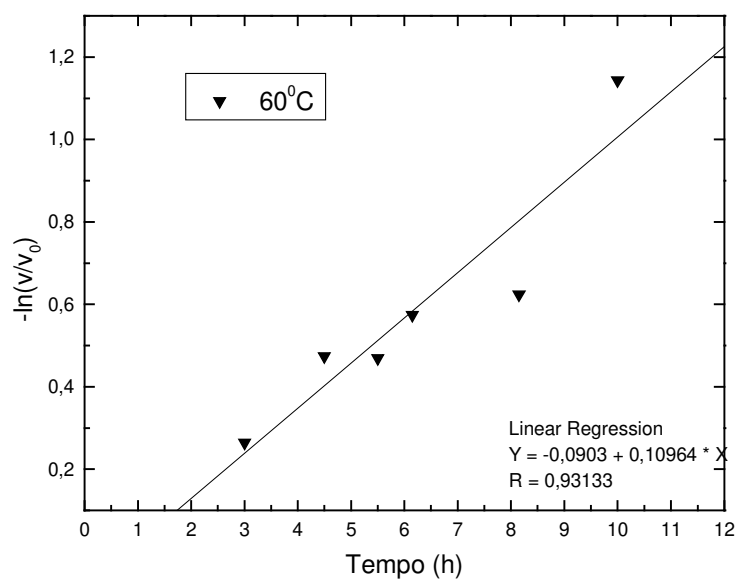


Figura 17: Obtenção da constante de desnaturação a 60°C.

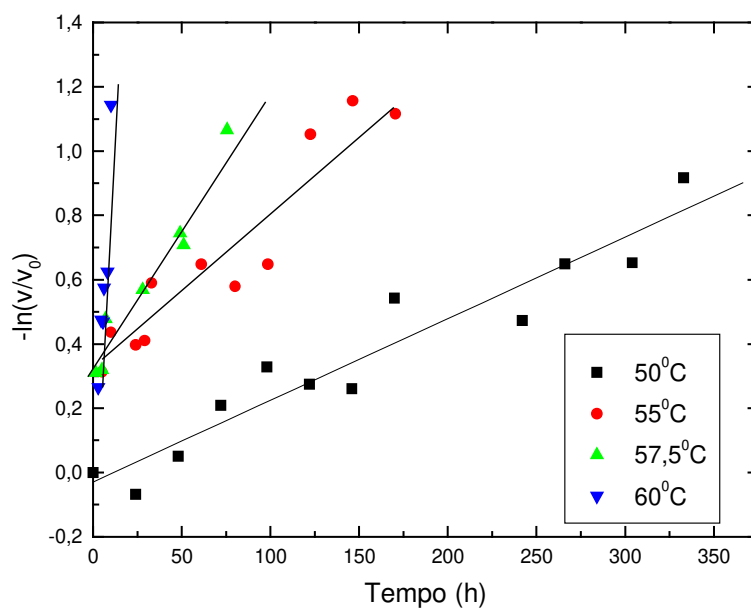


Figura 18: Desnaturação enzimática com a temperatura.

A partir das curvas para cada temperatura (figuras 14 a 17 e 18), verifica-se que quanto maior a temperatura, maior a constante de desnaturação enzimática, o que é esperado, visto que altas temperaturas desnaturam a enzima, diminuindo sua estabilidade térmica. A 50°C a inulinase imobilizada em carvão ativado se mostrou bastante estável.

A partir dos valores encontrados para a constante k_d , pode-se calcular a meia-vida que é o tempo decorrido para que a enzima perca 50% de sua atividade catalítica. A equação que correlaciona o k_d com a meia-vida ($t_{1/2}$) é expressa pela equação 5. Os valores obtidos experimentalmente do k_d e a meia-vida estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Constante de desnaturação obtidos experimentalmente.

Temperatura (°C)	k_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ (dias)
50	0,00254	266,6	11,1
55	0,00501	133,3	5,6
57,5	0,00917	74,5	3,1
60	0,10964	6,3	0,3

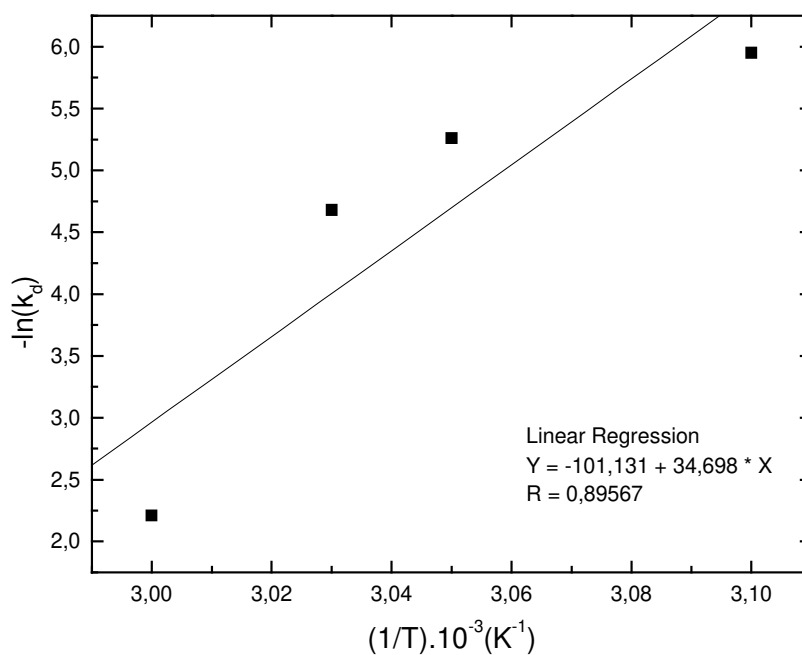
A constante de desnaturação k_d também pode ser representada por Arrhenius como foi mostrado na equação 6.

$$\ln(k_d) = \ln(k_{d0}) - \frac{E_d}{RT} \quad (9)$$

Desta forma, plotando-se um gráfico de $\ln k_d$ versus o inverso da temperatura, pode-se obter a energia de desnaturação (E_d) e a constante k_{d0} , determinando-se então um modelo para esta constante em função do tempo. Os valores obtidos para a construção do gráfico linearizado estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15: Valores experimentais para $\ln k_d$ e $1/T$.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$1/T \cdot 10^3 \text{ (K}^{-1}\text{)}$	$-\ln k_d$
50	3,10	5,95
55	3,05	5,26
57,5	3,03	4,68
60	3,00	2,21

**Figura 19:** Linearização para obtenção da constante de desnaturação.

A temperatura de 60°C não foi considerada para obtenção da energia de desnaturação, visto que a constante de desnaturação obtida foi muito superior às observadas para as outras temperaturas (tabela 14) e não se encaixava no ajuste linear exigido pela modelagem da equação de Arrhenius (figura 19). O modelo obtido não pode ser usado portanto, para altas temperaturas.

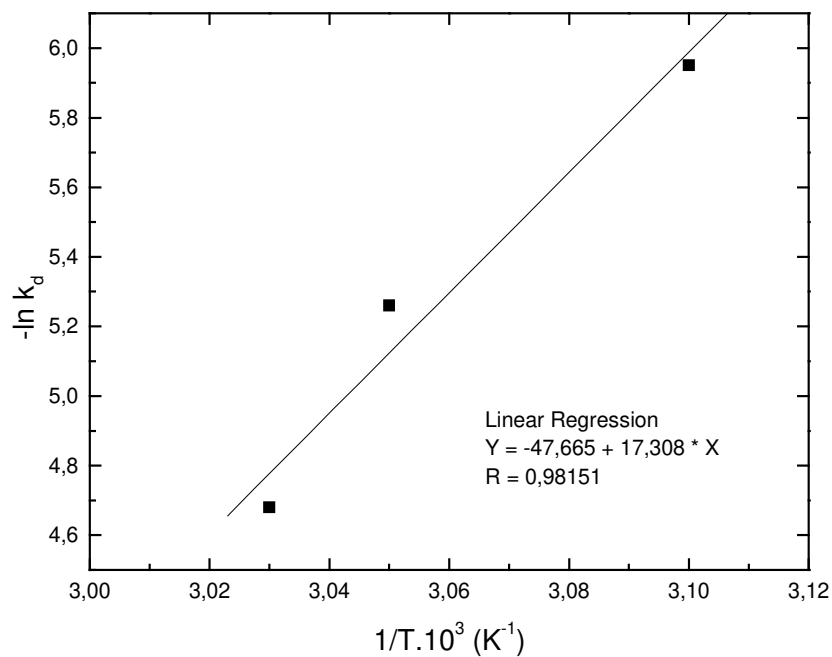


Figura 20: Linearização da equação da constante de desnaturação enzimática para determinação de E_d .

O coeficiente angular obtido da linearização é numericamente igual a E_d/R e o coeficiente linear é igual a $\ln k_{do}$.

Tabela 16: Energia de ativação da reação de desnaturação e constante de desnaturação para a inulinase imobilizada.

<i>Ed (kcal/mol)</i>	<i>k_{do} (h⁻¹)</i>
35,03	1,27088.10 ²¹

Assim o modelo obtido para a constante de desnaturação está apresentado na equação 10.

$$k_d = 1,21088.10^{21} \cdot \exp\left(\frac{-35030}{R.T}\right) \quad (10)$$

Com este modelo para o qual foi possível determinar valores da constante de desnaturação e meia-vida para outras temperaturas, inferiores a 50°C. A tabela 17 relaciona os valores experimentais e previstos pelo modelo, como comparação.

Tabela 17: Meias-vidas calculadas pelo modelo em diferentes temperaturas.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>kd experimental (h⁻¹)</i>	<i>kd modelo (h⁻¹)</i>	<i>t_{1/2} experimental (h)</i>	<i>t_{1/2} modelo (h)</i>
50	0,0026	0,0025	266,6	276,3
55	0,0052	0,0057	133,3	120,2
57,5	0,0093	0,0087	74,5	80,1

Da tabela 17, percebe-se que os valores obtidos experimentalmente e os valores calculados através do modelo são bastante próximos, o que permite a utilização do mesmo para a previsão do comportamento da inulinase imobilizada em carvão ativado.

Santos (2002) estudou a estabilidade da inulinase livre e imobilizada em gel alginato de cálcio e constatou que a 50°C a meia-vida é de 229 horas para a enzima livre e de 7,3 horas para a imobilização em alginato. Nesta mesma temperatura, a imobilização em alginato com adição de carvão ativado e glutaraldeído apresentou meia-vida de 266,6 horas, o que mostra que este método de imobilização retém a atividade enzimática por quase o mesmo tempo que na condição da inulinase livre.

A imobilização em carvão pode ser uma boa alternativa para uso industrial, já que mantém a atividade enzimática por período relativamente grande, além de apresentar as vantagens de ser facilmente separada dos produtos.

4.3.4 Determinação da temperatura ideal de processo

A temperatura na qual se tem um compromisso entre a melhor produtividade e estabilidade da inulinase imobilizada em carvão ativado, que é a temperatura de processo, pode ser determinada através de um gráfico das curvas

de meia-vida e atividade enzimática em função da temperatura. A temperatura de processo é obtida a partir do cruzamento destas duas curvas e para a inulinase imobilizada em carvão ativado o gráfico está representado na figura 18.

