

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

**Avaliação da invertase immobilizada em resíduo
agroindustrial para aplicação em reatores
enzimáticos de alta taxa**

Elen Tomoko Taniguchi

Araraquara
2017

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

Avaliação da invertase imobilizada em resíduo agroindustrial para aplicação em reatores enzimáticos de alta taxa

Elen Tomoko Taniguchi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Peixoto.

Araraquara
2017

Avaliação da invertase imobilizada em resíduo agroindustrial para aplicação em reatores enzimáticos de alta taxa

Elen Tomoko Taniguchi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Peixoto.

Araraquara
2017



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

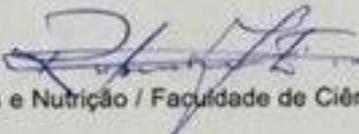
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da invertase imobilizada em resíduo agroindustrial para aplicação em reatores enzimáticos de alta taxa

AUTORA: ELEN TÔMOKO TANIGUCHI

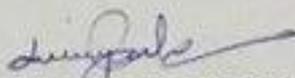
ORIENTADOR: RUBENS MONTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RUBENS MONTI


Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. ALICE YOSHIKO TANAKA


Laboratório de Pesquisa de Microbiologia de Alimentos / Faculdade de Tecnologia de Marília

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN


Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 18 de dezembro de 2017

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ser minha luz guiadora.

Aos meus amados pais: seu Ginão e dona Vandinha, uma honra ser filha de vocês. Obrigada pelo apoio, incentivo e amor de sempre.

Aos meus queridos irmãos: Antyan e Bá que são meus companheiros de vida.

Ao grande, queridíssimo, amado, respeitado, gênio professor Dr. Rubens Monti, pela demonstração de amor a enzimologia, carinho e sábia orientação.

A minha incrível parceira de casa, de laboratório e etc. Dra. Juliana Cristina Bassan, o meu muitíssimo obrigado, sem você este projeto não sairia do lugar.

Ao meu coorientador professor Dr. Guilherme Peixoto.

A minha grande família do mesmo sangue ou não, as tias, tios, primos, primas que torceram por mim.

Aos amigos de Tupã, aos amigos que a FATEC de Marília me deu, aos amigos de Araraquara que me aguentaram durante esses três anos dessa difícil fase.

Aos meus amigos e parceiros da Unesp Araraquara, que me ajudaram e tiveram paciência comigo no desenvolvimento do meu projeto: Fer Paz, Eddyn, Thamyres, Letícia, Brunão, Ana Carolina (manolo), Clariana, Cléber, Natália, Maísa, Cauê, plimo e Leo; aos novos amiguinhos: Fer, Isa e Lidiane, e as técnicas: Ana Nasser e Adriana.

Aos professores, pós-graduandos, as tias da limpeza e aos funcionários da FCFar, pelo aprendizado e apoio prestados.

Gratidão por ter vocês em minha vida, muito obrigada!

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição, pelos
maravilhosos ensinamentos.

Aos funcionários da FCFar, pela simpatia e serviços.

.

*“Eu sou aquela mulher
a quem o tempo muito ensinou.
ensinou a amar a vida
e não desistir da luta,
recomeçar na derrota,
renunciar a palavras
e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos
e ser otimista”.*

Cora Coralina

Resumo

A busca por inovações tecnológicas que gerem produtos de qualidade concomitantemente à redução de custos, são os principais fatores de preocupação envolvendo um processo em escala industrial. Devido à importância destes fatores, esta dissertação estudou a produção de açúcar invertido por meio de processo enzimático contínuo de alta taxa visando identificar condições para o aumento da taxa de produção e eficiência na conversão do substrato. Dessa forma, a enzima invertase foi imobilizada em resíduo agroindustrial de baixo custo e fácil aquisição (pó de sabugo de milho) e para fins de comparação, foi imobilizada também em um suporte universal: a agarose. **Objetivo:** Obtenção de açúcar invertido usando o derivado pó de sabugo de milho-glutaraldeído-invertase (SM-GLU) em reator de leito fixo. **Métodos:** Obtenção e caracterização cinética da enzima invertase solúvel. Posteriormente sua imobilização nos suportes SM-GLU e AG-GLU seguida de caracterização cinética dos derivados obtidos. Na etapa seguinte, foi realizado a determinação da conversão (%) de hidrólise da sacarose em condições de máxima atividade (20% de sacarose m/v em tampão acetato de sódio, 50 mM e pH 5) para os derivados em sistema descontínuo (batelada), e em reator de sistema contínuo, visando encontrar a condição de máxima eficiência. Onde foram caracterizados parâmetro de processo como conversão, carga substrato aplicada, estabilidade e reuso do derivado enzimático. **Resultados:** Os derivados enzimáticos obtiveram uma melhor resistência a alta temperatura (estabilidade térmica 60°C) quando comparadas a enzima solúvel. O derivado SM-GLU teve uma maior estabilidade em relação ao derivado AG-GLU, quando submetido a altas concentrações (20%, 40% e 60%) de sacarose. No sistema descontínuo (batelada) derivado SM-GLU, alcançou uma conversão de 90% de conversão do substrato em produto. **Conclusão:** A matriz de imobilização escolhida (pó de sabugo de milho) apresentou características físico-químicas favoráveis ao processo (resistência mecânica, hidrofobicidade, capacidade de derivatização) além de ser de grau alimentício e apresentar baixo custo de aquisição e alta disponibilidade. Ademais teve algumas vantagens em relação a agarose, que é um suporte dispendioso, como uma maior conversão de sacarose em glicose e frutose, maior estabilidade frente a altas temperaturas e possibilidade de trabalho com altas concentrações de substrato. **Palavras chave:** Invertase. Açúcar invertido. Imobilização. Pó de sabugo de milho. Reatores enzimáticos.

Abstract

The search for technological innovations that generate quality products concomitant to the cost reduction, are the main point of concern in an industrial scale process. Considering the importance of factors cited above, in this study the production of inverted sugars by high rate continuous enzymatic process aiming to identify the conditions that could provide a raise in production rate and the efficiency in substrate conversion. Thus, invertase enzyme was immobilized in a low cost and easy acquisition agroindustrial waste (corn cob powder) and for comparison purposes, also immobilized in universal support, agarose. **Objective:** To obtain inverted sugar using the corn cob powder glutaraldehyde-invertase derivate (SM-GLU) in fixed-bed reactor. **Methods:** Extraction and kinetic characterization of soluble invertase. Subsequential immobilization in SM-GLU and AG-GLU supports and following kinetic characterization of the derivates. In the sequence it was conducted the hydrolysis essay (%) under conditions of maximum activity (20% sucrose w/v in sodium acetate buffer 50 mM and pH 5) for the derivatives in a discontinuous system (batch) and in continuous system reactor, both operating in optimal conditions of sucrose hydrolysis. From the last step, it was characterized process parameters as conversion efficiency, substrate load applied, stability and reuse of the enzymatic derivate, aiming to obtain the conditions of maximum efficiency. **Results:** The enzymatic derivate presented better thermal stability (60°C) compared to soluble enzyme form. The derivate SM-GLU showed greater stability than AG-GLU when subjected to high sucrose concentrations (20%, 40% and 60%). In discontinuous system (batch) with SM-GLU derivate, it achieved a 90% conversion rate of substrate to product. **Conclusion:** The immobilization matrix chosen (corn cob powder) offered favorable physical-chemical characteristics to the process (mechanical resistance, hydrophilicity, derivatization capability) besides presenting food grade, low acquisition cost and high availability. Furthermore, it showed some advantages comparing to agarose, which is an expensive support, as a higher conversion rate of sucrose to glucose and fructose, better stability in high temperatures and possibility of working in high substrate concentration.

Key words: Invertase. Inverted sugar. Immobilization. Corn cob powder. Enzymatic reactor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG: agarose

AG-GLU: agarose glutaraldeído invertase

AR: atividade recuperada

ASP: ácido aspártico

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DNS: ácido 3,5 dinitrosalicílico

ϵ : coeficiente de extinção molar

EDA: etilenodiamina

ES: enzima solúvel

FE: fator de estabilização

GLU: ácido glutâmico

K_M : constante de afinidade - Michaelis Menten

KI: iodeto de potássio

I: iodeto

IO₄: periodato

Milli-Q: água ultrapura

NaBH₄: borohidreto de sódio

NaIO₄: periodato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

RI: rendimento de imobilização

RID: Índice de refração

[S]: substrato

SM: pó de sabugo de milho

SM-GLU: pó de sabugo de milho glutaraldeído invertase

TDH: tempo de detenção hidráulica

$V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima de reação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosagem do teor de proteínas, a atividade e a atividade específica da enzima invertase solúvel (extrato enzimático).	48
Tabela 2. Atividade enzimática de todo o extrato cru obtido (enzima solúvel).	
Tabela 3. Quantidade de μmol de grupos reativos por g de agarose e pó de sabugo de milho.	53
Tabela 4. Rendimento de imobilização e Atividade recuperada dos derivados AG-GLU e SM-GLU.	55
Tabela 5. Valores de K_M e V_{max} aparentes seguido da % de imobilização de cada derivado.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 16. Efeito da temperatura sobre a atividade (%) da enzima solúvel e dos derivados.	64
Figura 18. Determinação da atividade (U/g) e atividade (%) dos diferentes derivados SM-GLU nas diferentes concentrações de substrato (20%, 40% e 60%).	67
Figura 19. Conversões (%) obtidas a partir do reuso realizado em sistema descontínuo (batelada) AG-GLU e SM-GLU em três tempos diferentes de reação.	68

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Rendimento de imobilização	37
Equação 2. Atividade Recuperada (%)	37
Equação 3. Atividade enzimática dos derivados	38
Equação 4. Tempo de meia vida	38

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura	16
2.1. Açúcar invertido	16
2.2.1. Hidrólise ácida da sacarose	17
2.2.2. Hidrólise enzimática a sacarose	17
2.2. Invertase	18
2.3. Imobilização de enzimas.....	20
2.4. Suporte para imobilização.....	22
2.4.1. Pó de sabugo de milho.....	23
2.5. Reatores enzimáticos.....	24
3. Objetivos.....	26
4. Material e métodos	27
4.1. Materiais	27
4.2. Procedimento experimental	27
4.2.1. Análises Químicas.....	29
4.2.1.1. Determinação do teor de proteína totais	29
4.2.1.2. Determinação da atividade enzimática da invertase	30
4.2.1.3. Dosagens por espectrofotometria	31
4.2.1.4. CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência).....	31
4.2.1.5. Reator enzimático.....	32
4.2.2. Extração da enzima invertase intracelular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	32
4.2.3. Determinação do pH de máxima atividade	33
4.2.4. Determinação da temperatura de máxima atividade	33
4.2.5. Determinação de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes.....	33
4.2.6. Estabilidade térmica e tempo de meia vida da enzima solúvel	33
4.2.7. Imobilização da enzima invertase em suportes ativados: pó de sabugo de milho e agarose.....	34
4.2.7.1. Pré Tratamento do pó de sabugo de milho	34
4.2.7.2. Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho com grupos glutaraldeído.....	36
4.2.7.3. Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho gliceril	36

4.2.7.4.	Preparo dos suportes agarose e pó de sabugo de milho glioxil	
	37	
4.2.7.5.	Preparo dos suportes agarose e pó de sabugo de milho	
	manae (monoamiletil-N-aminoetil).....	38
4.2.7.6.	Preparo dos suportes agarose e pó de sabugo de milho	
	glutaraldeído.....	38
4.2.8.	Imobilização da invertase nos suportes SM-glutaraldeído e AG-	
	glutaraldeído.....	39
4.2.8.1.	Rendimento de imobilização (%).....	41
4.2.8.2.	Atividade recuperada (%).....	41
4.2.9.	Caraterização cinética dos derivados enzimáticos	42
4.2.9.1.	Atividade enzimática	42
4.2.9.2.	Estabilidade térmica e tempo de meia vida.....	42
4.2.9.3.	Efeito de altas concentrações de substrato sobre a atividade	
	dos derivados	43
4.2.9.4.	Reuso dos derivados estabilizados em sistema de tanque	
	agitado em modo descontínuo (batelada)	43
4.2.9.5.	Reuso dos derivados estabilizados em sistema de leito fixo	
	em modo contínuo.....	44
4.2.9.6.	Aplicação dos derivados estabilizados para a produção de	
	açúcar invertido em sistema de tanque agitado de modo descontínuo	
	(batelada) em três diferentes tempos de reação	45
4.2.10.	Determinação de açúcares por CLAE	45
4.2.11.	Cromatografia em Camada Delgada	46
5.	Resultados e Discussão	47
5.1.	Dosagem de proteínas.....	47
5.2.	Dosagem de açúcares redutores	47
5.3.	Caracterização cinética da enzima solúvel	48
5.3.1.	Determinação da atividade enzimática.....	49
5.3.2.	Determinação do pH e temperatura de máxima atividade da	
	enzima solúvel:.....	49
5.3.3.	Determinação das constantes K_M e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes.....	51
5.4.	Ativação dos suportes AG-GLU e SM-GLU	52
5.4.1.	Preparo dos suportes agarose-glioxil e pó de sabugo de milho	
	glioxil 52	

5.4.2.	Formação dos suportes agarose-Amino (AG-amino), pó de sabugo de milho-Amino (SM-amino), agarose-glutaraldeído (AG-GLU) e pó de sabugo de milho-glutaraldeído (SM-GLU).	53
5.4.3.	Perfil de Imobilização	53
5.5.	Caracterização cinética dos derivados.....	55
5.5.1.	Rendimento de imobilização e Atividade Recuperada dos derivados	55
5.5.2.	Determinação das constantes de Michaelis Menten (K_M) e Velocidade máxima de reação (V_{max}) aparentes dos derivados	57
5.5.3.	Estabilidade térmica e tempo de meia vida da enzima solúvel e dos derivados (AG-GLU e SM-GLU).	60
5.5.4.	Efeito de altas concentrações de substrato sobre a atividade dos diferentes derivados.	65
5.5.5.	Reuso dos derivados SM-GLU e AG-GLU em sistema descontínuo	68
5.5.6.	Reuso dos derivados AG-GLU e SM-GLU em sistema contínuo	69
5.5.7.	Aplicação dos derivados otimizados (estabilidade e eficiência) para a produção de açúcar invertido em reator de tanque agitado (batelada) em três diferentes tempos de reação:	73
5.5.8.	Cromatografia em camada delgada	74
6.	Conclusão.....	76
	Referências.....	78
2.	Rodrigues MVN, Rodrigues RAF, Serra GE, ANDRIETTA SR, Franco TT. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. Ciênc Tecnol Aliment ., 2000 Campinas Apr.; 20 (1):103-9.....	78

1. Introdução

A busca por tecnologias inovadoras que gerem produtos de qualidade com maior valor agregado concomitantemente a redução de custos de seus processos operacionais, é uma ótima estratégia para a competitividade no setor industrial (1).

