REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0401146-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0401146-5

(22) Data do Depósito: 17/03/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 07/03/2006

(51) Classificação Internacional: C12P 19/02; C12N 11/06; C12N 11/10; C12N 9/24.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FRUTOSE PURA E XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SACAROSE

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. CGC/CPF: 46068425000133. Endereço: Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, BRASIL(BR)

(72) Inventor: FRANCISCO MAUGERI FILHO; CLARISSA MÜLLER LORENÇO FORESTI; HELEN TREICHEL; MARIA ISABEL RODRIGUES.

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 27/11/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 27/11/2018

Assinado digitalmente por:
Alexandre Gomes Ciancio
Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FRUTOSE PURA E XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SACAROSE".

O presente invento mostra um processo de produção de frutose a partir de uma mistura de açucares contendo frutose e glicose, ou açúcar invertido obtido a partir da hidrólise de sacarose, utilizando um bioreator contendo a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* imobilizada.

A sacarose, adoçante obtido a partir da cana-de-açúcar ou de beterraba é o mais importante dos açúcares devido a sua abundância na natureza e importância na alimentação humana. A sacarose é constituída de uma molécula de glicose e uma de frutose, e pode ser facilmente hidrolisada química e enzimaticamente. 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 glicose pode ser preparada comercialmente a partir do amido e por hidrólise ácida da sacarose. A frutose pode ser preparada pela hidrólise da inulina, a partir da dextrose e enzimaticamente a partir da sacarose (U.S. Pat. No. 2,729,587).

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. Além disso, pode substituir a sacarose, já que esta é responsável por agravar problemas de obesidade, arteriosclerose e diabetes. 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.

13

A hidrólise química da sacarose pode ser feita com ácido, e é um método simples, porém apresenta o inconveniente de provocar a caramelização e o produto resultante não é cristalino, além de conter substâncias tóxicas (hidroximetil furfural). Já a aplicação biotecnológica de enzimas é vantajosa frente a processos físico-químicos visto que não necessita de condições drásticas de temperatura e pressão, além de reduzir drasticamente a formação de subprodutos indesejáveis.

A hidrólise enzimática para obtenção de xaropes de açúcar invertido pode ser realizada com a utilização de microrganismos com genes modificados imobilizados, como descrito na patente U.S.Pat No 5,270,177. São alcançadas altas taxas de conversão de sacarose com a utilização de um bioreator e pela modificação de tempo de residência no leito.

As inulinases são 2,1-ß-D frutohidrolases que convertem inulina à frutose e são obtidas de tubérculos e raízes de plantas ou através de microrganismos. A atividade de inulinase é encontrada em uma grande variedade de fungos, leveduras e bactérias. Alguns microrganismos produtores de inulinase são *Kluyveromyces marxianus var. fragilis, Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus, Saccharomyces fragilis, Fusarium oxysporum, Aspergilus niger*. A produção e imobilização da inulinase de *Aspergillus phoenicis* para utilização industrial é descrita na patente U.S.Pat No 4,397,949.

Observou-se que as leveduras, principalmente do gênero *Kluyveromyces* apresentam uma melhor produtividade de inulinase, além do processo de obtenção ser de baixo de custo. Estas leveduras pertencem ao grupo GRAS e são liberadas para utilização em alimentos pelo FDA americano.

A segunda etapa do processo de separação da glicose e frutose, pode ser feita de várias maneiras: membranas de troca iônica; cromatografia em coluna empacotada com resina; leito móvel simulado; adsorção em zeólitas X e Y.

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, com desempenho similar às resinas de troca iônica comumente utilizadas, com a vantagem de apresentarem menor custo. Devido às propriedades adsortivas e ao conhecimento da estrutura e composição, as zeólitas podem ser utilizadas na recuperação de açúcares.