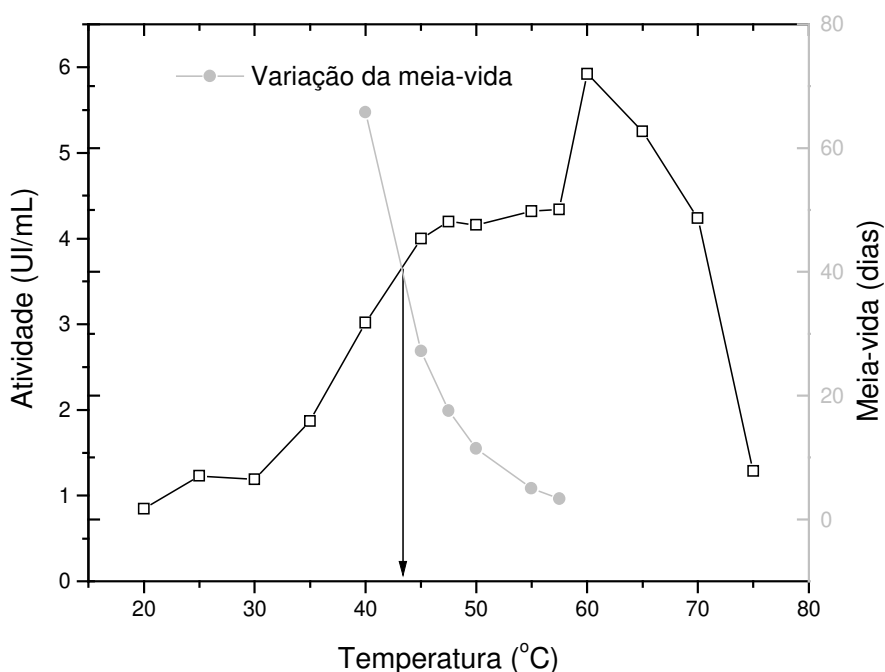


Figura 21: Determinação da temperatura de processo.

Da figura 21 determinou-se a temperatura de processo para a inulinase imobilizada em carvão ativado, que é de 43°C. Nesta temperatura, a atividade enzimática é de 3,6 UI/mL, aproximadamente 61% da atividade máxima atingida e a meia-vida é de 40 dias.

Esta temperatura de 43°C será, portanto, utilizada no leito catalítico de inulinase imobilizada, já que é o ponto que combina uma atividade enzimática suficiente para utilização em um reator com um compromisso com a estabilidade enzimática com o tempo. Este aumento na meia-vida é bastante interessante do ponto de vista da utilização industrial de inulinase imobilizada já que para esta finalidade é necessário que a enzima mantenha sua atividade catalítica por um tempo razoável.

4.4 Obtenção da frutose e glicose a partir da sacarose

4.4.1 Coluna 1

Inicialmente utilizou-se uma coluna de vidro de 24 cm de altura por 2,3 cm de diâmetro para a obtenção de frutose e glicose. Aproximadamente 62 ml de inulinase imobilizada foram empacotadas na coluna encamisada e mantida a 43⁰C. A atividade inicial da inulinase imobilizada foi de 5,73 UI/mL.

A solução de sacarose de 500 g/L (50%) foi preparada utilizando-se sacarose comercial, adicionando-se 0,05 M de CaCl₂ e 0,005 M de azida. Estes últimos componentes foram acrescentados já que em testes preliminares em leito catalítico houve a contaminação da coluna e perda da forma das cápsulas de inulinase imobilizada, o que pode ser contornado pela adição de azida e cloreto de cálcio respectivamente. O pH da solução de sacarose foi ajustado para 4,8, que é o pH de medida da atividade enzimática.

A sacarose em solução foi bombeada para a coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica e a vazão foi ajustada primeiramente em 0,16 mL/min e num segundo experimento, foi ajustada para 0,06 mL/min.

O tempo de residência da solução de sacarose no reator tubular foi calculado a partir da equação 11.

$$\tau = \frac{V_{\text{Reator}}}{Q} \quad (11)$$

Em que τ : tempo de residência no reator

V_{Reator} : volume total do reator

Q : vazão da solução de sacarose.

Desta forma, para estas vazões, os tempos de residência estudados foram de 3,7 e 9,4 horas. Nestes experimentos, buscou-se determinar a vazão e o tempo de residência para se obter a maior conversão possível de sacarose.

Na saída da coluna colocou-se um coletor de amostras, e no experimento do tempo de residência de 3,7 horas coletou-se amostras de 20 em 20 minutos e no de 9,4 horas, de 40 em 40 minutos. As amostras obtidas foram analisadas em cromatógrafo de íons Dionex 500 e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 18.

Pode-se observar a partir da tabela 18 e figura 19 que o tempo de residência de 3,4 horas não permitiu a hidrólise máxima, já que após a estabilização do degraú dado na vazão, ainda restava 44% de sacarose na saída do leito catalítico, significando uma conversão de 56%. Outra conclusão obtida foi de que demorou aproximadamente 400 minutos, ou 2 tempos de residência para que a coluna se estabilizasse após o pulso dado.

Para o tempo de residência de 9,4 horas, tabela 19 e figura 20, obteve-se uma conversão melhor da sacarose, como pode ser observado. Ao final de 1100 min, ou 18,3 horas, a coluna estabilizou em 20% de sacarose não convertida na saída, ou seja 80% de conversão. Assim, com o aumento do tempo de residência da solução de sacarose na coluna, é possível obter melhores conversões. Entretanto, a vazão na bomba já se encontrava no valor mínimo, então decidiu-se por aumentar a atividade catalítica do leito com o aumento da quantidade de enzimas, aumentando o tamanho da coluna.

Tabela 18: Análise dos açúcares na saída do reator enzimático para tempo de residência de 3,7 horas.

Tempo (min)	Glicose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)
0	18,5	17,6	64,0
20	18,1	16,9	65,0
40	17,2	16,7	66,1
60	17,3	16,6	66,0
80	18,7	17,4	63,9
100	19,6	18,1	62,3
120	19,8	19,2	61,0
140	21,0	19,3	59,8
160	21,8	20,3	57,9
180	22,8	20,6	56,6
200	23,5	21,6	54,9
220	24,1	21,5	54,4
240	25,0	22,4	52,6
260	25,5	23,0	51,4
280	26,5	23,3	50,2
300	26,2	23,8	49,9
320	26,9	24,5	48,6
340	27,9	24,7	47,4
360	28,2	24,8	47,0
380	27,8	25,5	46,7
400	28,3	25,2	46,5
420	28,3	25,8	45,9
440	28,3	26,1	45,7
460	29,4	25,7	45,0
480	29,8	26,6	43,6
500	29,2	26,5	44,3
520	28,7	26,8	44,5
540	28,8	27,5	43,7
560	29,0	27,3	43,7
580	29,5	26,8	43,7
600	29,7	26,6	43,7
620	29,7	27,3	43,0
640	29,8	26,6	43,6
660	29,6	26,2	44,2
680	30,2	26,6	43,2
700	29,9	27,2	42,9
720	30,0	26,9	43,1
740	29,3	27,0	43,8
760	29,1	26,6	44,3
780	29,8	26,6	43,5
800	29,1	26,4	44,6

Tabela 19: Análise do açúcares na saída do reator tubular para o tempo de residência de 9,4 horas.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Glicose (%)</i>	<i>Frutose (%)</i>	<i>Sacarose (%)</i>
0	28,5	23,3	48,1
40	26,9	23,3	49,8
80	27,5	22,6	49,9
160	27,3	23,1	49,6
200	28,1	23,5	48,5
240	28,8	24,4	46,8
280	30,0	25,2	44,8
360	30,4	26,3	43,3
400	31,2	26,6	42,2
440	32,6	27,9	39,6
480	32,6	27,6	39,8
520	32,9	27,8	39,2
560	33,4	29,1	37,5
600	35,3	30,2	34,6
640	35,1	30,3	34,6
680	34,4	30,1	35,4
720	35,4	29,9	34,7
760	34,0	31,9	34,1
800	34,7	33,4	32,0
840	35,9	32,2	31,9
880	36,1	33,5	30,4
960	36,3	34,6	29,1
1000	38,6	34,4	27,1
1080	39,2	35,9	24,8
1120	38,5	37,1	24,4
1200	38,6	38,0	23,4
1280	40,1	37,8	22,1
1360	40,1	38,2	21,7
1440	39,8	39,0	21,2
1600	41,3	39,4	19,4
1640	42,0	39,0	18,9
1680	42,0	39,2	18,8
1760	41,2	37,7	21,1
1800	40,2	38,9	20,9
1840	41,2	38,2	20,6
1880	41,0	37,6	21,4

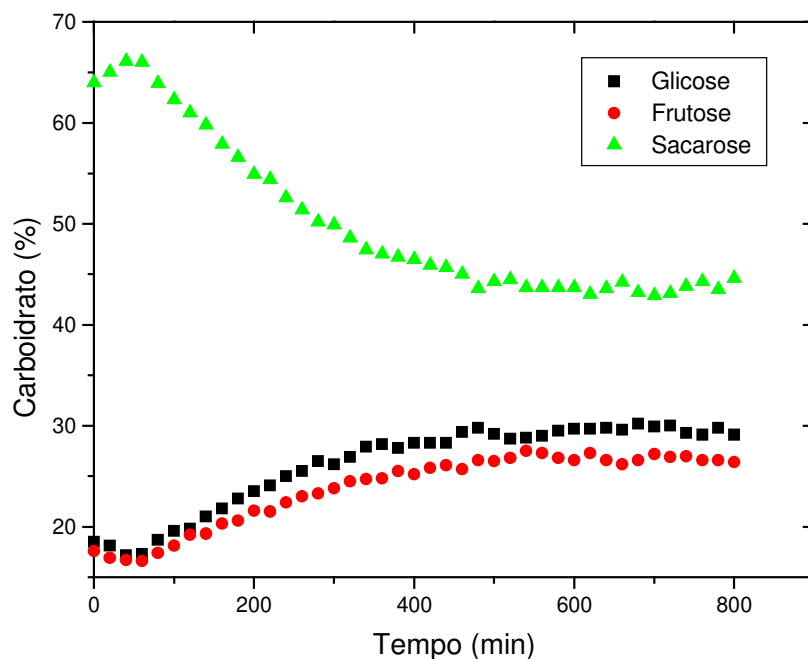


Figura 22: Concentração de açúcares na saída do reator de hidrólise no tempo de residência de 3,7 horas.

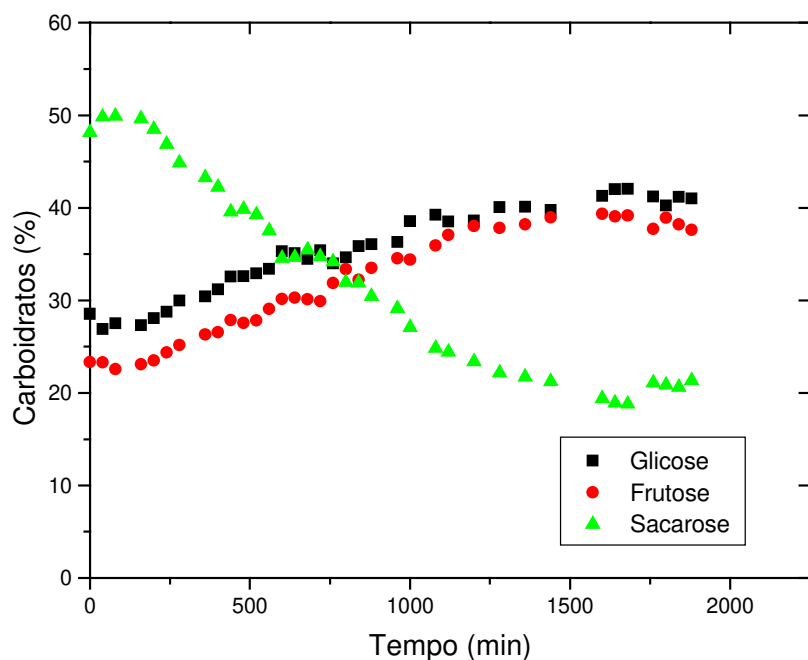


Figura 23: Concentração de açúcares na saída do reator com tempo de residência de 9,4 horas.