Dessa forma o presente estudo teve como principal objetivo produzir um ingrediente muito utilizado pelas indústrias alimentícias (tanto de alimentos quanto de bebidas), o açúcar invertido. Obtido por meio de uma reação de hidrólise na presença de enzimas imobilizadas, processo enzimático pelo qual se obtém um produto (mistura de glicose e frutose por meio da hidrólise da ligação glicosídica da sacarose) com alto grau de “pureza”, não necessitando de alta temperatura e um longo tempo de reação como o processo de hidrólise ácida, assim não formando compostos tóxicos indesejáveis, como o hidroximetil furfural (2–5). O uso de enzimas na forma solúvel é limitado, devido a fatores como alto custo, instabilidade (pH e temperatura), fácil mudança conformacional de sua estrutura resultando logo em sua perda. Enquanto que as enzimas imobilizadas, podem ser utilizadas e reutilizadas, tornando-se uma alternativa mais econômica e vantajosa para obtenção de um produto de alta qualidade junto da redução de custo (5,6).

No intuito de aumentar a contribuição para o aspecto econômico envolvido nesse estudo, a enzima invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* foi imobilizada em um suporte lignocelulósico: o pó de sabugo de milho, que é considerado um resíduo agroindustrial. Esse suporte constitui

uma alternativa de baixo custo para imobilização de enzimas, além de apresentar grande abundância no mercado.

2. Revisão de Literatura

2.1. Açúcar invertido

A partir da hidrólise da sacarose, um dissacarídeo composto por um resíduo de α -D-glicose e um resíduo de β -D-frutose unidos por uma ligação glicosídica β -1,2, obtém-se uma solução denominada açúcar invertido. O açúcar invertido corresponde a uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, sendo 20% mais doce que a sacarose.

Essa mistura de açúcares possui um elevado poder higroscópico, mantendo uma umidade, que aumenta consideravelmente o prazo de validade de alguns produtos. Possui também a propriedade de diminuir o ponto de congelamento, por vez diminuindo sua afinidade com a água (redução da atividade de água) e impedindo o crescimento de micro-organismos (7). O uso de açúcar invertido em alimentos é bem vantajoso em comparação à sacarose exibindo maior valor agregado, conferindo mais cremosidade ao produto e maior poder edulcorante aumentando a viabilidade econômica do processo produtivo (8–11).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (12), em 2011 foram produzidas 844.206 toneladas de xaropes de açúcares, incluindo xaropes de açúcar invertido, equivalente a R\$ 870.122.000,00. Porém, a produção brasileira é exclusivamente feita pela via ácida e resinas de troca

iônica, resultando em um produto de baixa qualidade e alto custo energético (12).

E o produto (açúcar invertido) de maior interesse comercial, é o qual possui um nível de inversão próximo a 55%, alcançando uma solubilidade máxima nessa faixa, resultando em produtos sem problemas de cristalização e contribuindo também para a menor susceptibilidade a contaminação microbiana (13). O açúcar invertido pode ser obtido por duas vias de hidrólise da sacarose: via hidrólise ácida e via hidrólise enzimática.

2.2.1. Hidrólise ácida da sacarose

O processo de catálise da sacarose ocorre por meio da ação direta de um ácido que causa uma acidificação do meio (hidrólise homogênea), ou por meio da liberação de H^+ da resina catiônica (hidrólise heterogênea) que na presença de alta temperatura e longo período de processo, são gerados produtos com coloração escura (altamente coloridos), sabor amargo e ocorre também a formação de compostos tóxicos como o hidroximetil furfural (HMF) afetando diretamente a qualidade desses produtos (14) (Abraham *et al*, 2011).

2.2.2. Hidrólise enzimática a sacarose

A hidrólise enzimática da sacarose é preferível em relação à hidrólise ácida, pois não gera resíduos ácidos e tampouco formação de compostos coloridos e subprodutos tóxicos indesejáveis. A reação é conduzida em condições amenas de pH e temperatura, há maior facilidade de controle da reação e não há necessidade de neutralização do produto final, o que garante

um produto com alta pureza sem ocasionar problemas de geração de águas residuárias, muito comum nos processos químicos. (2,3,5,6).

O processo de hidrólise com enzimas imobilizadas pode reduzir severamente o custo de um processo industrial, por permitir sua reutilização e eliminar etapas posteriores ao processo de hidrólise. Alta produtividade, alta estabilidade e o baixo custo para imobilização da invertase são requisitos fundamentais para competir com o processo químico tradicional de hidrólise por meio do uso de um ácido (15–18).

2.2. Invertase

Existem dois tipos de enzimas invertases, a de grande relevância para este estudo, hidrolisa a ligação entre o oxigênio e carbono 2 (C₂) do resíduo da frutose. A enzima assim, recebe o nome de invertase ou β-D-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26). É amplamente usada pela indústria de alimentos e bebidas, e pode ser extraída de uma variedade de seres vivos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras, plantas e insetos). Embora distribuída de forma generalizada, a enzima comercial é obtida principalmente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecidos também como fermentos que estão envolvidas em processos de deterioração de vários alimentos (frutas, hortaliças, laticínios, bebidas alcoólicas, refrigerantes e mel). Muito útil e a principal espécie utilizada na fabricação de pães, cervejas, vinhos, entre outras bebidas alcoólicas (8).

É uma carboidrase da classe das hidrolases que catalisa a reação de hidrólise da sacarose na presença de água, através da clivagem da ligação

glicosídica (α -1,2), resultando em uma mistura equimolar de glicose, frutose, denominada xarope de açúcar invertido (5,6,15,19–22).

A enzima invertase pode ser utilizada tanto em sua forma livre (solúvel), como imobilizada, para hidrólise da sacarose (2,8). Entretanto, a utilização de enzimas na forma solúvel é limitada em processos industriais em larga escala, devido a fatores como alto custo de produção, instabilidade (pH e temperatura), mudanças conformacionais resultantes de choques mecânicos e pressão osmótica. Além disso, há a dificuldade de recuperação do biocatalisador, que é solúvel ao meio reacional na maioria das vezes, tornando o processo enzimático mais caro (2,3). Por esta razão, estudos têm sido propostos com o intuito de aumentar a estabilidade conformacional e conseqüentemente operacional das enzimas (23). Com o objetivo de ampliar o uso de enzimas em processos industriais e obter maiores fatores de estabilização e automação de processos, a imobilização de enzimas surgiu como uma estratégia promissora para melhorar as propriedades físico-cinética da enzima concomitante à redução de custos (24).

O mecanismo de ação desta enzima é semelhante ao da maioria das enzimas que hidrolisam carboidratos, no qual dois resíduos de aminoácido atuam diretamente no substrato, sendo um deles o nucleófilo e o outro doador de próton. No caso da invertase, esses aminoácidos são o ácido glutâmico (Glu) e o ácido aspártico (Asp). O Glu atua como o doador de próton e ataca o oxigênio central da sacarose, enquanto o Asp atua como o nucleófilo e ataca o C-2 da frutose, resultando em uma ligação covalente e formação do complexo invertasefrutose. O segundo passo do mecanismo de ação é o Glu

atuando como uma base e retirando um próton de uma molécula de água, a qual irá permitir a liberação da frutose e restauração da conformação original da invertase (25).

2.3. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é uma técnica que apresenta consideráveis vantagens quando comparada a utilização de enzimas livres (solúvel). O termo imobilização refere-se ao ato de confinamento físico das enzimas em regiões de espaço, onde há a retenção de suas atividades catalíticas permitindo que o derivado enzimático (enzima + suporte) seja utilizado em processos químicos contínuos, aumentando a estabilidade da enzima (26).

Enzimas imobilizadas são preferidas às enzimas livres, devido a estabilidade da enzima ligada ao suporte, o que facilita os processos de recuperação e purificação do produto, pois reduz a contaminação do produto pela enzima, permite o reuso do biocatalisador, possibilita o desenvolvimento de processos contínuos e, portanto, mais econômicos. Também existe a possibilidade de interrupção rápida da reação a partir da fácil remoção da enzima do meio reacional (27,28).

As enzimas livres podem ser imobilizadas de vários modos, que são divididos em métodos físicos (adsorção física, encapsulação ou aprisionamento) e métodos químicos: (ligação química covalente e ligação cruzada “crosslinking”). O método escolhido para este estudo foi o de ligação covalente unipontual, o qual baseia-se na formação de ligações consideradas fortes entre moléculas da enzima e/ou do suporte com reagentes funcionais (glutaraldeído) e pH próximo a neutralidade (≤ 7).

A imobilização por ligação covalente, baseia-se na ativação dos suportes de imobilização com inserção de grupos reativos que interagem com os grupos nucleofílicos da enzima (Figura 1). E para que haja a interação da enzima com esses grupos reativos dos suportes, é necessário o uso do glutaraldeído utilizado como reagente bifuncional que possui em sua estrutura dois grupos aldeídos nos extremos da molécula, que por sua vez, reagem em pH neutro com grupos aminos livres presentes nas superfícies, um extremo se liga ao suporte e outro a enzima. Dessa forma há a formação de ligações covalentes que conferem uma maior estabilidade entre o suporte sólido e a enzima, maior resistência do biocatalisador em relação a variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos (19,20,21).

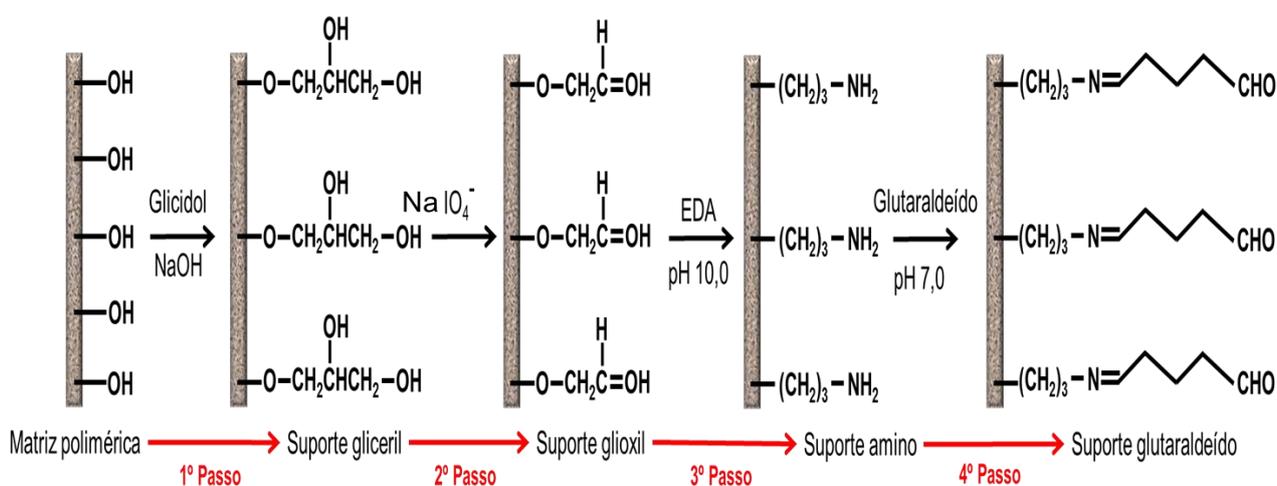


Figura 1. Esquema simplificado de ativação dos suportes pó de sabugo de milho e agarose com grupos glutaraldeído. Fonte: Bassan, 2015.

De modo geral, uma enzima imobilizada em suporte sólido, permite o processamento de grande quantidade de substrato, uma vez que o catalisador pode ser separado facilmente do produto, permitindo que a enzima seja reutilizada em um novo ciclo, e também, proporcionar maior controle de

reação, sendo empregada em processos contínuos (5,6,15,21,27,31,32). A estratégia de imobilização também é uma importante ferramenta na redução da inativação da enzima, por distorção da sua estrutura terciária, que é influenciada pelas variáveis reacionais como temperatura, pH e se for o caso, por solventes orgânicos. Essa rigidificação é de suma importância para a aplicação e estabilização de enzimas dentro de um processo industrial (33–35). Outra vantagem da imobilização de enzima, é a automação de processos, pois permite o emprego do catalisador em uma gama de configurações de reatores (36–38) que dependem da natureza física do material suporte, estabilidade térmica da enzima e característica físico-química do substrato (37,39,40).

2.4. Suporte para imobilização

A escolha do material suporte é muito importante, pois suas características são determinantes no desempenho da enzima imobilizada. As propriedades desejáveis de uma matriz de imobilização incluem resistência física, hidrofobicidade, fácil derivatização, resistência ao ataque microbiano e alta capacidade de interação enzima-suporte por unidade de peso e baixo custo (41). Diante do amplo uso da invertase em indústrias alimentícias, diversos estudos foram feitos referentes à sua imobilização em diferentes suportes, objetivando analisar sua estabilidade enzimática e seu potencial de reuso. Um dos principais fatores identificados foi a seleção de um suporte adequado para fixação da enzima. Dessa maneira, o método escolhido deve atender a duas necessidades: (1) a catalítica, expressa em produtividade,

rendimento, estabilidade e seletividade e a (2) não-catalítica, relativa ao controle do processo (42).

Nesse contexto, resíduos agroindustriais como as fibras apresentam grande potencial devido as suas características físico-químicas, pois são constituídos principalmente de lignina, hemicelulose e celulose possuindo em suas superfícies grupos funcionais que serão ativados até a formação de grupos reativos para imobilização (43,44). Como exemplo, temos a invertase imobilizada em casca de arroz e em pó de sabugo de milho (45,46) e a lipase em fibra de coco (47).