A seguir faz-se referência às Figuras e Tabelas que acompanham este relatório descritivo, para melhor entendimento e ilustração do mesmo, onde se vê:

A Figura 1 mostra, um esquema simplificado dos processos de hidrólise e separação, constando dos dispositivos principais; sendo (1) o Reservatório de solução de sacarose; (2) as Bombas; (3) a Coluna de hidrólise; (4) os Tanques de espera; e (5) as Colunas de separação

A Figura 2 mostra, a Atividade enzimática ao longo do tempo de estocagem.

A Figura 3 mostra, a Comparação entre a meia vida da inulinase imobilizada em alginato e em alginato com carvão ativado e glutaraldeido.

A Figura 4 mostra, a Concentração de açucares na saída da coluna de hidrólise com tempo de residência 6,2 horas.

A Figura 5 mostra, a Concentração na saída da coluna de hidrólise ao longo do tempo de operação do reator.

A Figura 6 mostra, a Separação de frutose e glicose com três colunas em série e eluente etanol 15%.

A Tabela 1 apresenta o Pré-tratamento do melaço e AMM.

A Tabela 2 apresenta a Formulação do meio de cultivo industrial e condições de cultura.

A Tabela 3 apresenta o Rendimento da imobilização em alginato de cálcio com carvão ativado.

A Tabela 4 apresenta a Atividade da enzima imobilizada ao longo do tempo de operação do leito catalítico.

O processo de obtenção de frutose e xarope invertido a partir de sacarose, objeto da presente patente, consta de cinco etapas principais, as quais são descritas a seguir, sendo elas: (A)- A Produção da inulinase, constando de duas etapas essenciais, sendo: (A1) - O Preparo do inoculo, e (A2) – O Preparo do meio de fermentação industrial; (B)- A Recuperação enzimática; (C) - A Imobilização da inulinase; (D) - A Produção do xarope de frutose e glicose a partir da sacarose; e (E) – Onde a Frutose e glicose são separadas em leito de zeólitas do tipo faujasita, nas formas sódica, cálcica ou bárica.

A- Produção da inulinase: A enzima inulinase é obtida de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

A1. Preparo do inóculo: o microrganismo é inoculado em meio contendo extrato de levedura e malte (3,0 g/L), peptona (5,0 g/L), glicose (10 g/L) e ágar. Posteriormente é pré-inoculado em um meio podendo conter melaço e água de maceração de milho, ou sacarose mais outros nutrientes como composto de extrato de levedura em concentrações variando de 1 a 5 g/l, preferencialmente 3 g/L, malte em concentrações variando de 1 a 5 g/l, preferencialmente 3 g/L, peptona em concentrações variando de 1 a 8 g/l, preferencialmente 5 g/L e glicose em concentrações variando de 5

a 15 g/l, preferencialmente 10 g/L. O meio é levado à incubação em mesa orbital à 30°C, por 24 horas.

A2. Preparo do meio de fermentação industrial: o meio industrial é preparado a partir de matéria prima de baixo custo como melaço e água de maceração de milho (AMM). Estes insumos necessitam, entretanto, de um pré-tratamento para retirada de substâncias indesejáveis que prejudicam o desenvolvimento do processo e, principalmente, dificultam a separação e pré-purificação da enzima. Este pré-tratamento pode ser feito aplicando agentes de clarificação, como resinas de troca iônica ou carvão ativado, ou alterações no pH, seguido de tratamento térmico, e posterior centrifugação ou filtração em filtro prensa. A tabela 1 resume o tratamento dado ao melaço e AMM, com o uso de carvão ativado. Após então ao pré-tratamento, o meio de cultivo industrial propriamente dito é formulado segundo dados da tabela 2 e então inoculado com o microrganismo proveniente de A1. A fermentação é conduzida em batelada simples ou alimentada, por um período variando de 48 a 72 horas. Agitação, temperatura e aeração devem ser mantidas como descrito na tabela 2. Após o término da fermentação o meio é centrifugado para a retirada de células que podem ser encaminhadas para o setor de secagem para posterior comercialização, pois este microrganismo é extremamente rico em nutrientes. O centrifugado ou vinho, é rico em enzimas e então submetido à etapa de tratamento final.