4.4.2 Coluna 2

Na tentativa de otimizar a coluna de hidrólise, aumentando a conversão da sacarose, buscou-se aumentar a atividade do leito catalítico. Para aumentar a atividade do leito procedeu-se de duas maneiras: foram aumentadas as dimensões do leito em relação à coluna 1 e ao mesmo tempo tentou-se obter cápsulas com atividade maior.

A imobilização da inulinase foi feita com outro tipo de carvão ativado, mais apropriado para a adsorção de proteínas, fornecido pela empresa Carvonite-ANF®, na tentativa de aumentar a atividade retida nas cápsulas. A imobilização foi realizada da mesma maneira citada anteriormente, apenas foi mudado o carvão utilizado.

Imobilizou-se inicialmente um lote para um teste preliminar partindo-se de uma solução enzimática de 100 UI/mL de enzima livre, conforme feito anteriormente. A atividade final foi medida em duplicata e obteve-se 10,2 UI/mL de atividade das cápsulas, praticamente o dobro do que se obtinha inicialmente, com o outro tipo de carvão.

O tamanho da coluna utilizada como reator tubular também foi aumentado para 37 cm de altura e 2 cm de diâmetro, resultando em um volume de 125,7 cm³. Para isso, imobilizou-se 3 lotes de enzima e as atividades das cápsulas resultantes estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20: Rendimento de imobilização utilizando-se o novo tipo de carvão ativado.

Lote	1a atividade (UI/mL)	2a atividade (UI/mL)	Rendimento da imobilização (%)
1	10,26	10,86	35
2	10,0	10,64	39
3	9,5	9,7	36

Por esta tabela percebe-se que a imobilização com o novo tipo de carvão resulta em melhores rendimentos, além de uma maior atividade das cápsulas de enzima. Como os três lotes apresentaram atividades catalíticas próximas, eles foram misturados e empacotados para utilização no leito catalítico.

O volume de esferas com inulinase imobilizada foi de 105 mL na coluna e as condições de temperatura e vazão foram mantidas iguais às da coluna anterior, com a vazão de 0,06 mL/min, o que resulta em um tempo de residência de 6,2 horas.

Iniciou-se a alimentação com a solução de sacarose 50% e, na saída da coluna, com o auxílio do coletor de amostra, retirou-se amostras de 30 em 30 minutos durante 24 horas para medida das concentrações de glicose, frutose e sacarose. As amostras foram analisadas por cromatografia de íons e quantificadas com o auxílio do software Peak Net e estão apresentadas na tabela 21.

Tabela 21: Análise dos açúcares na saída da coluna para tempo de residência de 6,2 horas.

Tempo (h)	Glicose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)
0,5	11,4	11,1	77,4
1	13,9	13,1	73,1
2	17,5	15,0	67,5
3,5	32,4	28,9	38,7
4	36,0	31,8	32,2
5	39,6	36,3	24,1
8	45,0	41,4	13,5
9	44,9	42,0	13,1
10	47,0	41,9	11,1
12	46,4	43,1	10,6
14	48,2	46,2	0,56
15	48,3	47,4	0,43
16	49,1	47,5	0,34
17	49,5	47,5	0,31
18	49,4	48,0	0,26
19	49,7	47,7	0,26
20	50,0	47,6	0,24
21	49,9	47,9	0,22
22	49,7	48,1	0,23
23	49,6	48,2	0,22
24	50,2	47,7	0,20

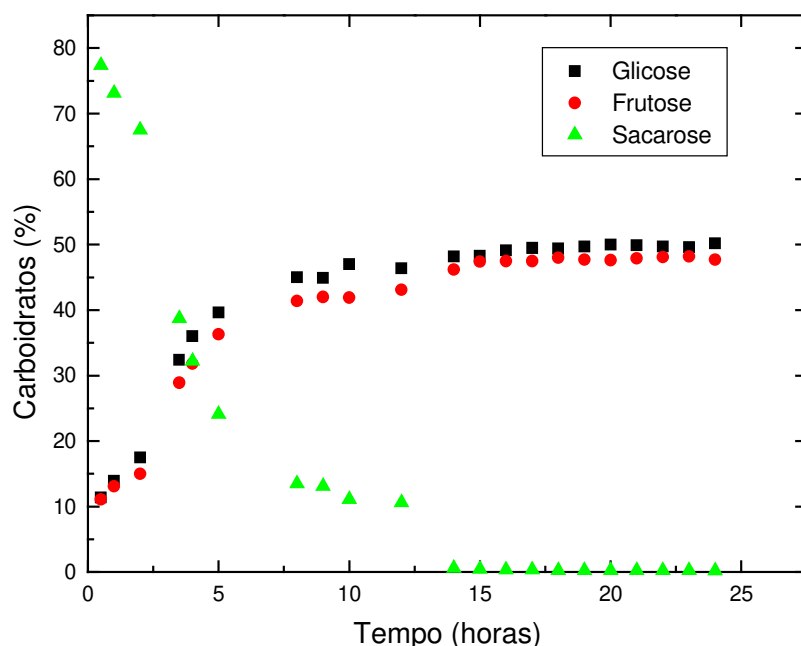


Figura 24: Concentração de açúcares na saída da coluna de hidrólise com tempo de residência 6,2 horas.

Nestas condições de operação, o leito catalítico apresentou alta conversão da sacarose, de aproximadamente 98%, depois de estabelecido o regime permanente.

A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* apresenta além da característica hidrolítica, a capacidade de sintetizar frutooligossacarídeos, como estudado por Santos (1998). Os frutooligossacarídeos são polímeros de frutose ligados a uma molécula de sacarose e apresentam efeitos benéficos no organismo humano. Diante disso, verificou-se se nas condições de operação do leito de hidrólise havia formação de frutooligossacarídeos, além da glicose e frutose. Para isso, utilizou-se o cromatógrafo Dionex 500 com outro método de eluição específico para frutooligossacarídeos. As amostras obtidas na saída da coluna de hidrólise foram analisadas por cromatografia de íons e não se verificou a síntese de frutooligossacarídeos. Isso pode ser explicado, talvez, pelo fato de que as reações de transfrutossilação, que levam à formação dos oligossacarídeos, só é favorecida quando a síntese ocorre em altas concentrações de sacarose (acima

de 45%), e à medida que a concentração de sacarose diminui no meio reacional, ocorre a hidrólise dos frutooligossacarídeos, obtendo-se apenas glicose e frutose ao final do processo. Como o leite de hidrólise tem um tempo de residência relativamente alto e a concentração de sacarose diminui ao longo do leite, o processo não favorece a formação destes compostos.

Após a análise do perfil na saída da coluna durante 24 horas, o leite foi deixado operando e amostras passaram a ser retiradas diariamente para verificação da meia-vida do leite catalítico, com a coluna em operação. Os dados estão mostrados na figura 25.

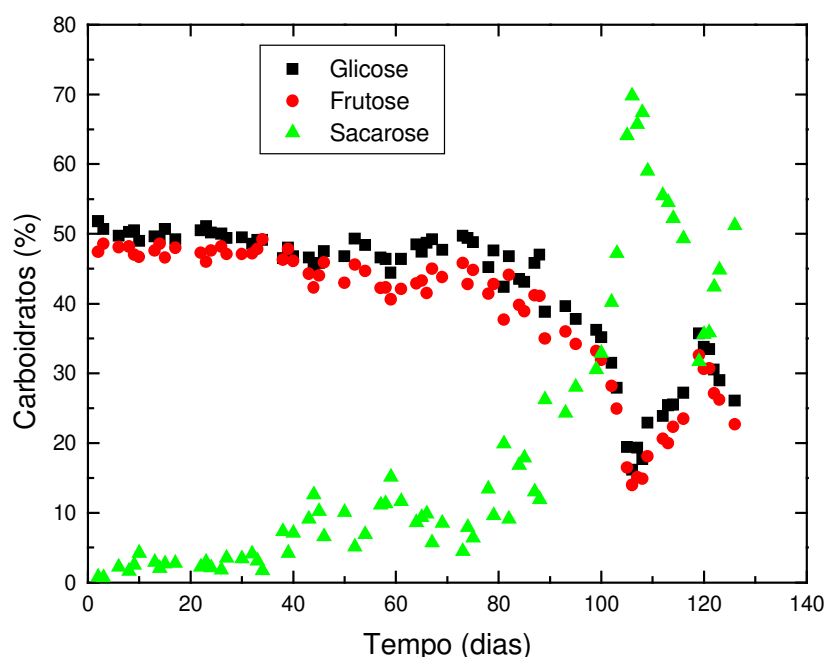


Figura 25: Concentração na saída da coluna de hidrólise ao longo do tempo de operação do reator.

A coluna operou durante 126 dias, e foram observadas flutuações na conversão da sacarose, entretanto, observou-se uma tendência geral, que em aproximadamente 80 dias de operação a conversão se manteve em no mínimo 85%. Este resultado da operação do reator é muito interessante, já que se pode

pensar na utilização industrial da inulinase imobilizada por um tempo prolongado sem necessidade de troca do biocatalisador.

Após 100 dias de operação, notou-se um aumento súbito na concentração de sacarose na saída do reator, seguido de diminuição (aumento na conversão) e aumento da sacarose novamente, o que indica a perda da atividade enzimática. A atividade das cápsulas foi medida 3 vezes ao longo da operação do reator, durante pequenas paradas para limpeza.

Tabela 22: Atividade da inulinase imobilizada ao longo do período de utilização do leito catalítico.

<i>Tempo (dias)</i>	<i>Atividade (UI/mL)</i>
0	10,20
45	6,77
88	5,91
148	2,33

Até 88 dias de operação, a atividade enzimática permanecia ainda bastante alta, entretanto a última medida indica uma perda brusca da atividade, que passou para 2,33 UI/mL. Esta perda brusca da atividade pôde ser percebida na figura 23 pela oscilação na concentração de sacarose na saída do leito catalítico.

Como a atividade inicial das cápsulas foi de 10,2 UI/mL em média, pode-se dizer que o tempo para que a atividade decaísse a 25% da atividade, que é o limite adotado para manter o leito em funcionamento, determinado experimentalmente é de 148 dias. Como pode ser observado da tabela 22, a atividade decaiu para 2,33 UI/mL com 148 dias de utilização do leito catalítico, o que é aproximadamente 25% da atividade inicial. Isso representa um grande avanço na imobilização desta enzima, podendo-se pensar em sua utilização industrial. A adição do carvão ativado e o uso do glutaraldeído, promoveram uma maior estabilização da inulinase, que permite a utilização da coluna por praticamente 5 meses sem mudança do catalisador.