Mundialmente, a quantidade de resíduos lignocelulósicos produzidos é estimada em 1,55 bilhões de toneladas/ano, incluindo o sabugo de milho, palha de cevada, trigo, arroz, sorgo e bagaço de cana. No Brasil, são gerados a cada ano, aproximadamente 350 milhões de toneladas (48).

2.4.1. Pó de sabugo de milho

De acordo com o CONAB “ Companhia Nacional de Abastecimento”, houve uma produção de 693.177,456 milhões de toneladas de milho no Brasil até janeiro de 2017, deste montante, 15% em peso referem-se ao sabugo de milho (49,50) que é constituído basicamente por 31,7% de celulose, 34,7% de hemicelulose, 20,3% de lignina e 2,3% de cinzas (48,51,52). Um resíduo agroindustrial, que até então seu uso era restrito, utilizados somente como atividade secundária, em rações animais, fontes de caldeiras, filtros de solo, enchimento de barreiras entre outras atividades não primárias. sendo uma fonte abundante, renovável e de baixo custo que apresenta grande potencial para imobilização de enzimas.

O milho é um cereal com maior área cultivar produzido pelo Brasil (53), em qualquer tipo solo, clima ou altura no mundo pode ser cultivado, a sua produtividade está ligada diretamente a fertilidade do solo e as colheitas. Em relação aos resíduos, o milho tem como rejeito o sabugo, colmo (caule), folhas e palha durante seu processamento, tornando-se uma biomassa com alta produção (53), a produção de resíduos de milho para cada tonelada colhida é de 2,3 toneladas.

Dessa forma, a grande importância e relevância de se utilizar os resíduos gerados, já que o pó de sabugo de milho se mostrou de ótimo potencial como suporte para imobilização de enzimas em outros estudos realizados. O seu baixo custo e sua grande abundância no mercado, facilitam ainda mais o uso desta alternativa.

2.5. Reatores enzimáticos

Reator enzimático é definido como um dispositivo no interior do qual transformações e reações bioquímicas são catalisadas por enzimas para geração de produtos específicos em condições controladas. Com base no modo de operação (contínuo ou descontínuo), um reator enzimático, pode ser classificado como reator de leito fixo ou leito (31,54). Derivados enzimáticos podem ser empregados em diversas configurações de reatores, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (55–57).

A escolha do tipo de reator a ser empregado em determinado processo está relacionada à forma e às características do derivado enzimático, quando os suportes de imobilização possuem dimensões muito pequenas não podem

ser empregados em reatores de leito fixo, uma vez que a perda de carga ao longo do reator é muito elevada e, particularmente quando se opera em fluxo descendente, pode ocorrer a compactação do leito (58).

Industrialmente, as reações que ocorrem nos reatores, são realizadas sob diversas condições, como altas temperaturas, alterações de pH que podem apresentar vantagens devido à redução do risco de contaminação, diminuição da viscosidade e ao aumento da solubilidade do substrato e da taxa de transferência de massa. Condições que podem aumentar a velocidade de formação do produto e/ou diminuir subprodutos indesejáveis (59).

O reator de leito fixo é a configuração mais utilizada para o emprego de enzimas imobilizadas, pois apresenta vantagens, como fácil operação, redução de custos com mão de obra, estabilização das condições de operação e facilidade do controle de qualidade do produto final, que é continuamente recolhido como efluente, além da conversão substrato-produto que pode ser controlada pela vazão do sistema (37,60–62). Esta configuração de reator é de fácil construção, os suportes podem ser feitos de materiais reciclados e não há necessidade de agitação mecânica ou aparatos de recirculação (63).

3. Objetivos

O objetivo principal foi avaliar a produção de açúcar invertido usando o derivado pó de sabugo de milho-glutaraldeído-invertase (SM-GLU) em reator de leito fixo em modo contínuo e reator de tanque agitado em modo batelada.

Os objetivos específicos foram:

- Extrair e caracterizar cineticamente a invertase (*S.cerevisiae*) que foi utilizada nos experimentos com enzimas livres e imobilizadas;
- Determinar a atividade mais efetiva de enzima por unidade de massa de suporte;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de substrato sobre a conversão em produto empregando reator de leito fixo e reator de tanque agitado.

4. Material e métodos

4.1. Materiais

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi adquirida no comércio local de Araraquara, e utilizada como fonte para extração da enzima invertase. O pó de sabugo de milho (SM) foi adquirido da empresa SAGRAN (Indústria e Comércio de Ingredientes para ração Ltda.), Salto Grande - SP, e a agarose® (AG) comercial foram utilizados como suportes para imobilização.

4.2. Procedimento experimental

O estudo foi dividido em duas fases, discriminadas nas Figuras 2 e 3, conforme mostrado a seguir:

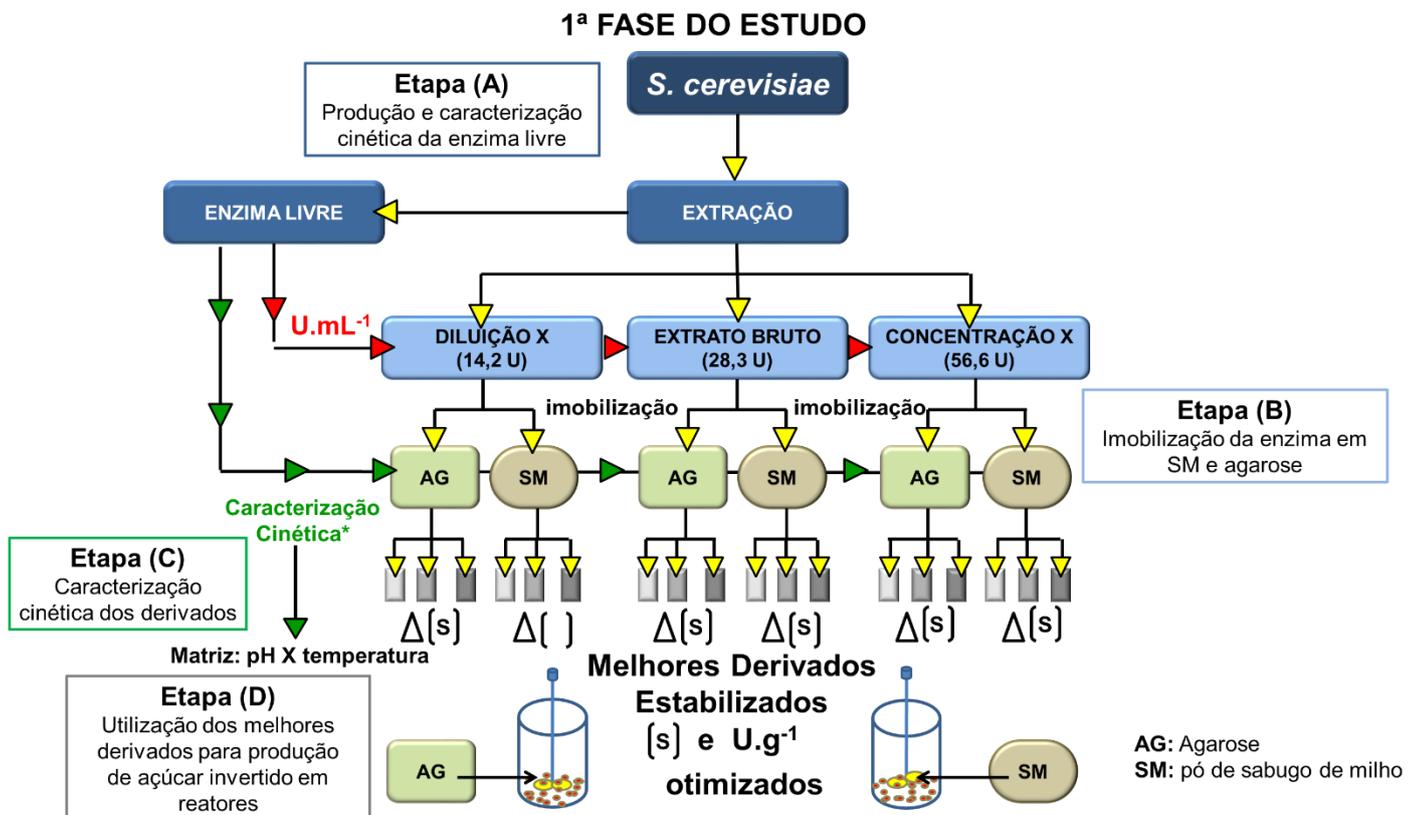


Figura 2. Fluxograma das etapas realizadas na primeira fase. Fonte: Bassan, 2015.

- **Etapa A:** Produção e caracterização cinética da enzima solúvel para determinação das condições de máxima atividade (pH e temperatura) e eficiência catalítica (concentração de enzima e concentração de substrato);
- **Etapa B:** Imobilização da enzima invertase em pó de sabugo de milho e agarose ativados com glutaraldeído;
- **Etapa C:** Caracterização cinética dos derivados enzimáticos obtidos na etapa (B) com relação às condições de máxima atividade (pH e temperatura) e estabilidade térmica.

2ª FASE DO ESTUDO

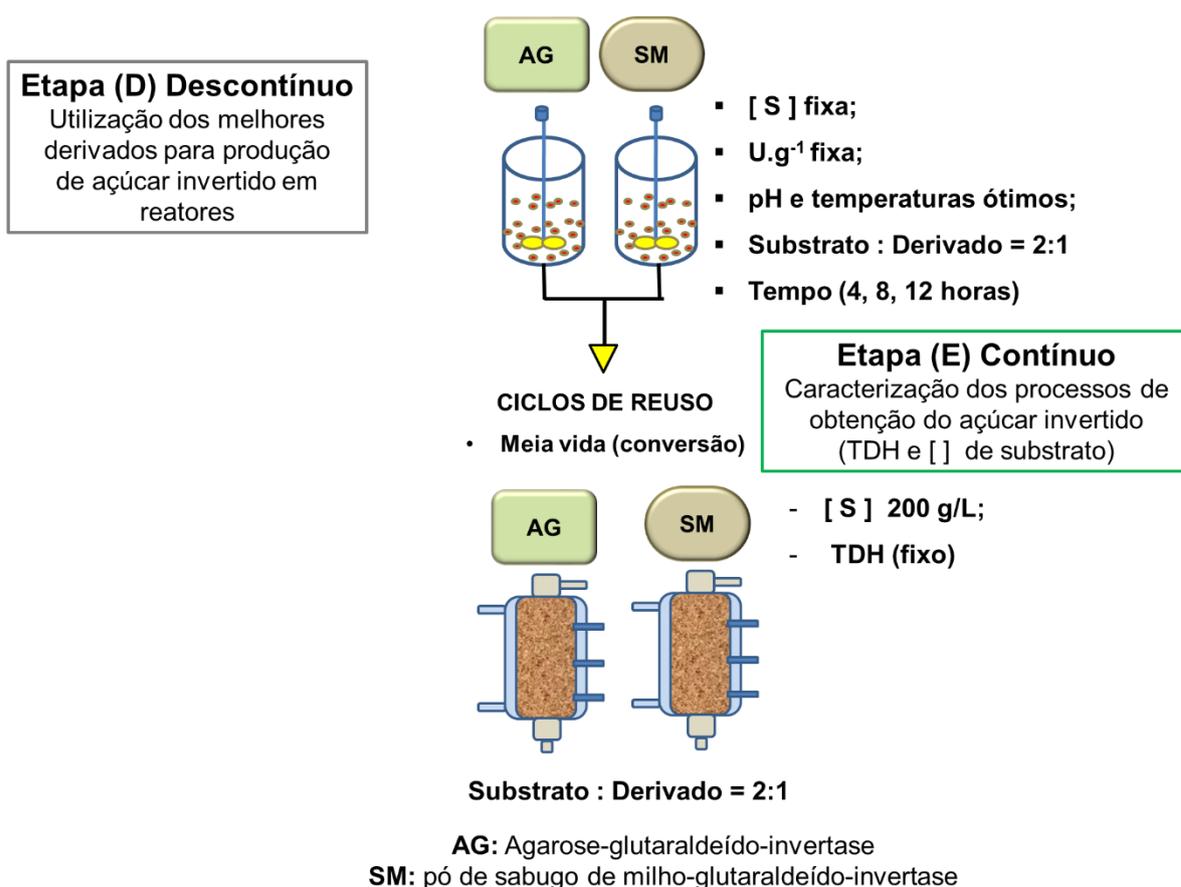


Figura 3. Fluxograma das etapas realizadas na segunda fase. Fonte: Bassan, 2015.

- **Etapa D:** Os melhores derivados (estabilidade x eficiência) foram utilizados para o processo de produção de açúcar invertido por meio de reatores em modo descontínuo e contínuo;

- **Etapa E:** Caracterização dos processos de obtenção de açúcar invertido em sistema de modo de operação descontínuo (tempo) e modo de operação contínuo (tempo de detenção hidráulica - TDH e concentração de substrato).

4.2.1. Análises Químicas

4.2.1.1. Determinação do teor de proteína totais

Foi realizada a determinação de concentrações de proteínas por meio do método de Lowry (64), modificado por Hartree (65), na qual foi construída uma curva analítica utilizando soro albumina bovina como padrão. Elaborada por meio da representação gráfica entre os valores das absorvâncias obtidas com DNS *versus* valores das concentrações crescentes da solução padrão.

O valor da absorvância determinada foi de $\epsilon = 2,2552 \text{ (mL/mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$, que foi utilizado na determinação do teor de proteína da enzima invertase solúvel. O protocolo utilizado foi seguindo metodologia de Lowry modificado por Hartree, utilizando-se tubos já contendo concentrações crescentes da solução padrão, esses tubos foram completados com volumes específicos de água, para que o total do volume em todos os tubos fossem iguais.

Posteriormente, foram adicionados 5 mL da solução A (50 mL de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1M + 0,5 mL de CuSO_4 , 1% em H_2O destilada e 0,5 mL de tartarato de sódio potássico 1% em H_2O destilada), agitou-se os tubos e houve um repouso de 15 minutos. Foram adicionados mais 0,5 mL de reagente Folin-

Ciocalteau, houve uma nova homogeneização e um maior período de repouso (30 minutos). E por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda=660$ nm).