B- Recuperação enzimática: Ao caldo clarificado e resfriado a 10°C adiciona-se lentamente, sob agitação, etanol a -20°C até atingir uma concentração entre 50 e 80%, preferencialmente 70%, em volume de álcool, mantendo-se a temperatura entre 2 e 10°C , preferencialmente 4°C. A seguir, a solução resultante é centrifugada a 8000 g durante 10 minutos. O precipitado contendo a enzima é ressuspendido em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8.

C- Imobilização da inulinase: A imobilização é feita em gel alginato de cálcio com adição de carvão ativado em concentrações variando de 1 a 5%, preferencialmente 3%, e glutaraldeído como agente de cross-link. Vários trabalhos citam a utilização de carvão ativado e glutaraldeído em outros tipos de suporte (U.S.Patent No 5,916,789 e No 5,998,183). Utiliza-se alginato de cálcio em concentrações variando de 1 a 5%, preferencialmente 3% (m/v), sacarose em concentrações variando de 40 a 60%, preferencialmente 50% (m/v), 20% (v/v) de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 10 a 18% de solução 25% de glutaraldeido, preferencialmente 14% (v/v), 1 a 5% de carvão ativado, preferencialmente 3% . Mistura-se o carvão, a enzima e o glutaraldeído e a solução é deixada em agitação branda por 30 minutos. O alginato é dissolvido na água com aquecimento e agitação vigorosa e adiciona-se a sacarose. Após resfriamento, adiciona-se a mistura de carvão, enzima e glutaraldeído. A amostra é então gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,2 M em tampão acetato de sódio com 3,5% de glutaraldeído a 10°C.

D- Produção do xarope de frutose e glicose a partir da sacarose: Inicialmente utiliza-se uma coluna de vidro empacotada com inulinase imobilizada conforme descrito em C. A coluna é encamisada e mantida na faixa de 40 a 50°C, preferencialmente 43°C. A altura da coluna varia entre 50 e 100 cm e o diâmetro depende da escala de produção, sendo que a base da coluna contém um leito de micro-esferas de vidro que funciona como difusor . A vazão de alimentação tem que ser o suficiente para manter um tempo de residência de no mínimo 6,2 horas na coluna. A solução de sacarose entre 40 e 60%, preferencialmente 50%, é preparada utilizando-se sacarose comercial. O pH da solução de sacarose é ajustado dentro da faixa de 3,6 a 5,6, preferencialmente 4,8. A conversão da sacarose e a concentração de glicose e frutose na

saída de coluna dependem das condições de processo, como atividade do biocatalisador, temperatura, pH, vazão e tempo de residência na coluna. Dependendo das condições, pode-se obter até 98% de hidrolise da sacarose.

E- Frutose e glicose são separadas em leito de zeólitas do tipo faujasita, nas formas sódica, cálcica ou bárica. Inicialmente, é realizada a troca iônica da zeólita, visto que a adsorção da frutose é melhor quando a zeólita está ionizada. A coluna cromatográfica é preenchida com a zeólita trocada e o empacotamento é feito com água deionizada e o efluente utilizado na coluna foi solução de etanol com concentração entre 5 e 30%, preferencialmente 20%. A solução de glicose e frutose alimentada é a mesma proveniente da coluna de hidrólise. A dimensão da coluna de separação é tal que permite uma operação contínua da etapa de hidrólise. Isto é conseguido da seguinte forma: a solução proveniente da coluna de hidrólise é colocada em tanque de espera e após atingir o volume desejado passa a ser alimentada na coluna de separação. No mesmo instante o fluxo proveniente da hidrólise é desviado para um segundo tanque. A temperatura da coluna e dos tanques deve ser mantida em 40°C. A solução na saída da coluna de separação é coletada de forma a separar as frações ricas em frutose e glicose da mistura dos dois açúcares. A concentração dos açucares na alimentação é de 250 g/L. Desta forma consegue-se obter de 60 a 80% de frutose pura. O processo de hidrólise e separação está esquematizado na figura 1.