A partir do estudo de caracterização da inulinase imobilizada em alginato de cálcio com adição de carvão ativado, determinou-se uma meia-vida, a 43°C, (temperatura de operação do leito de hidrólise) de 40 dias. O tempo para que a atividade decaísse a 25% da atividade inicial (duas meias-vidas) seria de 80 dias. Entretanto, pela verificação experimental da operação do leito, o tempo para que a atividade decaísse a 25% da inicial foi de 148 dias. Esta diferença entre os valores obtidos da caracterização e experimental na operação do leito de hidrólise pode ser explicada pela diferença nos meios em que a enzima se encontrava armazenada. Na caracterização da inulinase, as cápsulas foram armazenadas em tampão acetato de sódio pH 4,8, enquanto na operação do leito de hidrólise, a enzima se encontrava continuamente em contato com a sacarose. É conhecido que o contato contínuo de enzima com o substrato, como neste caso, promove uma estabilização adicional à enzima, o que explica os resultados obtidos aqui.

4.5 Separação de frutose e glicose

A separação cromatográfica da frutose e glicose foi realizada em coluna de leito fixo empacotada com zeólita Y Baylith trocada com íons Ba^{2+} , que adsorve preferencialmente a frutose. Vários experimentos foram realizados de maneira a se encontrar a melhor separação possível dos picos cromatográficos, para um pulso constituído de uma mistura de 250 g/L de cada componente, ou seja, glicose e frutose. Esta concentração da mistura foi utilizada visto que a saída da coluna de hidrólise é constituída destes açúcares, nesta concentração, e visto que o objetivo final do projeto é associar a coluna de hidrólise da sacarose com o sistema de separação de frutose e glicose.

A resposta à pulsos cromatográficos foi analisada pelo método proposto por Lu & Lee (1987) e utilizado por Cavenaghi (1999) através do cálculo da eficiência de separação entre os picos (ES_{12}), que é calculada pelas equações 12, 13 e 14.

$$ES_{12} = \frac{\Delta t_{12}}{\sigma_{12}} \quad (12)$$

em que

$$\Delta t_{12} = (\mu_1 - \mu_2) \quad (13)$$

$$\sigma_{12} = (\sigma_1 \cdot \sigma_2)^{1/2} \quad (14)$$

O primeiro e segundo momentos para cada componente da mistura a ser separada, são definidos respectivamente como:

$$\mu_i = \frac{\sum_{i=1}^N C_i \cdot t_i \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^N C_i \Delta t_i} \quad (15)$$

$$\sigma_i^2 = \frac{\sum_{i=1}^N C_i (t_i - \mu)^2 \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^N C_i \cdot \Delta t_i} \quad (16)$$

em que C_i é a concentração do componente na fração i no tempo t_i , e Δt_i o intervalo de amostragem.

4.5.1 Ensaio preliminar de separação cromatográfica

Neste ensaio, utilizou-se uma coluna de 50 cm de altura por 1 cm de diâmetro, com volume total de 39,3 cm³ e o pulso dado foi de 4 ml da solução frutose-glicose 250 g/L, aproximadamente 10% do volume da coluna. A vazão foi fixada em 0,2 ml/min e as amostras foram coletadas de 15 em 15 minutos. Analisou-se as amostras em cromatógrafo de íons Dionex 500 e a figura 24 mostra os resultados obtidos.

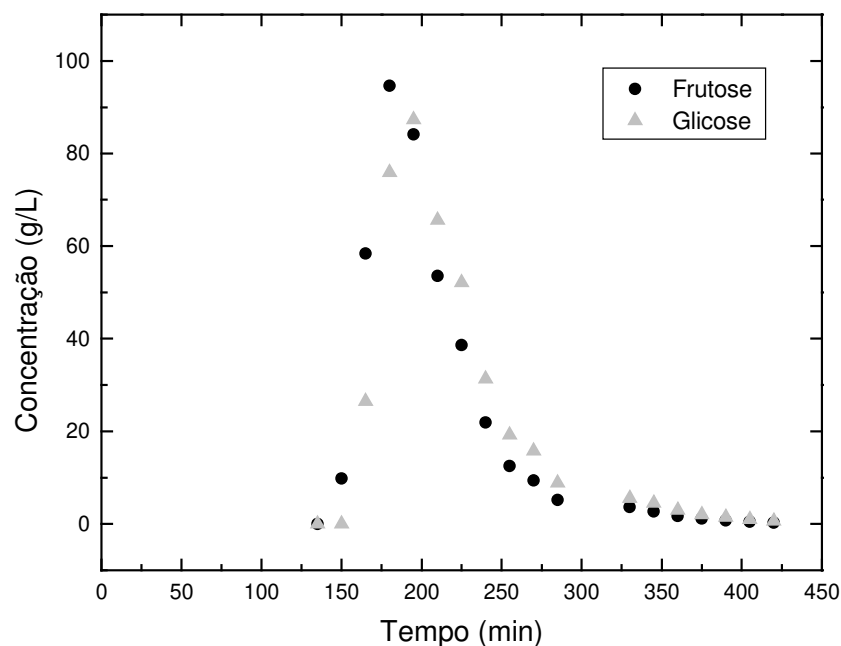


Figura 26: Separação de frutose e glicose com vazão de 0,2 mL/min.

A eficiência de separação calculada foi de 0,32, e como se pode notar pela figura 26 a separação dos picos de frutose e glicose não foi boa. Como a concentração de frutose e glicose é alta na mistura de açúcares, o pulso de 4 ml foi muito alto para o tamanho da coluna cromatográfica. Por isso decidiu-se diminuir o volume do pulso para 1 mL e aumentar o tempo de residência na coluna, diminuindo-se a vazão para 0,1 mL/min. Os demais parâmetros foram mantidos inalterados. Os resultados estão expressos na figura 27.

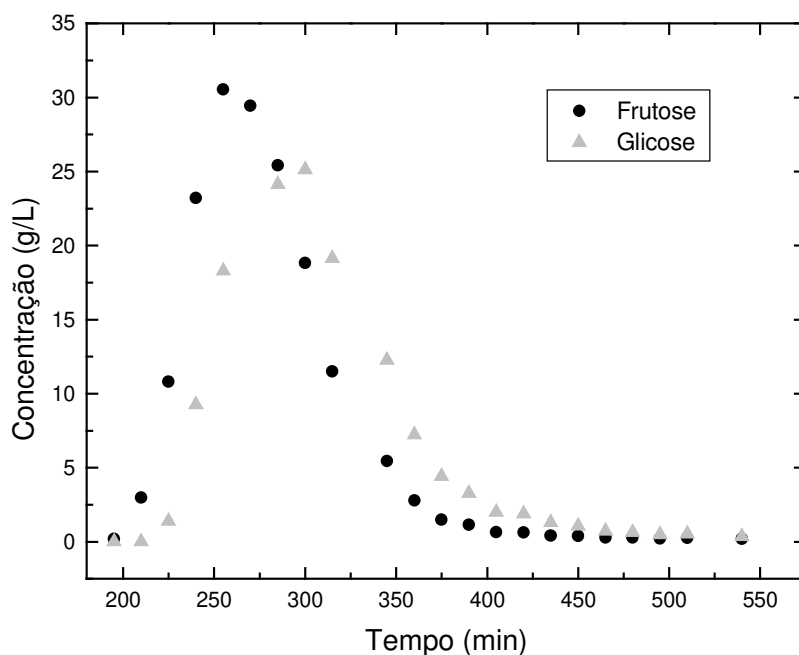


Figura 27: Separação de frutose e glicose com vazão de 0,1 mL/min.

Depreende-se da figura 27 que houve melhora na separação, sendo que a eficiência passou para 0,49, ou seja, obteve-se um aumento de 53% na separação. Entretanto, a separação ainda não é boa.

4.5.2 Separação frutose-glicose com duas colunas em série

Devido ao fato da utilização de uma só coluna não ter se mostrado eficiente passou-se, no experimento seguinte, a operar a separação com duas colunas idênticas, ligadas em série, com um pulso de 1 mL, vazão de 0,1 mL/min e 250 g/L de frutose e glicose. O resultado está mostrado na figura 28.

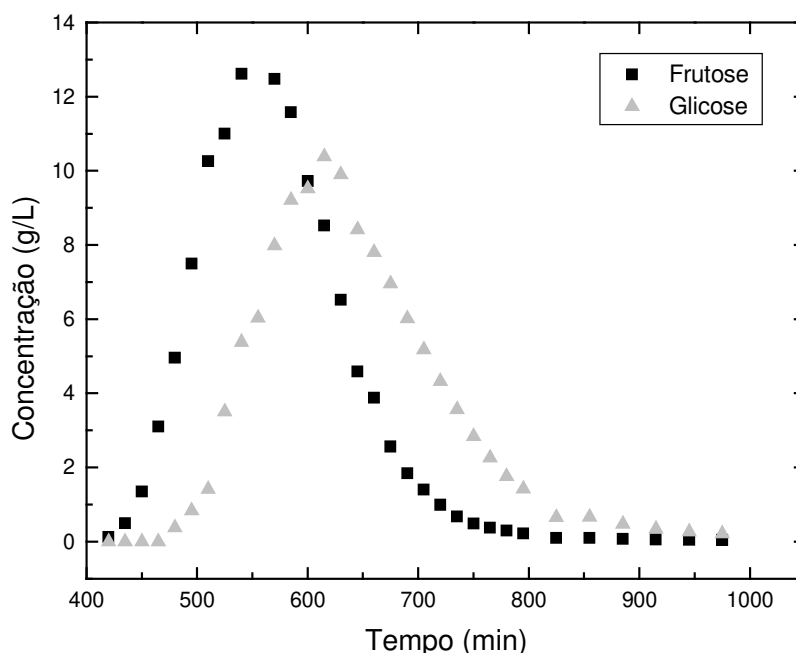


Figura 28: Separação de frutose e glicose utilizando-se 2 colunas em série.

A partir do gráfico da figura 28, a eficiência de separação foi calculada e obteve-se 0,97, que é aproximadamente 50% maior que a eficiência calculada quando se utilizou apenas 1 coluna cromatográfica. Desta forma, percebeu-se que aumentando o comprimento total de coluna, melhorou-se a separação dos açúcares, como era de se esperar.

4.5.3 Separação de frutose e glicose com três colunas em série

Neste experimento foi aumentado para três o número de colunas em série, mantendo-se a granulometria da zeólita, o volume do pulso e concentração de açúcares na mistura.

Neste experimento variou-se a vazão de alimentação das colunas para verificação do efeito da vazão na separação dos açúcares. As vazões foram ajustada para 0,1 mL/min, 0,15 mL/min e 0,20 mL/min. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 29, 30 e 31.

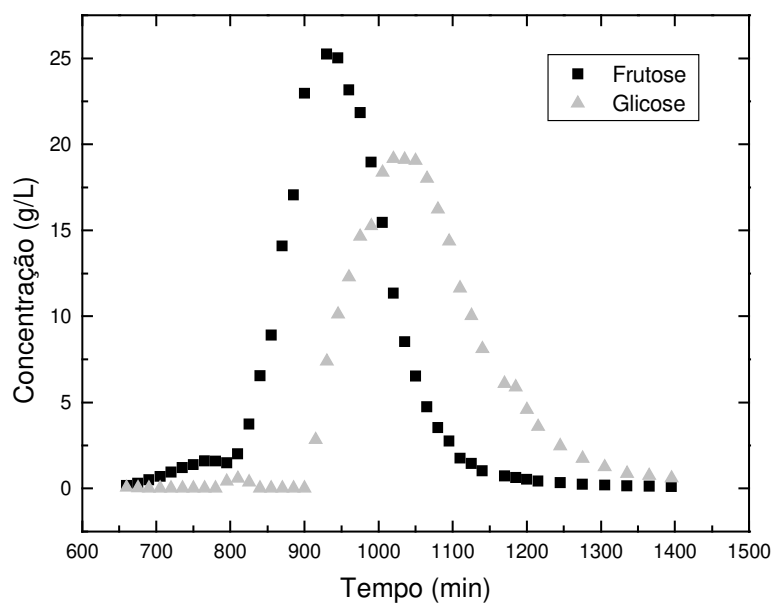


Figura 29: Separação de frutose e glicose com três colunas em série e vazão de 0,1 mL/min.