4.2.1.2. Determinação da atividade enzimática da invertase

Uma curva analítica padrão da glicose foi elaborada por meio da representação gráfica entre os valores das absorvâncias obtidas com DNS *versus* valores das concentrações crescentes da solução padrão. A atividade enzimática foi determinada pela quantificação de açúcares redutores formados, utilizando o ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), segundo método de Miller (66). Analisada por espectrofotômetro a 540 nm e o açúcar redutor produzido. Nesta reação, o ácido 3,5 - dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino, a ácido 3 - amino - 5 - nitrossalicílico, concomitantemente em que o grupo aldeído é oxidado a ácido carboxílico, provocando a mudança de coloração do meio de amarelo até vermelho-marrom (66,67).

O coeficiente de extinção molar foi calculado com o auxílio da curva analítica de glicose, resultando em $\epsilon = 0,1845 (\mu\text{mol} \cdot 0,5\text{mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ou 92,250 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor por minuto e a atividade específica é expressa em atividade por miligrama de proteína (U/mg) (68). O ensaio foi realizado utilizando-se 0,1 mL do extrato enzimático em 2,9 mL de uma solução de sacarose 2%, preparada em solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, mantidos em agitação por 20 minutos a 50°C. Após esse determinado tempo de reação, 0,5 mL desta solução foram retirados e colodados em outros tubos que continham 0,5 mL de DNS. Essa mistura foi

levada a um banho de água fervente durante 5 minutos, posteriormente foi resfriada, e por fim, foram adicionados 5 mL de água ultrapura para que fosse realizada a leitura dos açúcares redutores em espectrofotômetro.

4.2.1.3. Dosagens por espectrofotometria

Os hidrolisados obtidos a partir da hidrólise enzimática da sacarose foram quantificados por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta performance.

As análises espectrofotométricas foram realizadas em Espectrofotômetro (Ultrospec 3100 UV/visible spectrophotometer - Amersham Biosciences). A metodologia utilizada foi adaptada de Miller (1959). O padrão estoque utilizado para construção da curva analítica, foi feito com glicose (Synth) nas concentrações de 0 a 380 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glicose. A leitura foi feita em 540 nm.

4.2.1.4. CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

O cromatógrafo líquido constituía-se de uma bomba modelo Nexera XR (CBM – 20A), injetor manual com loop de 20 μl , detector de índice de refração modelo RID (Shimadzu). Utilizou-se uma coluna analítica de aço inox Shim-Pack CLC - NH₂ (M) (250 x 4.6 mm I D; Amino) e pré-coluna de aço inox Shim-Pack G - NH₂-4 (10 x 4.0 mm I). Esses dispositivos foram empregados para determinação de sacarose, glicose e frutose. Condições de operação: temperatura da coluna, 30°C; fase móvel, solução de acetonitrila/água (75:25 v/v) com vazão de 1,0 mL/min. As soluções e os padrões utilizados para análise foram a acetonitrila (Sigma) de grau CLAE, sacarose (Aldrich), glicose

(Synth), frutose (Sigma) de grau analítico. Todos preparados com água ultrapura em sistema Milli-Q (Millipore).

4.2.1.5. Reator enzimático

Para os experimentos com reator de leito fixo em modo contínuo foi empregado um sistema em acrílico, dos quais 223 mL e 177 mL foram de volume útil para os derivados AG-GLU e SM-GLU respectivamente.

4.2.2. Extração da enzima invertase intracelular de *Saccharomyces cerevisiae*:

Para essa extração, cerca de 15 g de fermento biológico comercial foram macerados em almofariz, contendo 5 g de areia tratada, até a formação de uma massa homogênea. Em seguida, foram adicionados 10 mL de éter etílico para a ruptura das células e liberação da enzima intracelular. Durante a maceração, adicionou-se água destilada em volumes de 2 mL até o total final de 30 mL. O processo todo foi realizado em banho de gelo para que não houvesse aquecimento, resultando na desnaturação da enzima. Ao final do processo de maceração, deixou-se a mistura em repouso durante 30 minutos.

O sobrenadante obtido, foi centrifugado a 7395 g durante 20 minutos. A fase líquida resultante foi armazenada em frascos apropriados e congelados até a realização das análises. Para a extração deste extrato enzimático, foram utilizados três pacotes (lotes) de fermento biológico adquiridos no comércio local de Araraquara.

4.2.3. Determinação do pH de máxima atividade

O pH de máxima atividade foi determinado incubando-se a enzima invertase em sistemas tamponantes (Tampão padrão McIlvaine), com valores de pH ajustados entre 2,0 e 8,0 (intervalos de 0,5).

4.2.4. Determinação da temperatura de máxima atividade

A temperatura de máxima atividade foi determinada incubando-se a invertase no pH de máxima atividade em temperaturas no intervalo de 25°C a 70°C (intervalos de 5 graus).

4.2.5. Determinação de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes

A enzima invertase solúvel e os derivados enzimáticos foram submetidos a reações com diferentes concentrações iniciais de substrato em tampão padrão McIlvaine, obtendo as velocidades iniciais de cada ensaio utilizando a sacarose como substrato em pH 5 a 50°C. Foi plotado o gráfico e a partir da linearização da curva da velocidade de reação em função da concentração de substrato pelo método de Lineweaver-Burk foi possível a determinação dos valores da constante de afinidade (K_M) e da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) aparentes (69).

4.2.6. Estabilidade térmica e tempo de meia vida da enzima solúvel

A estabilidade térmica foi determinada através da incubação de 1 mL da enzima invertase solúvel em 9 mL solução tamponada sem a presença de um substrato a uma temperatura de 10°C acima da temperatura de máxima atividade determinada conforme descrito no item 4.6.4. A enzima foi incubada e mantida durante o processo todo em tampão acetato de sódio pH 5 50 mM a 60°C e a cada tempo determinado (0, 15,30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e

360 minutos) era retirado uma alíquota para a seguinte reação no mesmo tampão, com 20%(m/v) de sacarose, à 50°C (condições de máxima atividade).

Em seguida foi realizado a quantificação de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalisílico (DNS). O tempo de meia vida foi determinado pelo tempo em que a enzima invertase obtivesse uma perda de 50% de sua atividade em relação a sua atividade enzimática inicial.

4.2.7. Imobilização da enzima invertase em suportes ativado: pó de sabugo de milho e agarose.

4.2.7.1. Pré Tratamento do pó de sabugo de milho

O pó de sabugo de milho foi inicialmente tratado com álcool 70% na proporção de 1:1 (m/v). A suspensão foi submetida a aquecimento em autoclave a 121° C com pressão de 1,4 Kgf/cm² durante 20 minutos, promovendo a expansão do material lignocelulósico assim removendo extrativos e dissolvendo a hemicelulose. O material obtido foi lavado com água destilada até obtenção de uma suspensão translúcida. O material sólido resultante foi tratado com NaOH 2M a temperatura ambiente por 24 h/140 rpm. Ao final do tratamento alcalino, o pó de sabugo foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo até atingir um pH próximo a neutralidade.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos de três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, unidas entre si por ligações covalentes, formando uma complexa rede resistente a ataques microbianos (70). Internamente, as fibrilas da fração celulósica, um polissacarídeo composto por glicose (Figura 4), encontram-se dispostas como espirais, conferindo força e flexibilidade ao material.

Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis (70), cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico da celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada, formada, principalmente, por blocos de construção de pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila (71,72). Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (72).

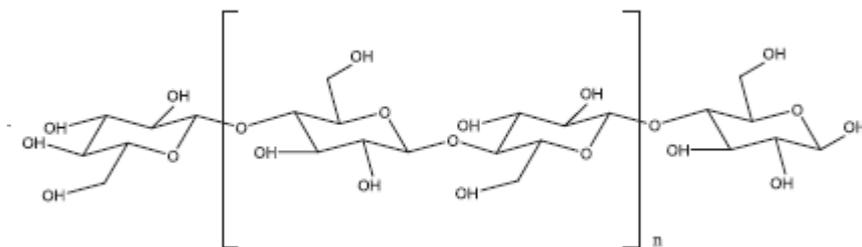


Figura 4. Estrutura da fração celulósica de materiais lignocelulósicos.

Por isso, é imprescindível o uso de pré-tratamentos no material, com o intuito de aumentar sua susceptibilidade ao agente de interesse, pela remoção da lignina e redução da cristalinidade da estrutura celulósica (73). Os tratamentos utilizados podem proporcionar melhoras significativas ao material lignocelulósico, obtendo-se uma maior capacidade de imobilização ou até uma posterior hidrólise enzimática mais eficiente, devido ao aumento da porosidade, de um maior contato com a área superficial e do número de ligações químicas entre a enzima e o suporte (74).

4.2.7.2. Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho com grupos glutaraldeído

Para ativação dos suportes com grupos glutaraldeído, foram necessários 4 passos: primeiramente a criação de “braço espaçador” entre a enzima e a celulose inserindo um grupo gliceril, por sua vez, este gliceril foi oxidado formando o grupo glioxil, posteriormente aminado e por fim agrupado com glutaraldeído. Etapas que estão representadas na Figura 3 seguindo metodologias descritas por Guisán (75) e Betancor (76).

4.2.7.3. Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho gliceril

Inicialmente, os suportes utilizados na imobilização foram ativados com grupos gliceril em suas estruturas, nos quais na presença do reagente borohidreto de sódio (NaBH_4) em meio alcalino ocorre a eterificação por meio do glicidol (2,3-epoxi-propanol), segundo metodologia de Guisán (19) adaptada no laboratório de enzimologia. Com a transformação dos grupos hidroxilas presentes nos suportes em grupos gliceril, sendo este o objetivo principal, a inserção de um “braço espaçador” no suporte, gerando grupos gliceril.

Os suportes agarose e pó de sabugo de milho foram lavados abundantemente, com água destilada e secos a vácuo. A cada 105 g de suporte, foram misturados 30 mL de água (ultrapura) e 50 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 1,7 M. Para cada mL de NaOH, adicionou-se 28,5 mg de NaBH_4 (borohidreto de sódio). Após completa dissolução, 36 mL de glicidol foram adicionados vagarosamente, para que a temperatura da solução não

ultrapassasse 25°C assim não ocorrendo perda do agente redutor por liberação de hidrogênio (77) e por 18 horas foi mantida em agitação (120 rpm).

O procedimento foi mantido em banho de gelo, pelas primeiras duas horas de reação após adição do glicidol. No dia seguinte, o suporte foi lavado exaustivamente com água ultrapura e filtrado a vácuo.

4.2.7.4. Preparo dos suportes agarose e pó de sabugo de milho glioxil

Após formação de grupos gliceril, o suporte foi submetido a oxidação com uma solução de periodato de sódio (NaIO_4) 0,2 M por 90 minutos, ocorrendo a ruptura destes grupos formando o grupo glioxil (aldeídos). Estes grupos, tem a função de orientar a imobilização da enzima por meio de sua área de superfície onde contém maior quantidade de grupamentos amino. O suporte foi lavado abundantemente filtrado novamente. Para cada 1 g de suporte, foram adicionados 10 mL de uma solução que continha 2 mL de NaIO_4 com 8 mL de água. A quantificação de grupos aldeídos presentes na superfície dos suportes ativados, foi determinada pela concentração de periodato (IO_4^-) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril, segundo Pereira (78):

O periodato não consumido durante a reação de oxidação dos grupos gliceril reage com iodeto (I^-) em excesso, gerando iodo na forma do íon (I_3^-), que por meio da cor é possível ser quantificado (colorimetria). O cálculo realizado pela diferença no consumo de periodato de sódio no instante da sua adição ao suporte gliceril ao final da reação (90 minutos), indica a formação de grupos aldeídos na superfície dos suportes. Por ser uma reação estequiométrica, ao final do processo (oxidação) é possível quantificar os

grupos glioxil formados. Através da titulação com iodeto de potássio 10% (KI) segundo Nevell (79).

4.2.7.5. Preparo dos suportes agarose e pó de sabugo de milho manae (monoamiletil-N-aminoetil)

Após a formação dos grupos aldeídos, na etapa anterior, os suportes sofreram reação com etilenodiamina (EDA) seguida da adição de borohidreto de sódio (NaBH_4) que no final são obtidos grupos amino primários (conversão dos grupos glioxil em grupos amino) em suas superfícies.

Os suportes glioxil anteriormente obtidos sofreram reação com etilenodiamina (EDA) 2 M, em pH 10 por duas horas, sob agitação suave (100 rpm). Em seguida, adicionou-se NaBH_4 , mantendo por mais duas horas em agitação. Ao final do período, os suportes foram lavados abundantemente com tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4 seguido de água destilada também em abundância (80,81). Nestas condições, a conversão de grupos glioxil em grupos amino atingiu 100%, conforme descrito por Guisán et al. (82) e Fernández-Lafuente et al. (83). Observação: a ativação a grupos amino foi realizada exclusivamente para a obtenção do suporte glutaraldeído.

4.2.7.6. Preparo dos suportes agarose e pó de sabugo de milho glutaraldeído

E por fim, a reação com o glutaraldeído em tampão fosfato de sódio, para formação de dímeros de glutaraldeído na superfície dos suportes para uma posterior imobilização. Esta última etapa é necessária para que haja ligações estáveis entre a enzima e o suporte, assim ocorrendo uma maior interação,

por sua vez, melhor fixação da enzima com a superfície do suporte durante as condições de imobilização.

Aos suportes AG-amino e SM-amino (preparados conforme tópico anterior), foi adicionado uma solução de glutaraldeído 25% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7 e mantidos em agitação suave (100 rpm) durante 14 horas a temperatura ambiente. Para cada 10 g de suporte, 11,1 mL de tampão fosfato e 16,75 mL de glutaraldeído foram necessários.

Após o tempo de reação (14h), os suportes foram lavados abundantemente com água destilada e filtrados a vácuo por funil sinterizado (76).

4.2.8. Imobilização da invertase nos suportes SM-glutaraldeído e AG-glutaraldeído

A imobilização da enzima invertase nos dois diferentes suportes (AG-GLU e SM-GLU), ocorreu com três diferentes cargas de unidades enzimáticas (14,2 U; 28,3 U e 56,6 U), totalizando seis derivados enzimáticos glutaraldeído. A proporção utilizada para imobilização, foi de 1mL de extrato enzimático para 9 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 em 1 g de suporte (peso úmido).