EXEMPLO 1

Produção da inulinase:

O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* é utilizado para a produção da inulinase. A fermentação é realizada em fermentador, com a utilização do meio composto por 70 g/L de AMM, 210 g/L de melaço, 8 g/L de hidrolisado de levedura, 300 rpm e 2,5 vvm. O melaço e a água de maceração de milho

foram previamente tratados com 8% de carvão ativado, a 70°C, por uma hora. O pH inicial foi ajustado para 3,4. A fermentação foi mantida por 72 horas a uma temperatura constante de 27°C. Ao final das 72 horas, observa-se uma atividade no caldo fermentado máxima de 1200 UI/mL.

EXEMPLO 2

Recuperação da inulinase do caldo fermentativo:

O caldo fermentativo é centrifugado a 8000 g por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Após a separação das células, adiciona-se etanol a −15°C lentamente no meio clarificado, até que se atinja a concentração de 70% na mistura. Todo o processo deve ser realizado a uma temperatura de 4°C, de modo a favorecer a precipitação da enzima. A solução é novamente centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente para auxiliar na separação final da enzima. A inulinase separada é ressuspendida em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 4,8 para armazenamento a baixa temperatura. A eficiência da recuperação e a estabilidade da enzima com o tempo estão apresentadas a seguir.

Atividade do caldo fermentado: 1200 UI/ml

Atividade da enzima após recuperação com etanol: 6860 UI/mL

Eficiência de recuperação: 70%

EXEMPLO 3

Imobilização da inulinase:

A imobilização da inulinase é feita com a utilização de alginato de cálcio 3% com ou sem adição de 3% de carvão ativado e glutaraldeído como agente de cross-link. A atividade final é medida após 48 horas da lavagem final das cápsulas para garantir que a enzima já esteja estável na forma imobilizada. A eficiência da imobilização é calculada para diferentes atividades da solução de partida e está

apresentada na tabela 3. A figura 3 mostra a comparação da estabilidade da enzima imobilizada em alginato de cálcio sem e com adição de 3% de carvão ativado e glutaraldeído como agente de cross-link. Pode-se perceber que o carvão ativado mais o glutaraldeido resultaram em um biocatalizador mais estável.

EXEMPLO 4

Produção do xarope de açúcar invertido:

A inulinase imobilizada é colocada em uma coluna encamisada, cuja temperatura foi mantida em 43°C e pH e 4,8. A atividade inicial do biocatalizador é de 10,2 UI/mL de esferas. A solução de sacarose é de 50% e tem seu pH ajustado para 4,8. As condições operacionais são mantidas de acordo com a caracterização da inulinase, em que se assegura o compromisso entre a atividade e estabilidade da enzima na condição imobilizada. O tempo de residência na coluna foi 6,2 horas para garantir a máxima conversão, sendo que este tempo deverá aumentar segundo a queda da atividade do biocatalisador. Os resultados obtidos estão apresentados nas figura 4. O reator pode ser operado por um tempo prolongado, figura 5, sendo que a meia-vida da enzima imobilizada é de aproximadamente 75 dias, o que implica que a coluna pode ser operada por aproximadamente 5 meses ininterruptamente. Somente após esse prazo o biocatalizador deverá ser trocado. A atividade do biocatalizador no reator ao longo do tempo está mostrada na tabela 4.

EXEMPLO 5

Separação da frutose e glicose

A zeólita após ter sido submetida à troca iônica, é colocada em colunas de vidro. Estas colunas devem ter uma razão de 1/50 (diâmetro/comprimento). O volume da solução de açúcar deve ser de até 10% do volume das colunas. O eluente utilizado é solução de etanol 15% e a temperatura foi mantida em 40°C. A eficiência da

separação obtida para estas condições de operação é de 1,62, e o resultado obtido é mostrado na figura 6.