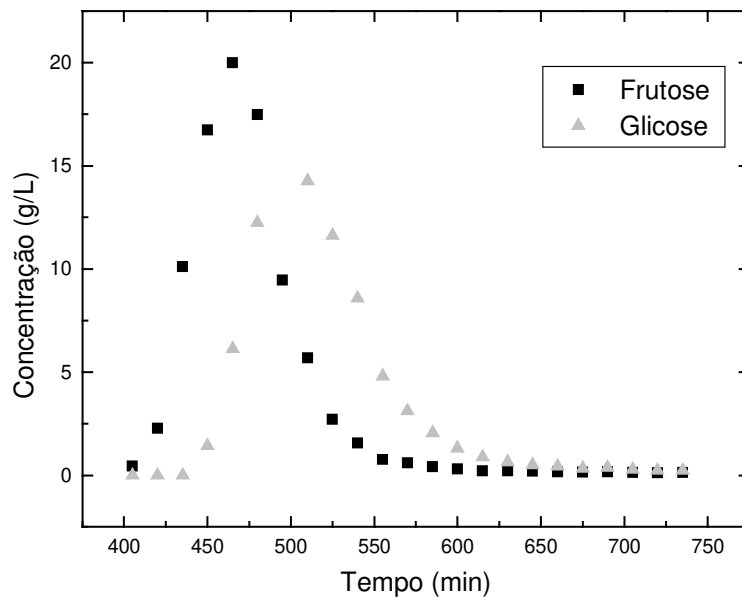


Figura 30: Separação de frutose e glicose com três colunas em série e vazão de 0,15 mL/min.

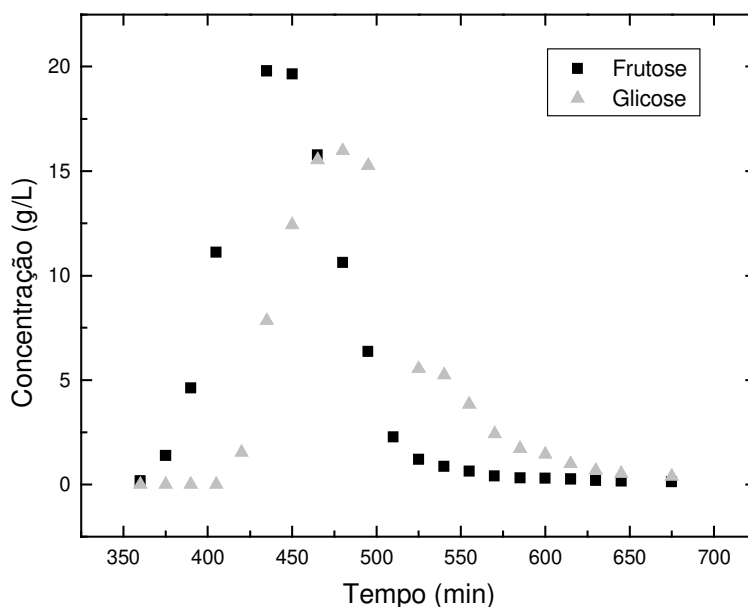


Figura 31: Separação de frutose e glicose com três colunas em série e vazão de 0,2 mL/min.

As eficiências de separação foram calculadas e estão mostradas na tabela abaixo.

Tabela 23: Eficiências de separação para diferentes vazões.

<i>Vazão (mL/min)</i>	<i>Eficiência de separação</i>
0,10	1,24
0,15	1,11
0,20	1,04

A separação frutose-glicose foi melhor com a vazão de 0,1 mL/min, como pode-se perceber pelas eficiências e como era esperado. Entretanto, os açúcares começam a aparecer na saída da terceira coluna a partir de 650 minutos do pulso dado, ou seja, quase 11 horas após o início do experimento, e as bandas prosseguem saindo da coluna por 24 horas. Com a vazão maior, de 0,20 mL/min, os açúcares terminam de sair da terceira coluna em 650 minutos (11 horas), o que mostra que neste caso a eluição dos açúcares na coluna cromatográfica é mais

rápida, mas a separação fica um pouco comprometida, com uma eficiência de 1,04.

Desta forma, resolveu-se fixar a vazão em 0,1 mL/min, já que a separação é melhor nesta condição.

4.5.4 Estudo da influência da concentração de açúcares

Como a resolução dos picos ainda não estava muito boa, decidiu-se por testar concentrações inferiores dos açúcares na mistura injetada no pulso. A concentração foi reduzida pela metade, ou seja, 125 g/L de frutose e glicose para verificação no efeito na eficiência de separação. Foram utilizadas três colunas com vazão do eluente de 0,1 mL/min e os resultados estão apresentados na figura 32.

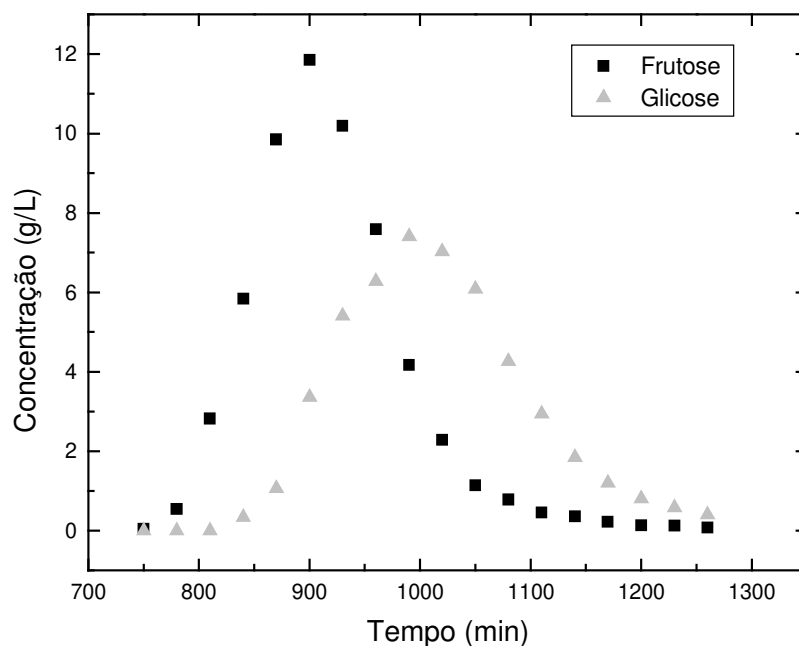


Figura 32: Separação de frutose e glicose com três colunas em série e concentração de açúcares no pulso de 125 g/L.

A eficiência foi calculada e obteve-se 1,27, ou seja, com a diminuição na concentração dos açúcares não se observou uma melhor separação, como seria

esperado. Tentou-se novamente reduzir a concentração pela metade, ou seja, 62,5 g/L de glicose e frutose e o experimento foi realizado com duas colunas em série, mantendo-se a vazão em 0,1 mL/min. A concentração de açúcares na saída da coluna foi medida e está mostrada na figura 33.

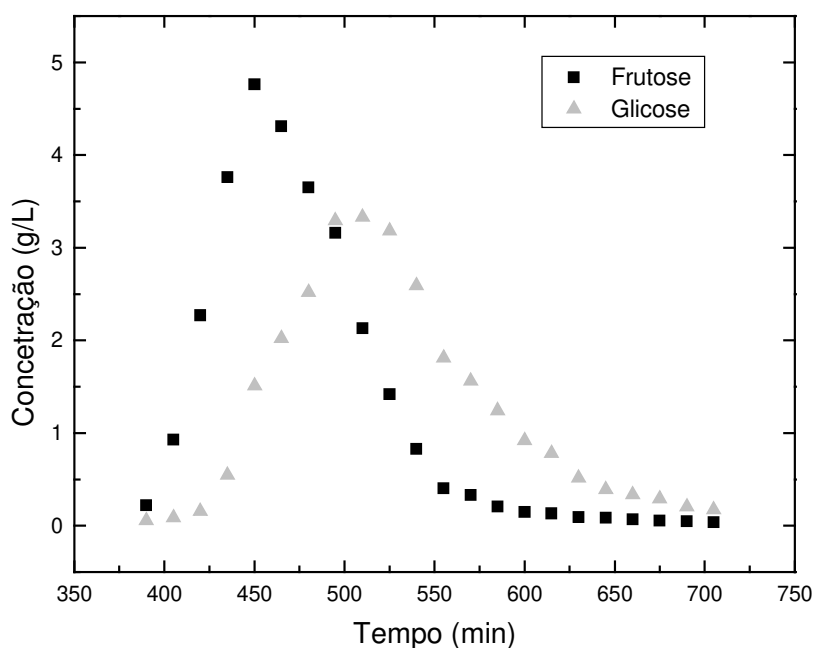


Figura 33: Separação de frutose e glicose com duas colunas em série e concentração de açúcares no pulso de 62,5 g/L.

A eficiência calculada foi de 1,05, um pouco maior que obtida com duas colunas e concentração de 250 g/L de frutose e glicose, que foi 0,97. Na figura 28 percebe-se que houve um maior espalhamento das bandas dos açúcares do que com uma concentração de 62,5 g/L, em que os açúcares terminaram de sair em aproximadamente 700 minutos (figura 33).

Como não foi notada uma significativa melhora na separação com a diminuição na concentração de açúcares no pulso, decidiu-se por manter em 250 g/L a concentração de frutose e glicose, que é a concentração na saída da coluna de hidrólise.

4.5.5 Modificação no eluente da coluna de separação de açúcares

Inicialmente o eluente foi modificado para etanol 5% (v/v) em água ultrapura e o teste preliminar foi realizado com uma coluna de 50 cm de altura por 1 cm de diâmetro, vazão de 0,1 mL/min e 250 g/L de frutose e glicose. A seguir aumentou-se para 10 e 15% de etanol a concentração no eluente e os resultados estão apresentados nas figuras 34, 35 e 36 e na tabela 24.

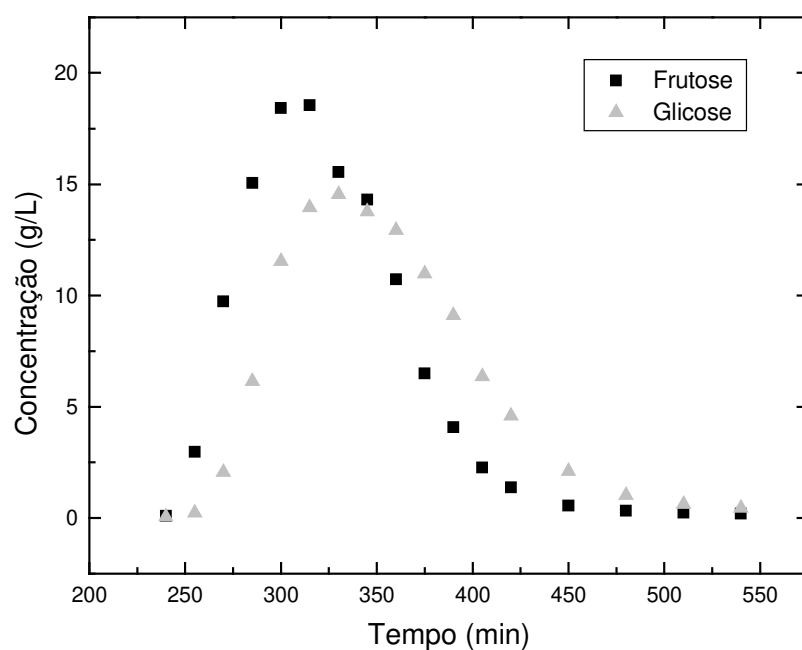


Figura 34: Separação de frutose e glicose com eluente etanol 5%.