A imobilização da enzima foi realizada em uma solução tampão fosfato de sódio pH 7, onde ocorre a interação entre os grupos reativos da enzima (grupo amino terminal) com os grupos reativos do suporte (grupos aldeído) e formação de ligação covalente. A mistura da solução tampão junto do extrato enzimático e o suporte de imobilização, foi mantida em temperatura aproximadamente a 25°C e em agitação suave (100 rpm) para que assim

houvesse a imobilização da enzima. Mas, para verificar se a imobilização estava ocorrendo, foi previamente separado 1mL da solução de enzima mais o tampão sem a presença do suporte, nas mesmas condições de imobilização, visando monitorar o efeito do pH sobre a atividade da enzima livre (controle). Para acompanhar o processo de imobilização, a atividade enzimática do sobrenadante de imobilização e da solução de enzima (controle) foram determinados em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 minutos) até que a atividade do sobrenadante fosse reduzida até atividade constante, sendo essa redução da atividade enzimática a imobilização das enzimas ao suporte como demonstrada na Figura 5 a seguir. Finalizada a imobilização, os derivados foram lavados com água destilada em abundância e armazenados para posterior caracterização.

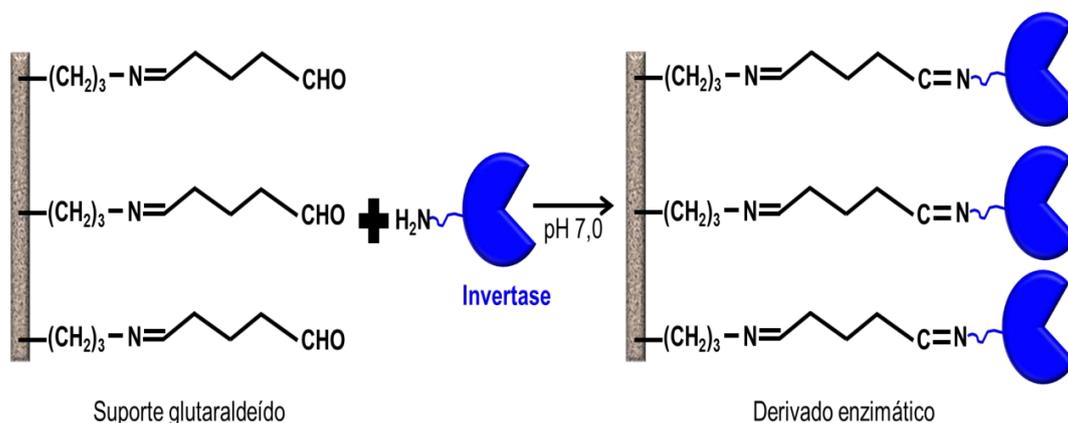


Figura 5. Processo de imobilização da invertase nos suportes ativados com glutaraldeído. Fonte: Bassan, 2015.

4.2.8.1. Rendimento de imobilização (%)

A quantidade percentual da enzima invertase imobilizada aos suportes (AG-GLU e SM-GLU), foi calculada pelo rendimento de imobilização (RI) conforme a equação 1.

$$RI(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (1)$$

Onde: **A** é a atividade enzimática da solução utilizada para imobilização, tampão fosfato junto do extrato enzimático (controle) e **B** é a atividade encontrada no sobrenadante, ou seja, uma alíquota da solução na qual a enzima não se ligou ao suporte durante o processo de imobilização.

4.2.8.2. Atividade recuperada (%)

A atividade recuperada (AR), baseia-se no quanto a atividade enzimática modificou-se após a imobilização da enzima solúvel ser realizada. Foi calculada pela razão entre atividade enzimática encontrada na suspensão no final do processo de imobilização e a atividade inicial da alíquota de solução de imobilização retirada e utilizada como controle. Cálculo realizado de acordo com a seguinte equação:

$$AR(\%) = \frac{C}{A} \times 100\% \quad (2)$$

Onde: **A** é a atividade enzimática da solução utilizada para imobilização (controle), e **C** é a atividade da suspensão obtida no final do processo de imobilização.

4.2.9. Caracterização cinética dos derivados enzimáticos

4.2.9.1. Atividade enzimática

A atividade dos derivados foi determinada conforme metodologia descrita e realizada anteriormente com a enzima livre (item 4.2.1.2.), modificando somente a massa (10 µg) dos diferentes derivados (Equação 3).

$$\frac{U}{g} = \frac{\sum \text{absorbância}}{\varepsilon(\mu\text{mol}) \times \sum \text{tempo}(\text{min.}) \times \text{massa do derivado} (g)} \quad (3)$$

4.2.9.2. Estabilidade térmica e tempo de meia vida

A estabilidade térmica foi determinada por meio da incubação de 2 g dos respectivos derivados enzimáticos ao meio reacional tamponado (Acetato de sódio 50 mM pH 5 sem substrato) a 60°C e por tempos determinados (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos) foram retirados e filtrados 10 mg dos derivados incubando-se novamente ao meio reacional tamponado (2,9 mL) agora na presença do substrato (20% m/v), pH 5 a 50°C para determinação de sua atividade.

O cálculo do tempo de meia vida foi necessário para determinar o fator de estabilização (FE) conferido à enzima após a sua imobilização o qual pode ser calculado pela razão entre o tempo de meia vida do derivado e o tempo de meia vida da enzima solúvel (equação 4):

$$\mathbf{FE} = \frac{\text{meia vida}_{(\text{derivado})}}{\text{meia vida}_{(\text{enzima solúvel})}} \quad (4)$$

4.2.9.3. Efeito de altas concentrações de substrato sobre a atividade dos derivados

Foi realizado um teste referente ao comportamento dos derivados, submetendo-os a altas concentrações de substrato, a fim de se comparar a uma condição industrial. Para isso, os derivados enzimáticos foram incubados em solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 com concentrações de 20%, 40% e 60% (m/v) de sacarose. As reações de micro bateladas foram realizadas a uma temperatura de 50°C por 40 minutos.

4.2.9.4. Reuso dos derivados estabilizados em sistema de tanque agitado em modo descontínuo (batelada)

Do total de seis derivados obtidos, somente dois derivados AG-GLU (28,3 U) e SM-GLU (28,3 U) foram escolhidos para dar sequência aos experimentos (derivados estabilizados). Estes derivados foram submetidos a 10 ciclos de reuso, em sistema descontínuo (batelada) em tubo de ensaio com agitação, nos quais uma mesma massa (5 g em 20 mL de solução tampão) de cada derivado foi avaliada quanto a eficiência catalítica a cada novo ciclo de reuso pelo uso do ácido DNS. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 2, 4 e 8 horas de reação utilizando como substrato sacarose 20% (m/v) em solução tampão acetato de sódio 50mM. As reações foram conduzidas nas condições de máxima atividade (pH 5 a 50°C).

4.2.9.5. Reuso dos derivados estabilizados em sistema de leito fixo em modo contínuo

Para o sistema contínuo, o mesmo tampão reacional padrão foi utilizado, como descrito no sistema descontínuo citado anteriormente. Mudando somente a quantidade de derivado utilizada (60g peso seco).

O volume útil do reator utilizado para as operações com os derivados AG-GLU e SM-GLU foi de 223 mL e 177 mL de tampão substrato, respectivamente. A vazão da bomba de diafragma para o derivado AG-GLU foi de 111,5mL/h e para o derivado SM-GLU foi de 88,5 mL/h. Esses volumes variaram devido às diferenças na porosidade e hidrofiliicidade de cada material suporte. O reator enzimático encamisado manteve a temperatura de 50°C para as reações, por meio de um banho termostatizado (Figura 6).



Figura 6. Reator enzimático de leito fixo e modo de operação contínuo com fluxo ascendente com bomba de alimentação e banho termostatizado acoplados. Fonte: Próprio autor.

Os ciclos de reuso consistiram de repetições da operação do reator (2h) em modo contínuo de forma a aumentar o tempo de utilização do derivado

cumulativamente até 20h. Ao final de cada ciclo de reuso foi retirada uma alíquota do produto formado para posterior quantificação de açúcares redutores pelo método de Miller (66) e em CLAE, para quantificação dos açúcares de interesse (glicose, frutose e sacarose).

4.2.9.6. Aplicação dos derivados estabilizados para a produção de açúcar invertido em sistema de tanque agitado de modo descontínuo (batelada) em três diferentes tempos de reação

Os derivados foram submetidos mais uma vez por um sistema descontínuo no qual se utilizou duas concentrações fixas de substrato solução de sacarose 10% e 20% (m/v), em tampão acetato de sódio 50 mM, com tempo determinado para retirada de uma alíquota da reação (4, 8 e 12h), determinando suas atividades.

A relação substrato: derivado foi de 20 mL da solução de sacarose e 5 g de derivado (m/v) em erlenmeyer por meio de um sistema operacional no qual foi utilizado um banho de agitação termostatizado (120 rpm/50°C).

4.2.10. Determinação de açúcares por CLAE

Para a análise cromatográfica, os hidrolisados obtidos das reações em reatores de tanque agitado e leito fixo (itens 4.2.9.4 e 4.2.9.5) foram diluídos de 100 a 200 vezes, em acetonitrila e água ultrapura (75:25 v/v). As soluções foram filtradas em membranas hidrofílicas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm (φ13 mm, Millipore Millex -HV) e injetadas no sistema cromatográfico. Foi utilizado um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-Nexera XR CBM - 20A, Shimadzu). A fase móvel usada foi uma mistura de acetonitrila: água 75:25 (v/v), na vazão de 1,0 mL min⁻¹ empregando uma

coluna Shim-pack CLC-NH₂ (M) (4,6 x 250 mm, 5 µm, Shimadzu), mantida a 30°C. A identificação foi realizada baseando-se nos tempos de retenção e adição de padrões à amostra. A quantificação foi feita por padronização externa utilizando-se curvas de calibração analíticas construídas a partir das áreas dos picos cromatográficos, empregando-se seis concentrações da mistura dos padrões. A concentração dos açúcares totais foi dada somando-se as áreas individuais de cada pico da corrida cromatográfica.

4.2.11. Cromatografia em Camada Delgada

Foi realizada a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com os hidrolisados obtidos no item (4.2.9.6). Na qual primeiramente, foi preparado o sistema de solvente (cuba cromatográfica) contendo acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico 88% e H₂O na proporção 9:3:1:4 (v/v/v/v), para um total de 125 mL de solução. Em seguida, foram colocadas tiras de papel filtro para que houvesse a saturação dos solventes na cuba. Antes da aplicação das amostras, a folha de sílica gel (cromatofolha-alumínio CCF-CC/25, 20x20) Merck®, foi ativada a 105°C por 6 minutos. Em seguida, após o resfriamento da folha, houve a aplicação das amostras, utilizando capilares de vidro, na parte inferior da folha, aplicando-se a amostra e concentrando-a com o uso de secador. E por fim, colocada no sistema de solvente. Para a visualização das substâncias, foi utilizada o corante orcinol 0,2% em ácido sulfúrico e metanol na proporção 1:9 (v/v) respectivamente (84).

5. Resultados e Discussão

5.1. Dosagem de proteínas

A figura 6, apresenta a curva analítica para dosagem de proteínas utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (64,65) método no qual se obteve uma absorvidade de $\epsilon = 2,2552 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

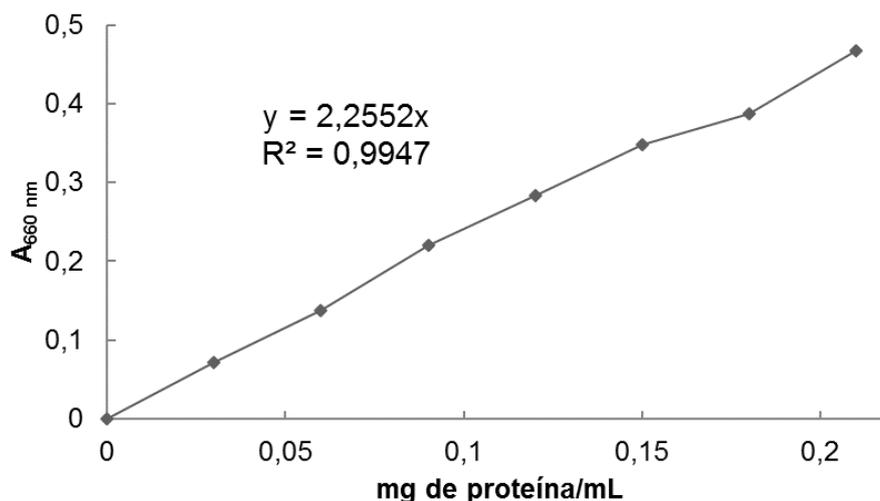


Figura 7. Curva analítica de soroalbumina para determinação de proteína segundo método de Lowry (64), modificado por Hartree (65).

5.2. Dosagem de açúcares redutores

Nesta curva, observou-se que há linearidade entre as concentrações utilizadas, permitindo a determinação do coeficiente de extinção molar da glicose de acordo com a Lei de Lambert- Beer. O valor de $\epsilon = 0,1845 (\mu\text{mol}/0,5 \text{ mL})^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ou $(92,25 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$ foi encontrado (Figura 8), que corresponde à tangente do ângulo de inclinação da reta. E a partir deste coeficiente, foi realizado a dosagem com o uso do ácido DNS de açúcares redutores, que são os produtos liberados pela enzima invertase, determinando-se assim, a sua atividade enzimática.