Tabela 1: Pré-tratamento do melaço e AMM

	Melaço	**AMM**
Carvão Ativo (%)	6-10	4-8
Temperatura (°C)	60-80	60-80
Tempo (h)	1-2	1-2

Tabela 2: Formulação do meio de cultivo industrial e condições de cultura

AMM (g/L)	50-70
Melaço (g/L)	150-210
Hidr. levedura. (g/L)	6-8
Agitação (rpm)	300-500
Aeração (vvm)	1,5-2,5
Temperatura (°C)	20-30
pH	3,0-4,0

Tabela 3: Rendimento da imobilização em alginato de cálcio com carvão ativado.

Lote	**Atividade Enzimática (UI/mL)**	**Rendimento da imobilização (%)**
1	10,56	35
2	10,32	39
3	9,6	36

Tabela 4: Atividade da enzima imobilizada ao longo do tempo de operação do leito catalítico.

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

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de frutose pura e xarope invertido a partir de sacarose **caracterizado por** ser um processo de obtenção de frutose e xarope invertido a partir de sacarose, consistindo de cinco etapas:

(A) produção de inulinase a partir de uma cultura de *Kluyveromyces*;

(A1) preparo do inóculo; e

(A2) preparo de meio de fermentação industrial para produção de inulinase em que ocorre um pré-tratamento dos ingredientes para compor o meio de cultivo, sendo que este pré-tratamento compreende o tratamento do melaço e da água de maceração de milho com carvão ativado (em concentrações entre 6-10% (p/v) e entre 4-8% (p/v), respectivamente) em temperaturas entre 60ºC e 80ºC e pH entre 1 e 2;

(B) recuperação da enzima inulinase que pode se dar pelas seguintes etapas:

- precipitação, após a separação das células, com etanol 96ºGL à -15ºC, em que a concentração final do etanol fica na faixa entre 60-70% e a reação de precipitação ocorre à uma temperatura entre 4-10ºC;
- o material precipitado é separado por filtração ou por centrifugação; e
- a enzima inulinase é ressuspensa em tampão acetato de sódio 0,1M a um pH 4,8;

(C) imobilização da inulinase;

- obtida em gel de alginato de cálcio, com adição de carvão ativado, e solução entre 20-30% de glutaraldeído, 40-60% (m/v) de sacarose, 10-20% (v/v) de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida;
- a solução é deixada em agitação branda, a uma temperatura entre 5-15ºC; esta solução é gotejada em uma solução de 0,1-0,3 M de cloreto de cálcio em tampão de acetato de sódio com 10-

30% de glutaraldeído a 10°C, permanecendo em repouso por 12-24h; após este período, as esferas são lavadas com água destilada e armazenadas em tampão acetato de sódio contendo 0,05 M de cloreto de cálcio; e

- a coluna de leito fixo contendo inulinase imobilizada pode ter concentração inicial das enzimas entre 50-100 UI/ml;

(D) produção de xarope de frutose e glicose a partir de sacarose;

- pode se dar em coluna de leito fixo contendo enzima inulinase, obtida e imobilizada de acordo com as etapas (A) a (C), com conversão de 80-98%, na temperatura de 40-50°C e pH na faixa de 3,6-5,6;

(E) separação de frutose e glicose obtidas na etapa (D) utilizando leito de zeólitas do tipo faujasita, nas formas sódica, cálcica, ou bárica.

2. Processo de obtenção de frutose pura e xarope invertido a partir de sacarose, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a formulação de meio de cultivo para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, em meio composto por água de maceração milho ser pré-tratada em concentração entre 50 e 70 g/l, melaço pré-tratado como em reivindicação 1, em concentração entre 150 e 210 g/l, hidrolisado de levedura em concentração entre 6 e 8 g/l, a pH entre 3 e 4, temperatura entre 20 e 30°C, agitação entre 300 e 500 rpm e taxa de aeração entre 1,5 e 2,5 vvm.