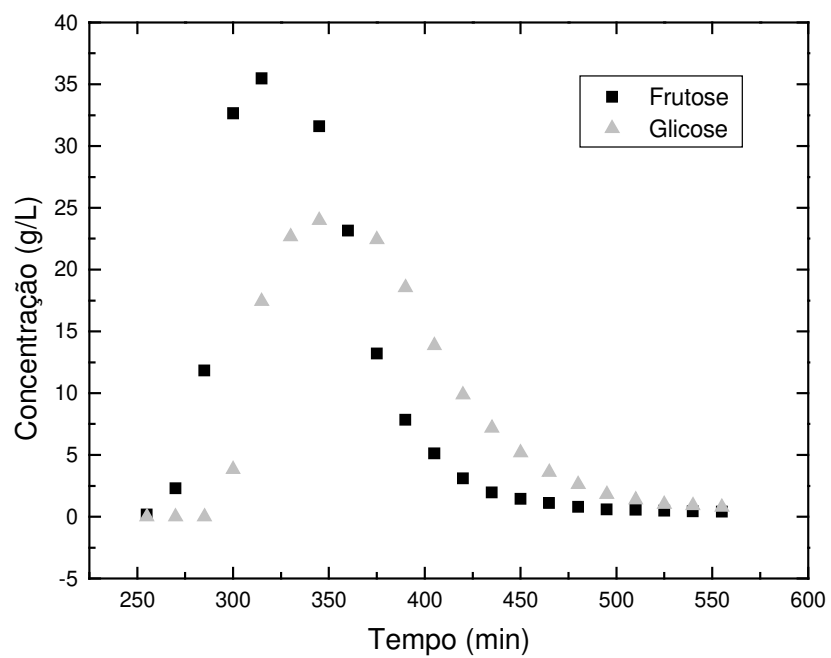


Figura 35: Separação de frutose e glicose com eluente etanol 10%.

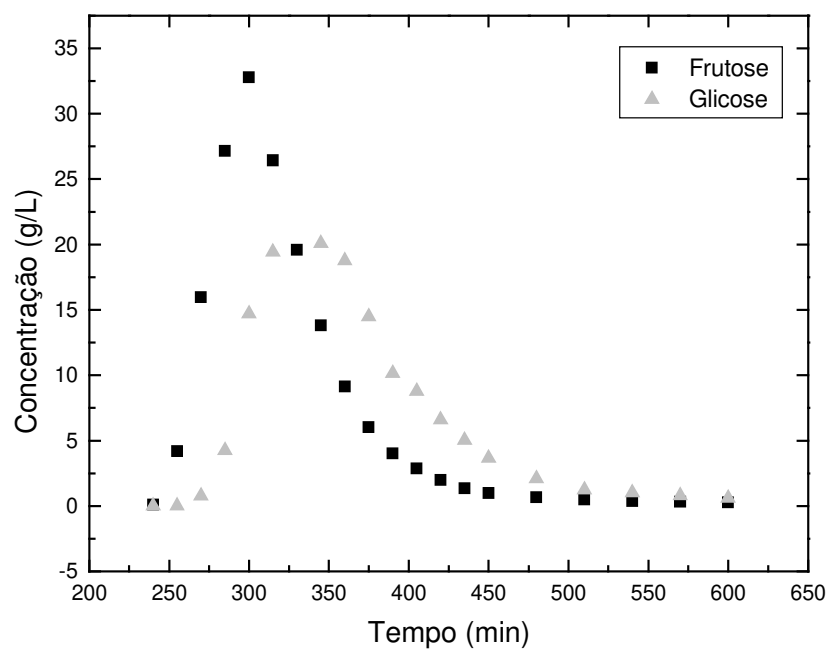


Figura 36: Separação de frutose e glicose com eluente etanol 15%.

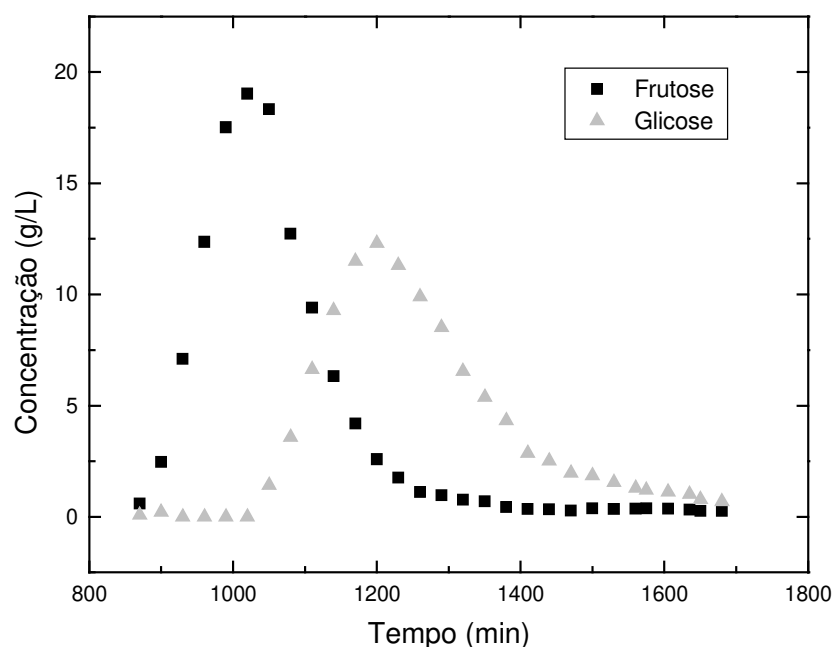
Tabela 24: Eficiências de separação utilizando-se diferentes tipos de eluente.

<i>Eluente</i>	<i>Eficiência de separação</i>
Água	0,49
Etanol 5%	0,65
Etanol 10%	0,79
Etanol 15%	0,95

Como se nota pela tabela 24, o aumento na concentração de etanol melhora bastante a separação entre a frutose e a glicose, chegando quase a duplicar a eficiência de separação. Desta forma, o melhor eluente para a separação de frutose e glicose em coluna de zeólita é o etanol 15%.

4.5.6 Estudo da separação com três colunas em série e eluente etanol 15%

Como o eluente etanol 15% apresentou melhor separação da frutose e glicose, tentou-se aumentar o número de colunas em série para três, aumentando assim a eficiência de separação. O volume total das três colunas é de 117,9 cm³ e o pulso dado é de 1 ml. Desta forma, o pulso é de 1,18 % do volume total da coluna. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 37.

**Figura 37:** Separação de frutose e glicose com três colunas em série e eluente etanol 15%.

Como é possível perceber pela figura 37 a separação foi bastante satisfatória, já que obteve-se algumas frações de frutose com alto grau de pureza. A eficiência da separação foi calculada, e é de 1,62.

A partir do volume recolhido em cada fração e da concentração obtida da fração pela cromatografia de íons Dionex, calculou-se a massa de frutose presente. Com isso foi possível calcular a porcentagem de frutose que sai praticamente pura, o que ocorreu até o tempo de 1020 minutos. A massa total recuperada de frutose na coluna cromatográfica foi de 0,243 g e a massa recuperada até os 1020 minutos foi de 0,155 g. Assim, a recuperação de frutose pura foi de 63,5%. O restante da frutose saiu em uma mistura com glicose, sendo que a glicose não apresentou nenhuma fração praticamente pura.

Esta foi a melhor separação obtida dentre os experimentos realizados e por isso foi a condição selecionada para operação do sistema de duplo estágio compreendendo a hidrólise da sacarose e separação de frutose e glicose.

4.6 Dimensionamento de um sistema duplo de hidrólise e separação acoplados

O dimensionamento do sistema duplo estágio, compreendendo a hidrólise da sacarose em leite com inulinase imobilizada e a separação da glicose e frutose em colunas cromatográficas contendo zeólita Y, será feito com base na ampliação de escala do sistema de separação, de modo a compatibilizar os fluxos dos dois estágios.

Levando-se em conta a operação otimizada da coluna de hidrólise, a coluna deve ter as dimensões de 37 cm de altura e 2 cm de diâmetro e estar preenchida com 105 ml de cápsulas de inulinase imobilizada. A atividade inicial das cápsulas deve ser de no mínimo 10 UI/ml, e a vazão para se obter a hidrólise total da sacarose é de 0,06 ml/min, resultando em um tempo de residência de 6,2 horas.

A operação otimizada da coluna cromatográfica consiste da utilização de três colunas em série de 50 cm de altura por 1 cm de diâmetro, resultando em um volume total de 117,9 cm³. O eluente utilizado na coluna deve ser etanol 15%, para obtenção de frações praticamente puras de frutose, como descrito no item 4.5.6. A eluição completa de um pulso de 1 mL na coluna cromatográfica leva 1700 minutos, e o volume do pulso corresponde a 1,18% do volume total da coluna.

Em 1700 minutos, que é o ciclo de operação da coluna cromatográfica, o volume total que sai da coluna de hidrólise é de 102 mL, já que a vazão na coluna é de 0,06 mL/min.

Considerando-se um pulso de 102 mL, o volume total da coluna para eluir tal pulso seria de 5667 mL, já que o pulso corresponde a 1,18% do volume total das colunas. Dividindo-se este volume por três, pois tem-se 3 colunas em série, obtém-se um volume de 1889 cm³ por coluna. Para o dimensionamento das colunas cromatográficas considerou-se uma altura máxima de 75 cm, para que seja fácil de manusear e fixar as colunas na bancada.

Com estas dimensões fixadas para as colunas em série, foi possível calcular o diâmetro necessário de cada uma, para eluição do pulso de 102 mL, sendo este de 5,66 cm.

Portanto, para operar o sistema duplo estágio unindo os dois processos estudados neste trabalho e obter frações relativamente puras de frutose, são necessárias 3 colunas de 75 cm de altura e 5,66 cm de diâmetro. A montagem experimental deste sistema deve ser realizada conforme esquematizado na figura 38.