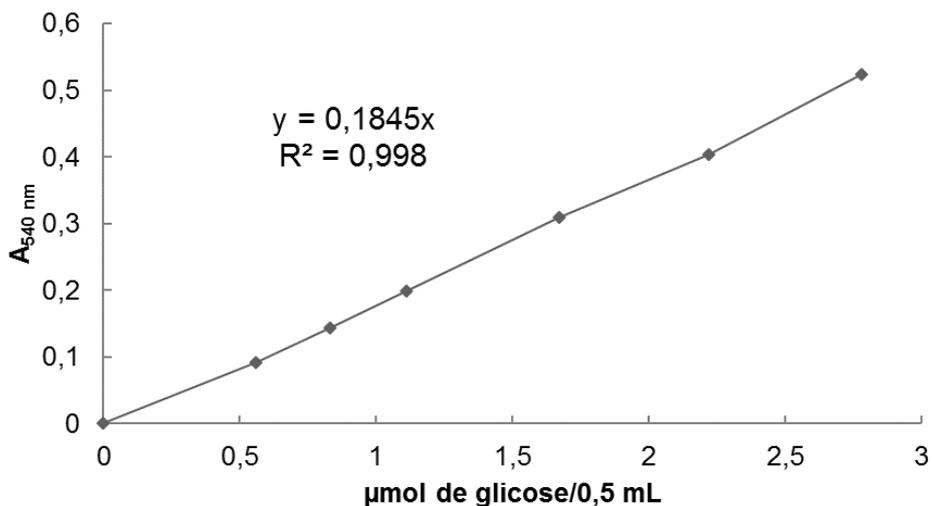


Figura 8. Curva Analítica de glicose determinada pela quantificação de açúcares redutores formados, utilizando o ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), segundo método de Miller (66).

5.3. Caracterização cinética da enzima solúvel

Na tabela 1, estão apresentados os resultados obtidos para enzima solúvel.

Tabela 1. Dosagem do teor de proteínas, a atividade e a atividade específica da enzima invertase solúvel (extrato enzimático).

Proteína (mg.mL ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg de proteína ⁻¹)
1,58±0,01	28,33±2,30	15,23±0,01

O teor de proteína encontrado, neste estudo, foi ligeiramente maior que o encontrado por Caravante (45), que foi de 1,5 mg/mL. A autora supracitada utilizou o mesmo método de extração das enzimas, isto é, por meio de maceração manual intensa com adição de éter etílico.

5.3.1. Determinação da atividade enzimática

Após obtenção do extrato enzimático descrito no item 4.2.2, houve a homogeneização de todo o extrato obtido, seguido de sua atividade enzimática.

Caravante (45), em seu estudo, obteve uma atividade enzimática em torno de 160,4 U/mL para a enzima purificada, enquanto que Santos (85) observou uma atividade de 46,51 U/mL. Nos dois estudos utilizou-se o mesmo tipo de extração. Toralles et al, (86) obtiveram uma atividade de 30,04 U.mg⁻¹ também se fazendo o uso da levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) a 40°C.

5.3.2. Determinação do pH e temperatura de máxima atividade da enzima solúvel:

O pH e temperatura de máxima atividade determinados para a enzima invertase foram muito semelhantes aos encontrados por Santos (85). Neste estudo o extrato enzimático apresentou uma atividade máxima no intervalo de pH 5 - 6 e temperatura de 50°C (Figura 9), semelhante também ao estudo de Toralles et al, (86) com a caracterização parcial da invertase.

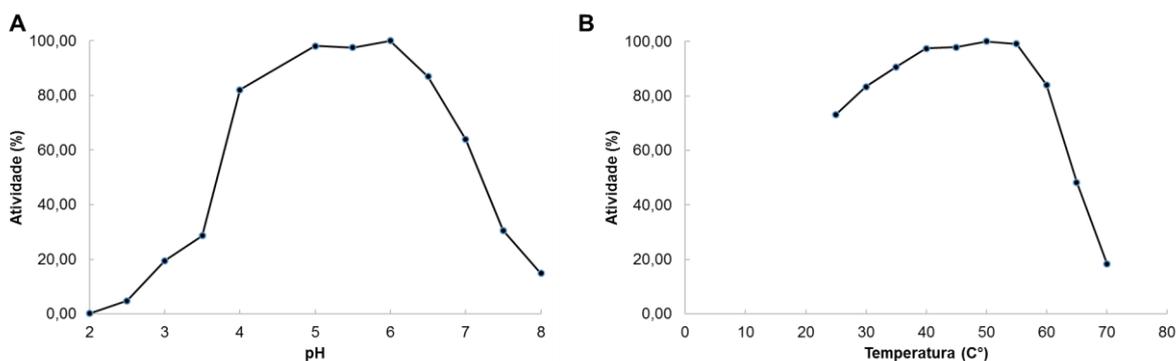


Figura 9. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática da invertase solúvel.

Pode-se observar na Figura 8 A que apesar da invertase ter um pH de máxima atividade entre 5 e 6, há também uma boa atividade enzimática (>80%) no intervalo de 4,0 a 6,5. E na faixa de pH acima de 7,0 a invertase mostrou-se bastante instável, alcançando uma perda de 85% de sua atividade inicial. Esse perfil de estabilidade ao pH foi bastante semelhante ao encontrado por Goulart *et al.* (87) e Santos (85).

A determinação dessas variáveis foi fundamental para a escolha das condições experimentais das etapas seguintes. O pH e a temperatura exercem grande influência sobre a estabilidade da estrutura terciária de uma proteína, ou seja, podendo provocar desnaturação irreversível e conseqüentemente perda de atividade enzimática. Para cada enzima há um determinado valor de pH que está relacionado à capacidade de alguns resíduos de aminoácidos estarem ou não ionizados, sendo a manutenção desse estado de ionização determinante para a manutenção da estrutura ativa de uma proteína (88). Ainda com relação ao pH, este também poderá afetar as condições de reação envolvidas no processo de imobilização, pois interfere na capacidade da enzima em se ligar ao suporte.

Assim como o pH, a temperatura também é importante para que se possa utilizar uma enzima em condições em que se tenha a máxima eficiência catalítica e máxima conversão de substrato em produto. De acordo com Vu e Le (89), a enzima invertase é uma glicoproteína, bastante estável a 50°C.

Essa condição é favorável quando se visa a aplicação dessa enzima em processos de biotransformação, pois é possível usá-la em sua temperatura de máxima atividade (50°C) sem influenciar sua estabilidade. Neste estudo a

enzima invertase apresentou uma excelente atividade (>90%) no intervalo de 35°C a 60°C. Por outro lado, perdeu 81,8% de sua atividade inicial quando submetida a temperatura acima de 70°C.

5.3.3. Determinação das constantes K_M e $V_{m\acute{a}x}$ aparentes

Na Figura 10 está representado o gráfico de Michaelis-Menten para ensaios cinéticos com a enzima solúvel.

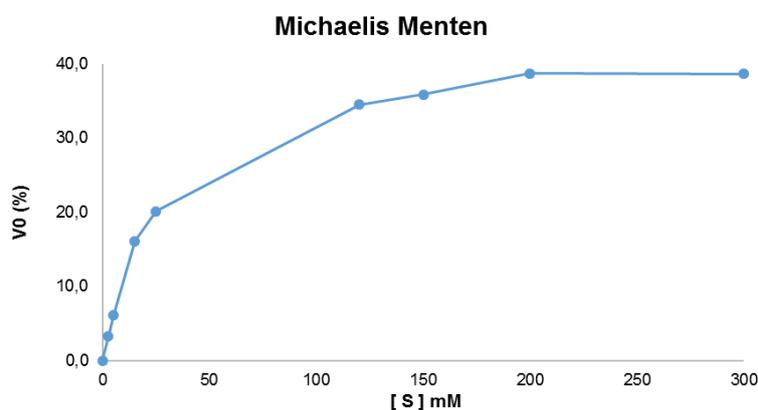


Figura 10. Efeito da concentração de sacarose nas velocidades iniciais de cada ensaio da invertase (Gráfico de Michaelis-Menten da enzima invertase solúvel).

Como pode ser observado, a invertase solúvel apresentou uma cinética típica Michaeliana. Nessa cinética, concentrações baixas de substrato a velocidade inicial aumenta quase linearmente conforme o aumento da concentração de substrato, e que por um momento acaba mantendo uma velocidade (estável), não aumentando em resposta ao aumento da concentração (substrato). Sendo esse patamar alcançado (de velocidade inicial) um valor muito próximo ao da velocidade máxima da reação (90). As constantes cinéticas de Michaelis - Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$)

aparentes foram calculadas por meio da linearização de Lineweaver-Burk, conforme mostra a Figura 11.

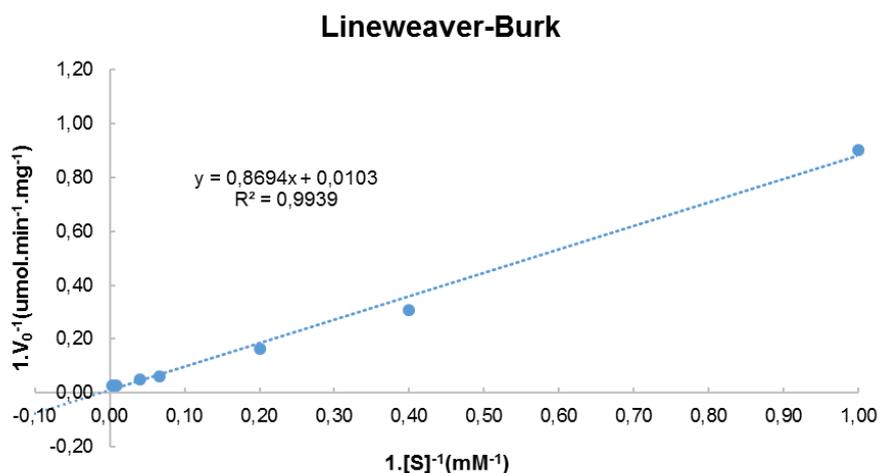


Figura 11. Determinação das constantes Michaelis Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) aparentes da enzima solúvel.

Os valores aparentes determinados para as constantes cinéticas da enzima invertase solúvel foram K_M , $V_{m\acute{a}x}$ foram de 84,41 mM e 97,08 U.mg.Prot⁻¹ respectivamente. Giraldo (91), obteve um K_M de 22,73 mM e velocidade máxima de 178,57 U.mg⁻¹ e utilizando a invertase produzida por *A. terreus*. Que também foi próximo ao Toralles et al., (86) que encontraram um K_M aparente de 23,98 mM e um $V_{m\acute{a}x}$ de 47,31 U.mg⁻¹.

5.4. Ativação dos suportes AG-GLU e SM-GLU

5.4.1. Preparo dos suportes agarose-glioxil e pó de sabugo de milho glioxil

Após a preparação dos suportes ativados à gliceril (grupos presentes na superfície dos suportes), houve reação de oxidação ocorrendo a ruptura dos grupos gliceril a grupos glioxil conforme resultados apresentados na tabela 2:

Tabela 2. Quantidade em μmol de grupos reativos por grama de agarose e pó de sabugo de milho.

Suportes	NaIO₄ oferecido (μmol)	NaIO₄ consumido (μmol)
AG-glioxil	200	132,2
SM-glioxil	200	149,78

Obs: AG= agarose; SM= pó de sabugo de milho.

A dosagem do consumo de periodato de sódio ao longo do processo de reação é necessário, pois está relacionada a ruptura dos grupos gliceril, formando os grupos aldeídos alifáticos na superfície dos suportes. A transformação dos grupos gliceril em grupos glioxil teve uma média de consumo em torno de 65%, mostrando a quantidade de grupos reativos (μmol) por g de AG e SM.

5.4.2. Formação dos suportes agarose-Amino (AG-amino), pó de sabugo de milho-Amino (SM-amino), agarose-glutaraldeído (AG-GLU) e pó de sabugo de milho-glutaraldeído (SM-GLU).

As duas etapas seguintes de formação dos suportes amino e glutaraldeído são estequiométricas em relação ao número de NaIO₄ consumidos na reação de formação dos grupos glioxil, como mostrados na Tabela 2.

5.4.3. Perfil de Imobilização

A imobilização da invertase nos suportes AG-GLU (Figura 11 A) e SM-GLU (Figura 11 B), foi acompanhada pela redução da atividade enzimática do sobrenadante da solução de imobilização durante 240 minutos. Com o intuito de verificar o efeito do pH de imobilização sobre a estabilidade da enzima, foi

também realizado um acompanhamento da atividade por meio de um controle, ou seja, uma fração da solução de imobilização que não estava em contato com o suporte ativado. Para efeito de cálculo a atividade enzimática no tempo zero foi tomada como 100% para todos os casos.

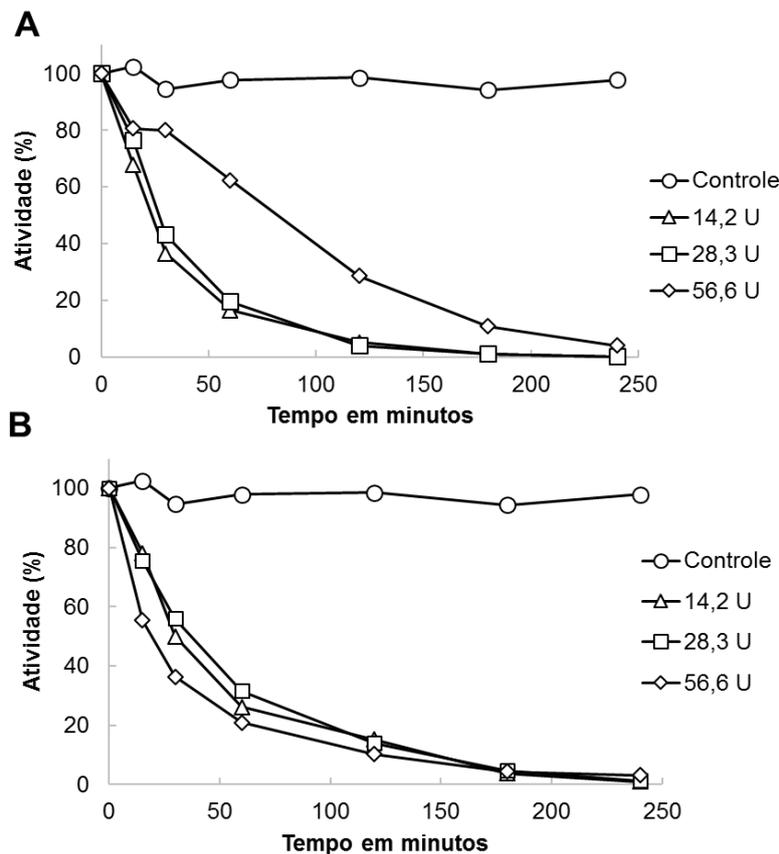


Figura 12. Atividade enzimática referente a imobilização da invertase nos dois suportes AG-GLU (A) e SM-GLU (B).