3. Processo de obtenção de frutose pura e xarope invertido a partir de sacarose, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** a purificação parcial da enzima inulinase obtida ser por fermentação por precipitação com etanol após a separação das células; o etanol 96°GL, a –15°C, sendo adicionado lentamente no meio clarificado, até que se atinja a concentração entre 60 e 70% na mistura em que todo o processo deva ser realizado a uma temperatura entre 4 e 10°C, de modo a favorecer a precipitação da enzima; em que o precipitado contendo a enzima é separado por centrifugação e a inulinase separada é

ressuspendida em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 4,8 para armazenamento a baixa temperatura ou congelamento.

4. Processo de obtenção de frutose pura e xarope invertido a partir de sacarose, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, **caracterizado por** a imobilização da enzima inulinase obtida ser feita em gel alginato de cálcio, com adição de carvão ativado, 10 a 18% (v/v) de solução 25% de glutaraldeido como agente de cross-link, sacarose em concentração entre 40 e 60% (m/v), 20% (v/v) de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida; onde a solução é deixada em agitação branda e então gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,1 a 0,3 M em tampão acetato de sódio com 3,5% de glutaraldeido a 10°C.
5. Processo de obtenção de frutose pura e xarope invertido a partir de sacarose, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** produzir glicose e frutose a partir da sacarose em coluna de leito fixo, contendo enzima inulinase imobilizada com conversão de 80-98%, na temperatura de 40 a 50°C e pH na faixa de 3,6 a 5,6.
6. Processo de obtenção de frutose pura e xarope invertido a partir de sacarose, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** utilização de coluna de leito fixo contendo zeólica do tipo faujasita, nas formas sódica, cálcica ou bárica, a temperatura das colunas e dos tanques deve ser mantida a 40°C, com eluente etanol a uma concentração de 5 a 30%, trabalhando com 2 tanques de espera, obtendo entre 60 e 80% de frutose na forma pura.