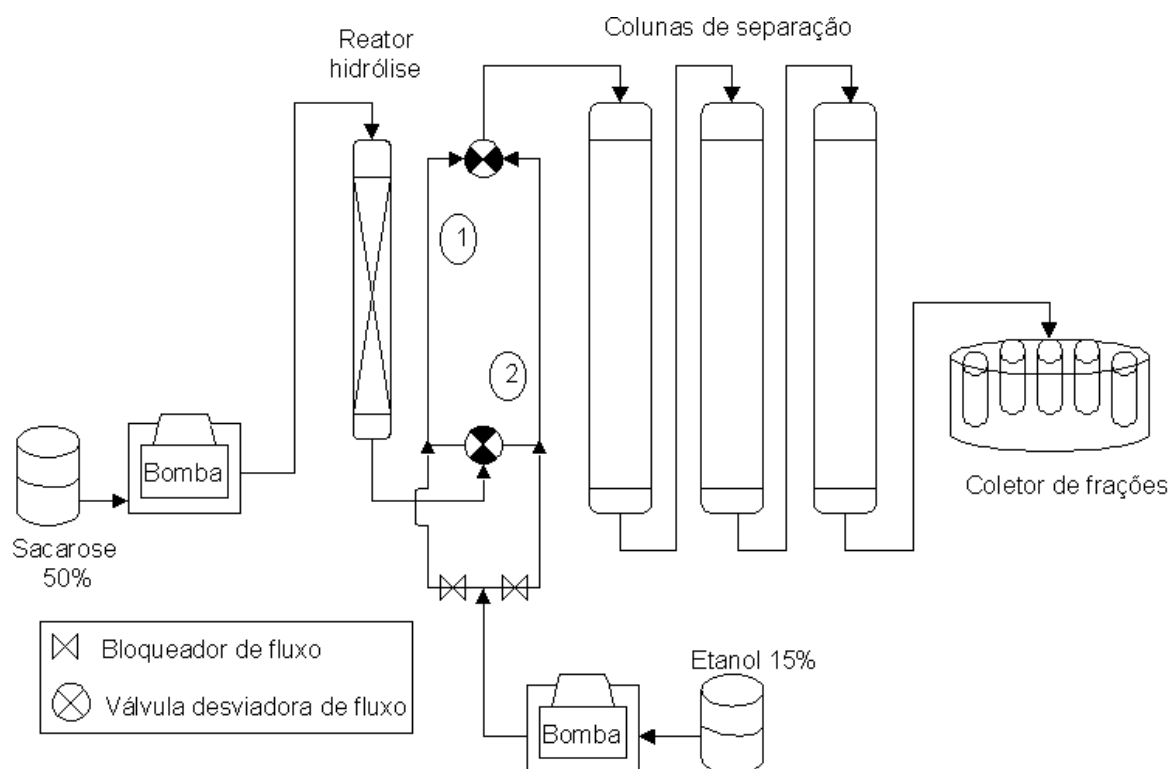


Figura 38: Montagem experimental do sistema duplo estágio.

A coluna de hidrólise opera enviando a solução de glicose e frutose para encher o *loop* contendo o pulso de 102 mL (caminho 1 ou 2 na figura), que é o volume de solução de glicose e frutose processado durante um ciclo de operação da coluna de separação cromatográfica, ou seja, 1700 minutos. Ao final do enchimento de um destes loops, através de válvulas que modificam o fluxo, o conteúdo é injetado em forma de pulso nas colunas de separação cromatográfica dimensionadas anteriormente, e a eluição total deste pulso é feita em um ciclo de 1700 minutos, como determinado experimentalmente neste trabalho. Enquanto este primeiro pulso (caminho 1) é injetado na coluna cromatográfica para separação da glicose e frutose, o segundo *loop* (caminho 2) com o mesmo volume de 102 mL é preenchido com a saída da coluna de hidrólise. Ao completar o enchimento do segundo *loop*, que é exatamente o tempo do ciclo da coluna de separação, modifica-se novamente o sentido do fluxo para injetar este pulso contido no segundo *loop*, iniciando o enchimento do primeiro *loop*, e assim

sucessivamente. O processo operado desta forma passa a ser contínuo, apesar da eluição da coluna cromatográfica ser feita na forma de pulso.

A vazão de operação da coluna cromatográfica com a ampliação de escala também tem que ser recalculada, de maneira a se manter a velocidade superficial do experimento realizado neste trabalho. No experimento, a vazão estudada foi de 0,1 mL/min e o diâmetro da coluna foi de 1 cm, o que resulta em uma velocidade de 0,13 cm/min. Mantendo-se esta velocidade superficial na ampliação de escala para o novo diâmetro de 5,66 cm, a vazão correspondente é de 3,27 mL/min.

As condições de operação da coluna cromatográfica na ampliação de escala para operação do sistema duplo estágio estão resumidas na tabela 25.

Tabela 25: Dimensionamento das colunas cromatográficas para utilização no sistema duplo estágio.

<i>Número de Colunas</i>	<i>Altura de cada coluna (cm)</i>	<i>Diâmetro de cada coluna (cm)</i>	<i>Vazão de operação (mL/min)</i>
3	75	5,66	3,27

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho buscou-se estudar um processo de baixo custo e com boa eficiência para a produção de glicose e frutose a partir da sacarose. Para isso, foi feita a caracterização da enzima inulinase de *K. marxianus var bulgaricus* ATCC 16045 na forma imobilizada em carvão ativado, a seleção da melhor condição para operação de um leito fixo contendo a inulinase imobilizada para a conversão da sacarose, o estudo da separação da glicose e frutose em coluna cromatográfica contendo zeólitas Y e o dimensionamento de um sistema de operação duplo estágio, compreendendo a hidrólise da sacarose e separação da glicose e frutose. As conclusões estão apresentadas a seguir:

A atividade de inulinase ao final de 72 horas de fermentação em reator BioFlo III foi alta, de 334,1 UI/mL. A recuperação enzimática foi feita com etanol e mostrou-se bastante satisfatória com uma eficiência de 69%. A enzima mostrou-se estável ao longo do período de armazenamento em geladeira, visto que com 4 meses de estocagem a inulinase livre perdeu aproximadamente 38% de sua atividade original.

A caracterização foi feita com inulinase imobilizada em alginato de cálcio e carvão ativado e a atividade não apresentou variação significativa na faixa de pH estudada, partindo-se de 50 ou 100 UI/mL de enzima livre. Já a temperatura ótima é de 60°C para a enzima livre de partida de 100 UI/mL e de 65°C, para a de 50 UI/mL e as energias de ativação calculadas para os dois casos foram de 10,878 e 10,929 kcal/mol respectivamente. A partir do estudo de estabilidade da inulinase imobilizada foi possível determinar as constantes de desnaturação em diferentes temperaturas e com isso a meia-vida. Para a temperatura de 50°C, a meia-vida experimental foi de 11,1 dias, muito superior ao obtido para a inulinase em outras condições de imobilização ou na forma livre. Isto mostra que a imobilização em carvão ativado pode ser uma alternativa interessante para obtenção da inulinase mais estável ao longo do tempo. Com os valores da constante de desnaturação

obtidos experimentalmente foi possível obter um modelo de ajuste aos dados e com isso calculou-se a temperatura de operação de um leito contendo inulinase imobilizada. A temperatura de processo para a inulinase imobilizada em carvão ativado é de 43°C, sendo que a atividade enzimática nesta temperatura é de 3,6 UI/mL, e o tempo de meia vida calculado é de 40 dias.

A etapa seguinte do trabalho foi otimizar a coluna de hidrólise de sacarose 50% (500 g/L) contendo a inulinase imobilizada, utilizando-se para isto as condições de operação obtidas da caracterização, ou seja, pH 4,8 e temperatura 43°C. Foram testados diferentes leitos contendo a inulinase imobilizada, mas a condição que se obteve alta taxa de hidrólise da sacarose foi em um leito contendo 105 mL de enzima imobilizada, com 37 cm de altura e 2 cm de diâmetro. A vazão otimizada para operação da coluna foi de 0,06 mL/min, resultando em um tempo de residência de 6,2 horas. Nestas condições de operação, o leito catalítico apresentou alta conversão da sacarose, de aproximadamente 98%, e o tempo para a queda da atividade a 25% da atividade inicial foi determinado experimentalmente e é de 148 dias, ou seja, aproximadamente 5 meses, em contraste ao determinado inicialmente, para a inulinase imobilizada, na temperatura de 43°C, que foi de 80 dias. Esta diferença deve ter ocorrido porque a inulinase não estava em contato com o substrato, como na operação do leito de hidrólise. Esta alta estabilidade da inulinase obtida é interessante do ponto de vista industrial, visto que é possível se pensar em grandes tempos de campanha sem necessidade de trocas constantes do biocatalisador.

A seguir, selecionou-se a melhor condição para a separação da glicose e frutose obtidos do leito de hidrólise. A condição em que se obteve melhor separação para a concentração de 250 g/L de glicose e de frutose, foi utilizando-se 3 colunas em série e etanol 15% como eluente. O volume total das três colunas é de 117,9 cm³ e o pulso dado é de 1 mL. Nestas condições, obteve-se frações de frutose com alto grau de pureza, obtendo-se 63,5% da frutose injetada no pulso praticamente pura na saída das colunas cromatográficas, e a eficiência da

separação foi de 1,62. Com estas condições otimizadas de separação é possível se pensar na operação do sistema duplo estágio, compreendendo a hidrólise da sacarose e separação de glicose e frutose para obtenção de frações puras destes açúcares.

Para operação do sistema duplo estágio, realizou-se o dimensionamento das colunas de separação em função da coluna de hidrólise, de maneira a se obter um processo operando continuamente, embora a etapa de separação seja descontínua. O dimensionamento das colunas de separação de glicose e frutose foi feito para as condições otimizadas. Para o processo global, foram dimensionadas 3 colunas para a separação da frutose e glicose, com 75 cm de altura, diâmetro de 5,66 cm e vazão de eluição de 3,27 mL/min. O eluente é o etanol 15%. Nestas condições, espera-se obter separação equivalente àquela do experimento em escala reduzida.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros, pode-se pensar em realizar a operação de um leito móvel simulado (Simulated Moving Bed - SMB), para a produção de frutose e glicose partir da sacarose, seguida da separação no SMB, a partir dos resultados obtidos neste trabalho. O leito móvel simulado, por ser um processo de separação contínuo, apresenta maior recuperação do produto desejado e maior produtividade, necessária a processos com potencial industrial.

Estudos complementares podem ser realizados, como a seleção de um eluente capaz de melhorar a eficiência de separação de frutose e glicose. Isto pode ser feito aumentando-se, por exemplo, a concentração de etanol, visto que neste trabalho foi observado que o aumento na concentração de etanol, de 5 para 10 e posteriormente para 15% aumentou a eficiência de separação entre a frutose e glicose.

7. BIBLIOGRAFIA

ARRUDA, L. M., VITOLO M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Applied Biochem Biotechnology*, v. 81, p. 23-33, 1999.

AZEVEDO, D. C. S.; RODRIGUES, A. E. Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for inversion of sucrose and sucrose-fructose separation, *Chemical Engineering Journal*, v. 82, p. 95-107, 2001.

BABEL, S.; KURNIAWAN, T. A. Low cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *Journal of Hazardous Materials*, B97, p. 219-243, 2003.

BADILLO-ALMARAZ, V.; TROCELLIER, P.; DAVILA-RANGEL, I. Adsorption of aqueous Zn(II) species on synthetic zeolites. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 2003.

BAYLEY, J. E. & OLLIS, D. F. – *Biochemical Engineering Fundamentals* – 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1986.

BESTE, Y. A.; LISSO, M.; WOZNY, G.; ARLT, W. Optimization of simulated moving bed plants with a low efficient stationary phase: separation of fructose and glucose. *Journal of Chromatography A*, v. 868, p. 169-188, 2000.

BHATIA, S. *Zeolite catalysis: Principles and applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1946.

BRECK, D. W. *Zeolite molecular sieves: structure, chemistry and use*. New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 771, 1974.

BURKERT, C. A. V. Separação de glicose, frutose e oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas, Dissertação de Doutorado, FEA, Unicamp, 2003.

BROCKLEBANK, M. P. Downstream processing plant and equipment. In ASENJO, J. A. Separation processes in biotechnology. New York; Marcel Dekker Inc., p. 617-740, 1990.

BUTTERSACK, C.; LAKETIC, D. Hydrolysis of Sucrose by Dealuminated Y-Zeolites. Journal of Molecular Catalysis. v. 94, n. 3, p. 283-290, dec., 1994.