Foi possível observar Figuras 12 A e 12 B que os perfis de imobilização para os diferentes suportes foram bastante semelhantes. Para o suporte SM-GLU (11 B), as diferentes quantidades de unidades enzimáticas oferecidas obtiveram um rápido perfil de imobilização, ocorrendo nas três concentrações, imobilização maior a 85% já nos primeiros 120 minutos de reação. Quando

oferecido 14,2 e 28,3 unidades enzimáticas (U) para o suporte AG-GLU houve um rendimento >90% de imobilização durante os 240 minutos de reação.

Também pode ser observado que a partir de 180 minutos de imobilização não houve grandes variações na atividade do sobrenadante e por isso foi determinado o fim do processo e outros trabalhos também mostram que a imobilização de enzimas em suportes ativadas com glutaraldeído ocorre rapidamente e normalmente com cerca de 2 a 3 horas. O que pode ser explicado de acordo com Betancor *et al.*, (76) é que o dímero (glutaraldeído) promove uma imobilização mais rápida devido ser um “braço maior”, entre o suporte e a enzima, diminuindo a rigidez da movimentação da enzima. E que há uma interação intramolecular rápida entre os nucleófilos da enzima e o glutaraldeído, se houver utilização de baixa força iônica na reação de imobilização.

5.5. Caracterização cinética dos derivados

5.5.1. Rendimento de imobilização e Atividade Recuperada dos derivados

Foram caracterizados todos os seis derivados, inicialmente observando os rendimentos de imobilização e atividade recuperada, assim como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento de imobilização e Atividade recuperada dos derivados AG-GLU e SM-GLU.

Supports	Unnits offered per gram	IY ^{a*} (%)	EA ^{b**} (%)	TA ^c (U.g ⁻¹)	RA(U.g ⁻¹)
AG-GLU	14,2 U	83,6	92,4	9,0	6,5
AG-GLU	28,3 U	83,3	67,3	13,1	7,8
AG-GLU	56,6 U	62,1	80,2	23,6	18,7
SM-GLU	14,2 U	75,4	29,6	2,6	1,7
SM-GLU	28,3 U	73,2	33,4	5,7	3,8
SM-GLU	56,6 U	66,69	20,6	6,4	4,8

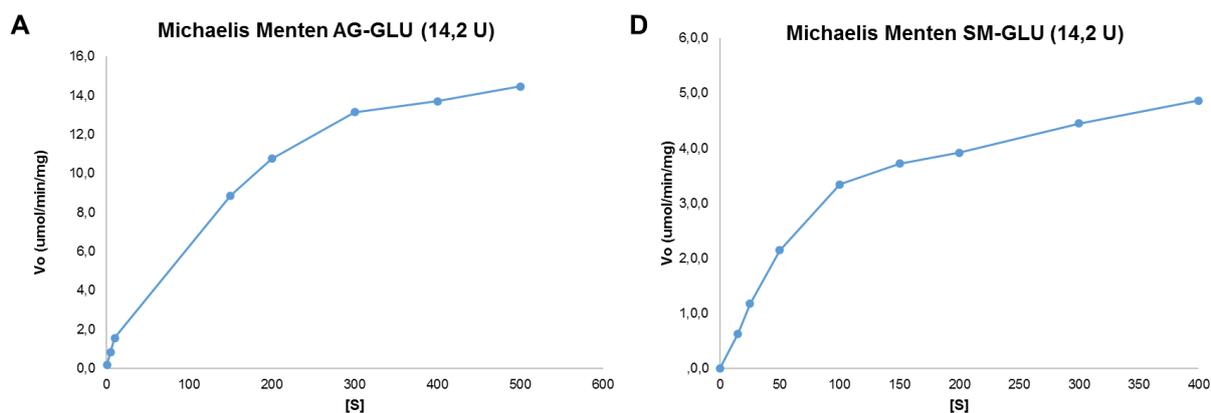
***RI (rendimento de imobilização); **AR (atividade recuperada)**

De acordo com a Tabela 3, os resultados apresentados na tabela indicam uma boa taxa de imobilização para ambos os suportes, entretanto a atividade recuperada foi melhor para a AG-GLU. Com a finalidade de aplicar o pó de sabugo de milho como suporte de baixo custo e por meio dos resultados apresentados, o derivado escolhido para aplicação na produção de açúcar invertido foi o SM-GLU 28,3U. A escolha foi determinada baseada na RI e AR as quais não aumentaram proporcionalmente entre os derivados obtidos a partir de 28,3 e 56,6U. Para efeito comparativo foi utilizado o derivado AG-GLU correspondente a mesma concentração de enzima. Os resultados indicam que um fator relevante para a imobilização é a geometria do suporte (área de superfície e porosidade). Conformidade descrito por Bassan et al (2016), o pó de sabugo de milho apresenta maior acessibilidade para as partículas menores que 100 Angstroms. Por outro lado, a enzima invertase tamanho de a= 268,66; b=268,66 e c=224,54 Angstroms, sendo muito maior do que os poros do suporte, dificultando sua entrada no interior dos poros. Este fato sugere que a imobilização ocorreu mais na superfície das partículas, o que pode explicar a menor taxa de imobilização. Somado a este

fato, a menor AR encontrada para o SM-GLU pode ser compensada quando os derivados são submetidos a altas concentrações de substrato onde a alta pressão osmótica aparentemente provoca danos mecânicos a estrutura polimérica da agarose, enquanto que o derivado pó de sabugo de milho mantém estável sua capacidade de produzir açúcares invertidos.

5.5.2. Determinação das constantes de Michaelis Menten (K_M) e Velocidade máxima de reação (V_{max}) aparentes dos derivados

Pode ser observado uma cinética típica Michaeliana para todos os derivados, conforme o aumento da concentração, houve maior velocidade de reação, até a estabilização da velocidade em concentração máxima de 600 mM de substrato (Figura 13).



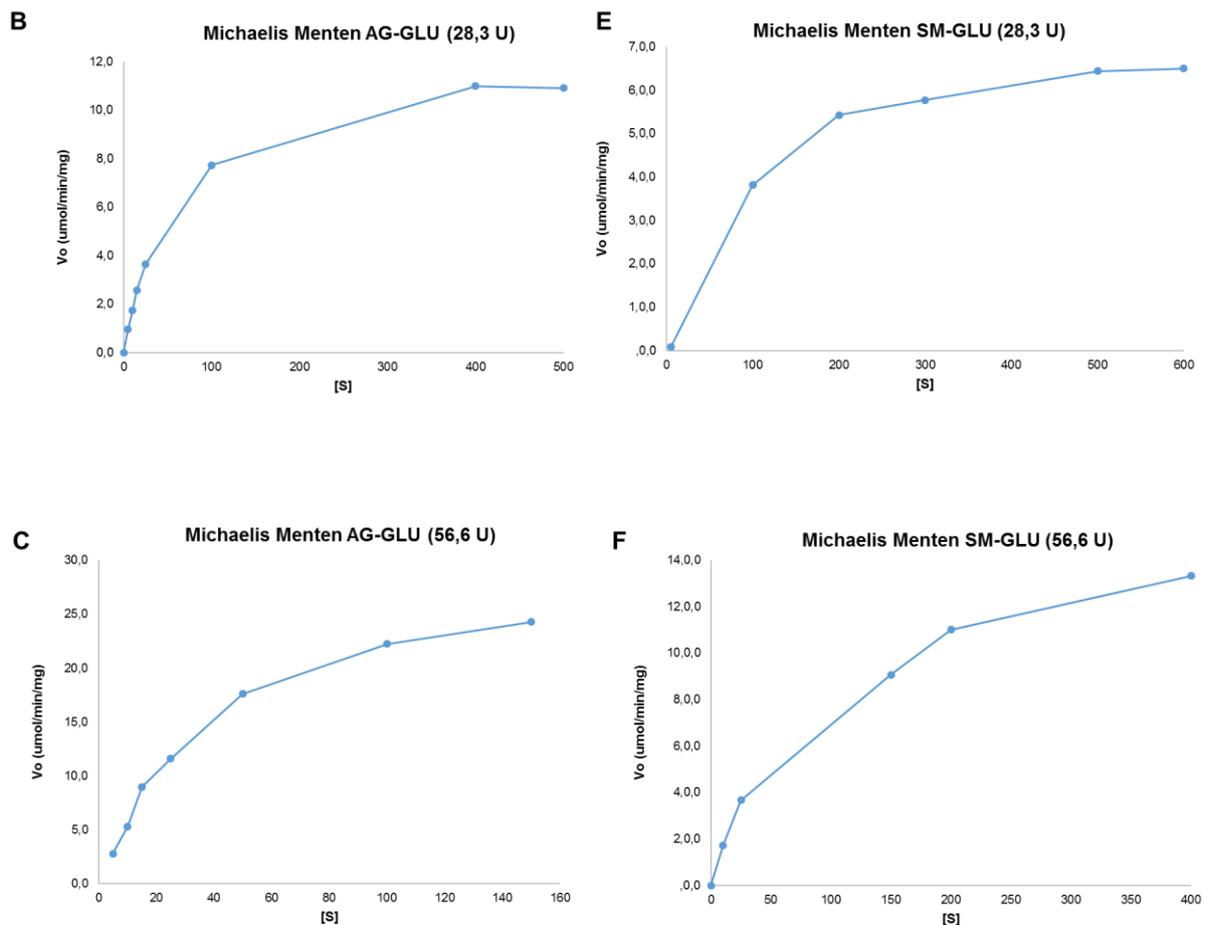


Figura 13. Variação das concentrações iniciais de sacarose com suas respectivas velocidades iniciais dos diferentes derivados. (A) AG-GLU 14,2 U; (B) AG-GLU 28,3 U; (C) AG-GLU 56,6 U; (D) SM-GLU 14,2 U; (E) SM-GLU 28,3 U; (F) SM-GLU 56,6 U.

As constantes cinéticas de Michaelis - Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) aparentes dos derivados foram calculadas por meio da linearização de Lineweaver-Burk, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Valores de K_M e V_{max} aparentes dos derivados seguido da percentagem de imobilização de cada derivado.

	Lineweaver-Burk		
	K_M (mM)	V_{max} (umol.min.mg)	% Imobilização
Enzima Livre	84,41	97,08	
SM-GLU(14,2 U)	109,72	6,46	75,81
SM-GLU(28,3 U)	196,82	7,91	73,90
SM-GLU(56,6 U)	74,75	14,68	57,11
AG-GLU(14,2 U)	92,82	16,10	71,64
AG-GLU(28,3 U)	58,86	12,30	80,43
AG-GLU(56,6 U)	74,90	45,25	62,20

A constante de Michaelis Menten (K_M) mostra a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o valor de K_M , mais afinidade a enzima tem com o substrato. Duas características muito importantes na especificidade da enzima: O substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem a enzima, e para que a reação ocorra, essa união acaba permitindo o seu alinhamento correto no sítio ativo específico (92,93).

Como observado na Tabela 5, os derivados que obtiveram uma melhor afinidade de suas enzimas com o seu substrato, foram AG-GLU (28,3 U) e SM (56,6 U), com os menores valores de K_M determinados. Os derivados SM-GLU obtiveram valores de K_M superiores, resultando numa menor afinidade. A hipótese, é que o sabugo de milho apresenta uma geometria e porosidade distintas (4 partes: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula) conforme estudo Santos (85), quando comparados a agarose (polímero de galactose em sua estrutura) cujas unidades são cadeias de agarobiose (77).

As enzimas imobilizadas em pó de sabugo de milho podem estar localizadas em regiões mais profundas e espalhadas por todas as camadas do suporte, ou estejam ligadas de forma contrária impedindo também o acesso total do substrato ao sítio catalítico (problemas de difusão).

Sanjay & Sugunan (94) obtiveram para a enzima invertase solúvel um K_M de 9,1 mM e V_{max} de 18,04 U.mg.Prot⁻¹. Emregul et al., (19) obtiveram valores de 86 mM e 166 mM para invertase comercial livre e imobilizada respectivamente, alegando que houve um limite no acesso da sacarose ao sítio ativo da invertase imobilizada em gelatina e mistura de poliacrilamida, e que pelo fato de sua distribuição ser ao longo da superfície do polímero utilizado na imobilização houve uma modificação conformacional.

5.5.3. Estabilidade térmica e tempo de meia vida da enzima solúvel e dos derivados (AG-GLU e SM-GLU).

O estudo da estabilidade térmica de uma enzima pode ser afetada de vários modos, como temperatura, pH, estresse oxidativo, presença de surfactantes, ligações de íons metálicos ou cofatores, solventes, etc. Foi comprovado ainda, com exceções, que as enzimas com alta estabilidade térmica também se tornam mais resistentes a outros fatores desnaturantes (95). Pode ser observado na Figura 14 que em apenas 30 minutos de reação, a atividade da enzima solúvel diminuiu drasticamente reduzindo 80% a sua atividade em relação a atividade inicial. Nessas condições, o tempo de meia vida foi de 15 minutos, enquanto Giraldo (91) em seu trabalho obteve uma meia vida igual a 40 minutos para a invertase numa reação a mesma temperatura (60°C).

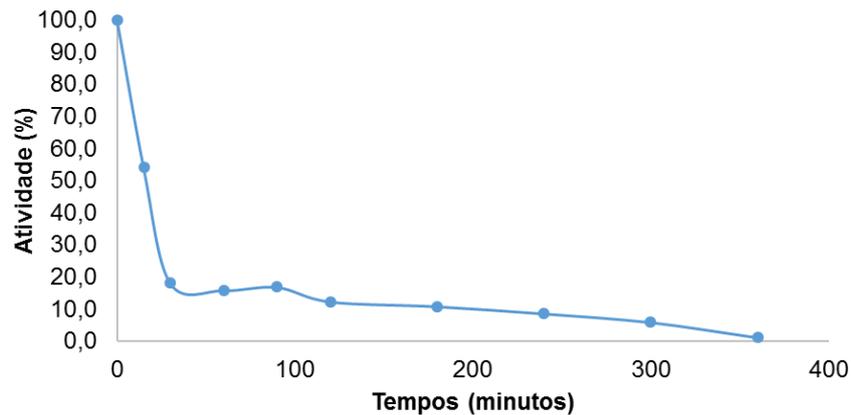


Figura 14. Determinação da estabilidade térmica e do tempo de meia vida da enzima solúvel.