PI0401146

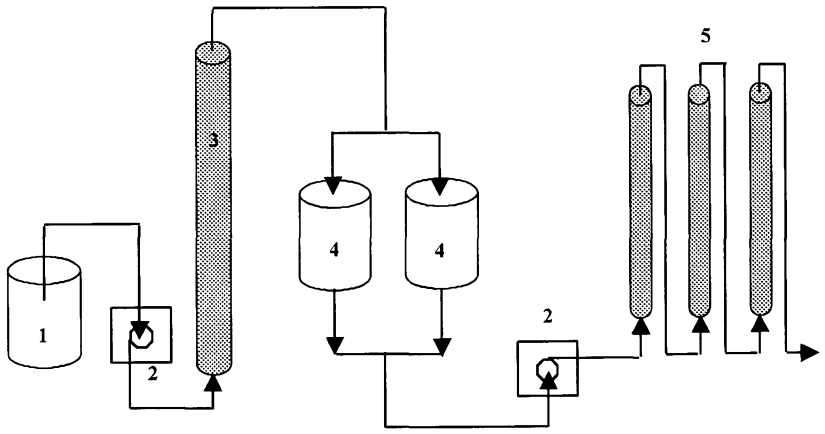


Figura 1

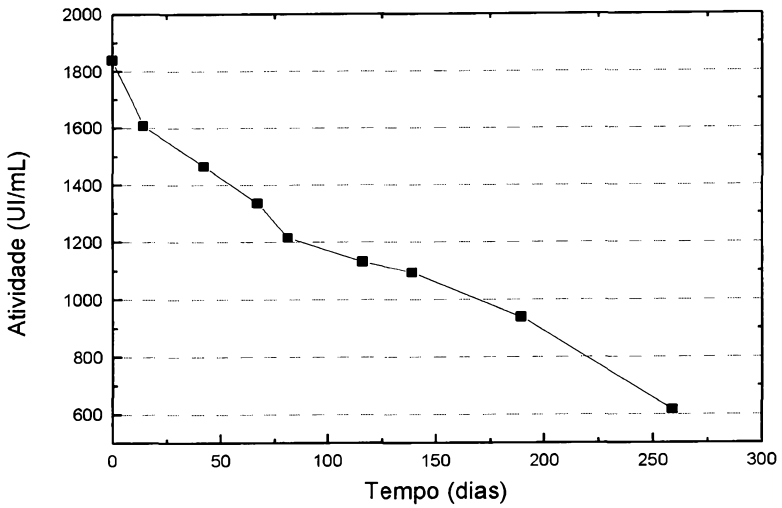


Figura 2

PI0401146

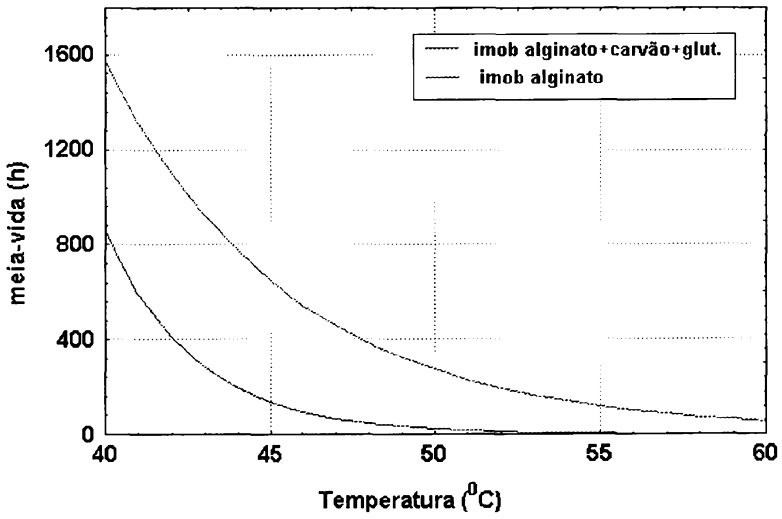


Figura 3

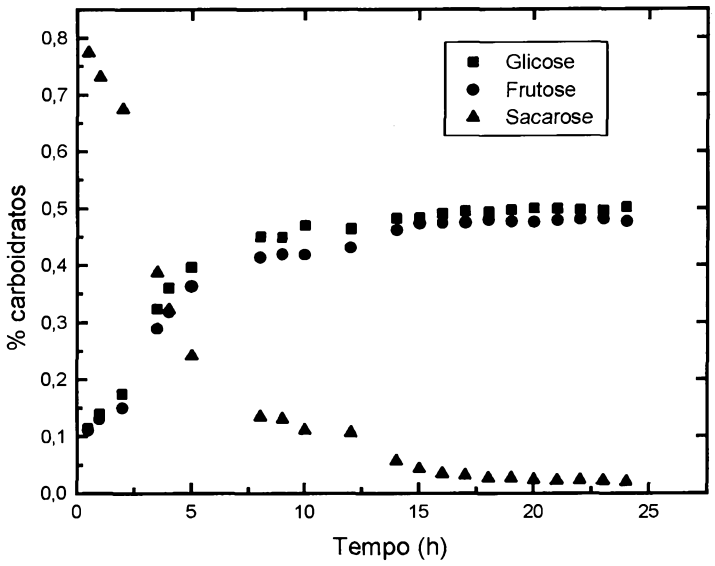


Figura 4

P10401146

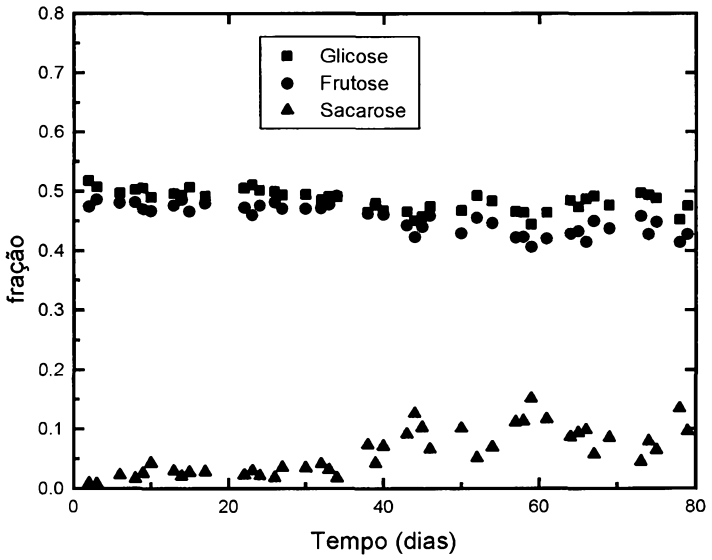


Figura 5

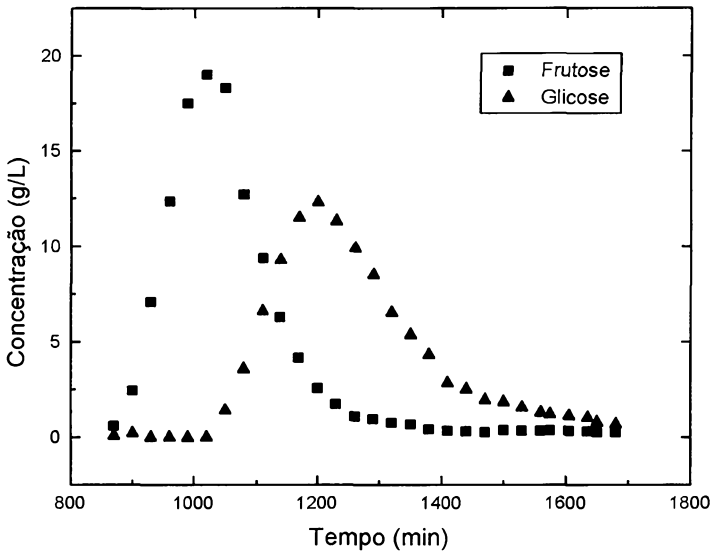


Figura 6

RESUMO

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FRUTOSE PURA E XAROPE INVERTIDO A PARTIR DE SACAROSE" é um processo de conversão da sacarose por via enzimática em glicose e frutose. O biocatalisador utilizado é a inulinase de *Kluyveromyces marxianus* imobilizada em gel alginato de cálcio. A enzima é obtida por fermentação em meio sintético e a seguir purificada parcialmente por precipitação com etanol. O passo seguinte é a imobilização da inulinase em suporte sólido para facilitar a separação dos produtos da reação enzimática. A montagem do biorreator é feita montando uma coluna de leito fixo com as esferas de inulinase imobilizada e as condições de operação foram otimizadas para conversão da sacarose em frutose e glicose. As condições de operação determinam a composição final do produto, que pode conter somente glicose e frutose ou uma mistura de glicose e frutose e sacarose não convertida. Este produto final obtido, o xarope de açúcar invertido, é muito utilizado na produção de refrigerantes, doces e produtos farmacêuticos. Para obtenção da frutose pura é necessária uma etapa final de separação que é realizada em coluna de leito fixo contendo zeólita Y na forma bárica. A eluição é feita com solução etanólica a 15%, produzindo mais de 65% da frutose na forma pura. A frutose é apontada como o açúcar ideal do ponto de vista nutricional, já que devido ao seu elevado poder edulcorante acarreta uma redução calórica na dieta e pode ser utilizada por pessoas diabéticas e obesas. O microrganismo do gênero *Kluyveromyces* possui identificação GRAS do FDA americano não apresentando, portanto risco para utilização em alimentos de consumo humano.