BUTTERSACK, C.; WACH, W.; BUCHHOLZ, K. Specific adsorption of saccharides by dealuminated Y-zeolites. The Journal of Physical Chemistry, Washington, v. 97, n. 46, p. 11861-11864, nov. 18, 1993.

CAVENAGHI, M.E; MAUGERI, F. Estudo da recuperação de frutose produzida em síntese enzimática “in vitro” de dextrana. XII Simpósio Nacional de Fermentações.

CONTIEIRO, J. Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*, Tese de doutorado, FEA UNICAMP, 1992.

COSTA, F. A. A. Contribuição ao estudo de produção de invertase extracelular por leveduras, Dissertação de Mestrado, FEA UNICAMP, 1986.

CHENG, Y. L.; LEE, T. Y. Separation of fructose and glucose mixture by zeolite Y. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 40, n. 4, p. 498-504, aug. 5, 1992.

CHING, C. B.; HIDAJAT, K.; RUTHVEN, D. M. Experimental study of simulated counter-current adsorption system – V. Comparison of resin and zeolite absorbents for fructose-glucose separation at a high concentration. Chemical Engineering Science, Oxford, v. 42, n. 11, p. 2547-2555, 1987.

DI LUCIO, M.; SMITH, B. D.; KIDA, T.; BORGES, C. P.; ALVES, T. L. M. Separation of fructose from a mixture of sugars using supported liquid membranes. *Journal of Membrane Science*, v.174, p. 217-234, 2000.

DURAND; GERMAIN-ROBERT; FAUGERAS; PIERRE; LAPORTE; MOREAU; CLAUDE; NEAU; MARIE-CLAUDE; ROUX; GABRIEL. Method and apparatus for making a pure simple sugar solution by hydrolysing at least one compound sugar in the presence of a selective adsorbent. United States Patent, 5,888,306, mar., 1999.

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

FARINE, S.; VERSLUIS, C.; BONNICI, P. J.; HECK, A.; L'HOMME, C.; PUIGSERVER, A.; BIAGINI, A. Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 55, n. 1, p. 55-60, jan., 2001.

FLANIGEN, E. M. Zeolites and molecular sieves: an historical perspective. In: VANBEKKUM, H.; FLANINGEN, E. M.; JANSEN, J. C. Introduction to zeolite science and practice: studies in surface science and catalysis. Amsterdam: Elsevier, 1991, v. 58, chap. 2, p. 13-33.

GHIM, Y. S.; CHANG, H. N. Adsorption characteristics of glucose and fructose in ion-exchange resin columns. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, Washington, v. 21, n. 4, p. 369-374, nov., 1982.

GUPTA, A. N.; DAVINDER, P. S.; KAUR, N.; SINGH, R. – Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1994.

GUPTA, A. K., BATHIA, I. S. Glucofuctosan biosynthesis in frutarian oxysporum, Phytochemistry, v.19, 2557-2563, 1980.

GUPTA, A.; GAUR, V; VERMA, N. Breakthrough analysis for adsorption of sulfur-dioxide over zeolites. Chemical Engineering and Processing, v.0, p.1-14, 2003.

GROOTWASSINK, J. W. D.; FLEMING, S. E. Nonspecific beta-fructofuranosidase (inulase) from *Kluyveromyces fragilis* – batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. Enzyme and Microbial Technology, v. 2, n.1, p. 45-53, 1980.

HASHIMOTO, K.; ADACHI, S.; NOUJIMA, H.; MARUYAMA, H. Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber. Journal of Chemical Engineering of Japan, v. 16, n. 5, oct., 1983.

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

HO, C.; CHING, C.; RUTHVEN, D. M. A comparative study of zeolite and resin adsorbents for the separation of fructose-glucose mixtures. Industrial Engineering Chemistry Research, Columbus, v. 26, n. 7, p. 1407-1412, 1987.

HOHNERLEIN, Jr.; OTTO, G.; SMITH, Jr.; WILLIE, E.; NICHOLAS, T. – Direct production of a pure sugar product from cane juice. – United States Patent 4,332,622 1982.

JORGENSEN, T. C.; WEATHERLEY, L.R. Ammonia removal from wastewater by ion exchange in the presence of organic contaminants, *Water Research*, v.37, p.1723-1728, 2003.

KÄRGER, J.; RUTHVEN, D. M. Diffusion in zeolites: and other microporous solids. New York: John Willey & Sons, Inc., p. 605, 1991.

KENNEDY, J. F. & CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization – in *Biotechnology* v. 7a, ed REHM, H. J. & REED, G., VCH Publishers, New York, 1987.

KIM, C.H; RHEE, S.K. Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. *Biotechnology Letters*, v. 11, p. 201-206, 1989.

KISHIHARA, S.; FUJII, S.; TAMAKI, H.; KIM, K. B.; WAKIUCHI, N.; YAMAMOTO, T. Continuous chromatographic separation of sucrose, glucose and fructose using a simulated moving-bed adsorber. *International Sugar Journal*, v. 94, n. 1128, p. 305-308, dec., 1992.

KLATT, K. U. ; HANISCH, F. ; DÜNNEBIER, G. Model-based control of a simulated moving bed chromatographic process for the separation of fructose and glucose. *Journal of Process Control*, v.12, p. 203-219, 2002.

KRASTANOV, A. Continuous sucrose hydrolysis by yeast cells immobilized to wool. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 47, n. 5, p. 476-481, may, 1997.

KULPRATHIPANJA, S.; NEUZIL, R. W. Zeolite molecular sieve adsorbent for an aqueous system. United States Patent, 4,372,876, 1983.

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.

LEE, H. Applied aspects of zeolite adsorbents. In: MEIER, W. M.; UYTTERHOEVEN, J. B. Editors. Molecular sieves: The third international conference co-sponsored by the Eidgenossische Technische Hochschule and the Swiss Chemical Society at Zurich, Switzerland. Washinton, D. C: American Chemical Society, 1973, chap. 2, p. 311-318 (Advances in chemistry Series: 121).

LU, T.S.; LEE, T.Y. Separation of diethylbenzene isomers by column adsorption and desorption. Industrial Engineering Chemistry Research, Columbus, v.26, n.10, p. 2024-2028, 1987.

MACHADO, M. Separação de glicose e frutose com o uso de zeólitas. Relatório Científico, Fapesp, 2002.

MAKINO, Y.; SCAVINI, H. F. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Produção e caracterização da inulinase obtida pela levedura *Kluyveromyces*, Anais do 4º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos – SLACA, 12-15 novembro 2001.

MATIJASEVIC, L.; VASIC-RACKI, D. Separation of glucose/fructose mixtures: counter-current adsorption system. Biochemical Engineering Journal, v. 4, n. 2, p. 101-106, jan., 2000.

MESSING, R. A. Carriers in immobilized enzymes for industrial reactors. Ed. MEESING, R. A., New York, Academic Press, 1978.

MIYAHARA; AKIMITSU; SAKAI; SIGEO; MATSUDA; KUNIAKI. – Method for the separation of glucose and fructose – United States Patent 4,472,203; 1984.

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

MONSAN, P. Enzyme-catalyzed reactions in concentrated sucrose solutions - hydrolysis and transfer. *Zuckerindustrie*. v. 120, n. 8, p. 705-707, aug., 1995.

MOREAU, C.; DURAND, R.; ALIES, F.R.; COTILLON, M.; FRUTZ, T.; THEOLEYRE, M. A. Hydrolysis of sucrose in the presence of H-form zeolites. *Industrial Crops and Products*, v. 11, p. 237-242, mar., 2000.

MOSCOU, L. The zeolite scene. In: VANBEKKUM, H.; FLANIGEN, E. M.; JANSEN, J. C. *Introduction to zeolite science and practice*. Amsterdam: Elsevier, v. 58, chap. 1, p. 1-12, 1991.

NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S; MATSUO, T.; SUIKO, M.; OHTA, K. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, n.4, 313-318, 1997.

OSBERGER, T. F. Crystalline fructose. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. *Alternative sweeteners*. New York; Marcel Dekker Inc., 1991, p. 219-246.

ODAWARA, H.; NOGUCHI, Y. Separation of fructose from a mixture of sugars. *United States Patent*, 4.014.711, 1977.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, N.; FONTANA, J. D. Recent development in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications. *Applied Biochemical Biotechnology*, v. 81, p. 35-52, 1999.

PESSOA JR, A.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture médium composition and enzyme extration, Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.16, n.3, 1999.

PETER; PETER, J. H.; KERKHOOF; PIETER, L. Preparation and immobilization of inulinase United States Patent, 4,397,949, 1983.

POORNA, V. & KULKARNI, P. R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. Bioresource Technology, 1995.

QUINN, Z. K.; CHEN, X. D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. Journal of Food Engineering, v.48, p. 69-74, 2001.

RUTHVEN, D. M. Principles of adsorption and adsorption processes. New York, John Willey & Sons, Inc., p. 433, 1984.

SAITO, T.; YOSHIDA, Y.; KAWASHIMA, K.; LIN, K. H.; INAGAKI, H.; MAEDA, S.; TOBAYASHI, T. Influence of aldehyde groups on the thermostability of na immobilized enzyme on an inorganic support. Materials Sciense and Engineering, p. 149-152, 1997.

SILVA-SANTISTEBAN, B.O.Y. Efeito da agitação e da aeração na produção de inulinase em processo batelada simples por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, Dissertação de mestrado, FEA, Unicamp, 2001.

SANTOS, A. M. P. Produção de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*, Dissertação de mestrado, FEA, Unicamp, 1998.

SANTOS, A. M. P. Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, Dissertação de doutorado, FEA, Unicamp, 2002.

SELAMPINAR, F.; AKBULUT, U.; OZDEN, M.Y. Immobilization of invertase in conducting polymer matrices. *Biomaterials*, v.18, p. 1163-1168, 1997.

SCHNEIDER, A. L. S. Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Tese de mestrado, FEQ, UFSC, 1996.

SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W. D.; GLÄSER, B. Liquid-phase adsorption of monosaccharide-water mixtures on X and Y zeolites. *Journal of Chemical Society -Faraday Transactions*, Cambridge, v. 89, n.11, p. 1871-1876, jun., 1993.

SILVA, C. F. Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose. Campinas, 1998. 96 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, C. F.; MACHADO, N. R. C. F.; MAUGERI FILHO, F. Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose. *Ciência & Engenharia*, ano 7, n.2, p.12-15, jul-dez., 1998.

THRESHER, J. S.; PODOLIN, D. A.; WEI, Y. R. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *American Journal of Physiology*, v. 4, p. 1334-1340, oct., 2000.

TREICHEL, H. Estudo de meios industriais para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*, Dissertação de mestrado, FEA, Unicamp, 2001.

TU; HOSHENG; ROJO; JUANA, E. – Process for use of a zeolite molecular sieve adsorbent in an aqueous system – United States Patent 4,345,946; 1982.

VANDAMME, E. J. & DERYCKE, D. G. Fermentation process, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 29:139-176, 1983.

VENKATASUBRAMANIAN; KALYANASUNDRAM; JAIN; SURENDAR, M.; GIUFFRIDA; ANTHONY, J. – Process for the preferential separation of fructose from glucose – United States Patent, 4,299,677; 1981.

XIAO, R.; TANIDA, M.; TAKAO, S. Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 67, 5, 331-334, 1989.

WENLING, W.; HUIYING, W. W. L; SHIYUAN, W. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85, v.34, p. 643-646, 1999.