Houve uma perda de atividade quase total (em torno de 90%) em apenas 2 horas de reação a 60°C. Resultado bem aproximado ao de Sanjay & Sugunan (94), que relataram uma atividade da invertase de 10% em relação a atividade inicial em uma hora e meia de reação a 60°C.

Conforme as Figuras 15 A e 15 B pode-se observar que em comparação a enzima solúvel (Figura 14), todos os derivados obtiveram uma maior estabilidade frente a uma temperatura fora de suas condições de máxima atividade. Mostrando que a imobilização, aumentou a estabilidade da enzima.

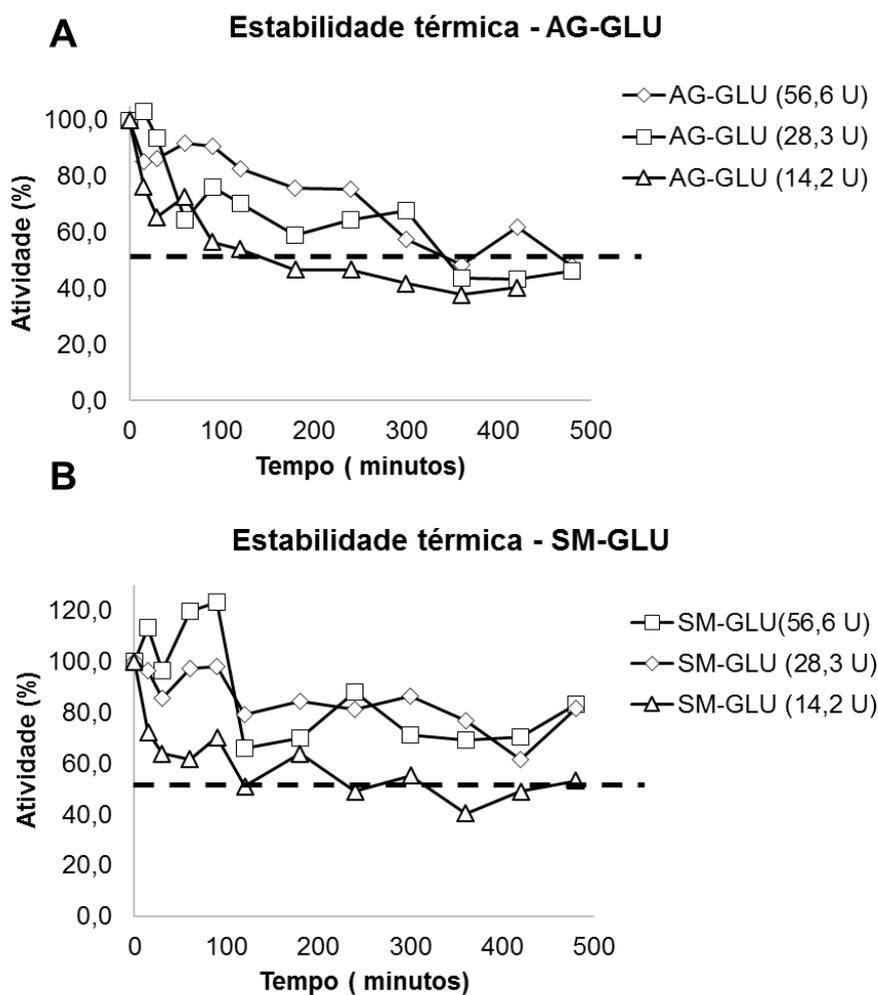


Figura 15. Estabilidade térmica dos diferentes derivados AG-GLU e SM-GLU. (A) derivados AG-GLU e (B) derivados SM-GLU.

Por meio da Figura 15, é possível observar que a linha tracejada representa 50% da atividade enzimática dos derivados, e que praticamente todos eles obtiveram uma excelente estabilidade frente a uma temperatura acima de sua temperatura de máxima atividade, mantendo uma atividade $\geq 40\%$ até o final das 8 horas de reação total. Diferentemente da enzima solúvel, os derivados apresentaram uma maior estabilidade, mantendo os tempos de meia vida por um tempo maior, sendo de 400 minutos para o SM-GLU e 600 minutos para a AG-GLU.

Somente um derivado AG-GLU (14,2U) obteve uma perda maior de sua atividade enzimática, atingiu uma perda em torno de 60% da atividade inicial no tempo de 6 horas.

Os suportes têm o poder de manter as enzimas seguras de efeitos que causariam sua distorção ou desnaturação diminuindo a sua efetividade catalítica, uma vez que, a temperatura no microambiente onde as enzimas se encontram, é menor em relação a solução total. Já a determinação da estabilidade térmica do derivado SM-GLU, indicou, de um modo geral ser mais estável em relação ao derivado AG-GLU. Os derivados que continham uma maior carga enzimática em 8 horas de reação, não chegaram ao tempo meia vida, diminuindo sua atividade em torno 38% apenas. Uma hipótese, para a queda da atividade enzimática, é que a agarose não consegue manter sua estrutura física, conforme o aumento do tempo de reação à alta temperatura.

Por isso, a importância da determinação da estabilidade da atividade enzimática, pois, é verificada capacidade da enzima na dependência de sua estrutura nativa, que é mantida por meio de forças de interação (pontes de hidrogênio, ligações de sulfeto, forças de Van der Waals, interações apolares e iônicas). O ambiente reacional pode também debilitar essas interações, modificando a estrutura tridimensional, podendo até ocasionar uma perda parcial ou total da sua funcionabilidade biológica. Assim, fazendo com que a estabilidade seja afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares (92,93).

Na Figura 16, estão representadas as estabilidades térmicas de dois derivados escolhidos, um de cada suporte de imobilização AG-GLU (28,3 U)

e SM-GLU (28,3 U) até a obtenção de uma perda quase total de suas respectivas atividades enzimáticas. E para fim de comparação, a atividade da enzima solúvel também foi plotada.

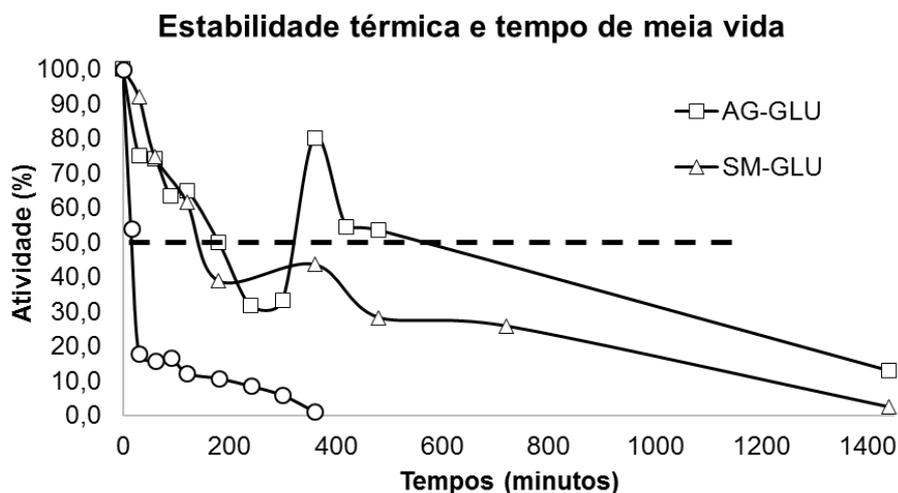


Figura 16. Efeito da temperatura sobre a atividade (%) da enzima solúvel e dos derivados.

Conforme a Figura 16, a enzima solúvel obteve uma perda em torno de 90% de sua atividade enzimática em 4 horas de reação, enquanto os derivados mantiveram uma estabilidade maior perdendo sua atividade quase total após 24 horas de reação.

O cálculo da meia vida foi necessário para determinar o fator de estabilização (FE) conferido à enzima após a sua imobilização, que resulta da razão entre o tempo de meia vida do derivado e o tempo de meia vida da enzima livre. A imobilização da invertase nos suportes AG-GLU e SM-GLU promoveu uma melhora no fator estabilidade de 0,083 e 0,042 vezes respectivamente.

Houve uma maior resistência da enzima imobilizada a uma temperatura de 10 graus acima da sua temperatura de máxima atividade, quando

comparado a enzima solúvel. O derivado AG-GLU no final de uma reação de 24h ainda manteve uma atividade de 15% de sua atividade inicial, já o SM-GLU manteve apenas 3% da sua atividade. O que pode ser confirmado no fator estabilidade, que foi maior para o derivado AG-GLU.

Uma das condições que pode ser explicada, é o fato dos derivados manterem uma maior estabilidade à temperatura em comparação a enzima solúvel, enquanto os derivados enzimáticos mantêm as enzimas protegidas em um espaço onde estas não terão tanta movimentação e um acesso total à solução reacional, a enzima livre está totalmente desprotegida, tendo uma mudança em sua estrutura conformacional levando assim a uma rápida desnaturação enzimática.

5.5.4. Efeito de altas concentrações de substrato sobre a atividade dos diferentes derivados.

Conforme pode ser observado na Figura 17 os derivados AG-GLU apresentaram decréscimo de atividade enzimática quando as concentrações de substrato foram gradativamente aumentadas.

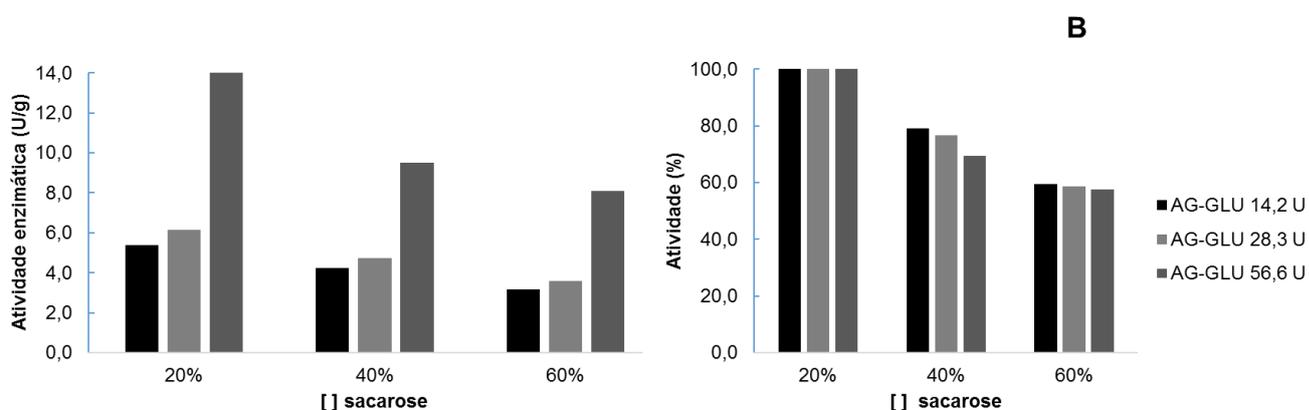


Figura 17. Determinação da atividade (U/g) e atividade (%) dos diferentes derivados AG-GLU nas diferentes concentrações de substrato (20%, 40% e 60%).

Como já descrito anteriormente, é possível notar um declínio gradativo da atividade enzimática, de todos os derivados AG-GLU, uma redução entre 20-30% para a segunda maior concentração de sacarose e redução em torno de 40% para a de maior concentração de substrato. Esse fenômeno não foi observado para os derivados SM-GLU quando expostos as concentrações de sacarose de 20% e 40% nos quais as atividades mantiveram-se praticamente inalteradas, havendo apenas decréscimo quando incubados na concentração de 60% (Figura 18). Resultado diferente foi obtido em relação ao derivado SM-GLU, é que este manteve uma excelente atividade enzimática $\geq 96\%$ para todos os derivados em todas as concentrações de substrato. Chegando a uma redução da atividade enzimática de apenas 27%, nas demais concentrações de sacarose.

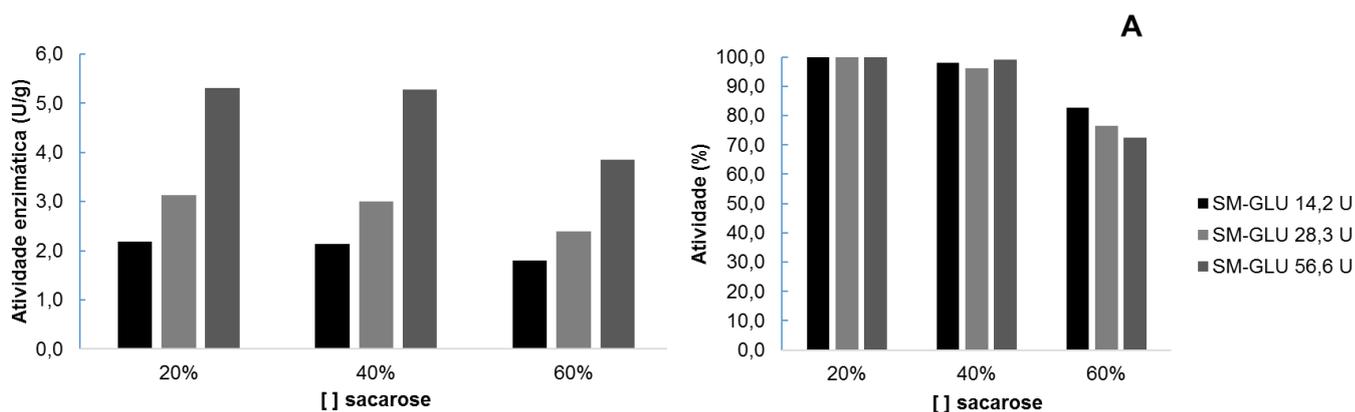


Figura 28. Determinação da atividade (U/g) e atividade (%) dos diferentes derivados SM-GLU nas diferentes concentrações de substrato (20%, 40% e 60%).

A atividade enzimática pode ser minimizada pelo efeito de inibição por parte do substrato, que é causado pelo excesso de substrato, quando um segundo substrato se liga ao complexo (ES), formando um complexo denominado (ESS). Sendo este segundo substrato o inibidor da reação (96).

De acordo com estudo de Bowski et al,(97) no qual verificaram que a invertase pode ser inibida pelo substrato e água, que em concentrações acima de 0,29 M, as moléculas de sacarose não estão completamente hidratadas, levando a interações que viram aglomerados impedindo a chegada até o sítio ativo da enzima.

Na literatura existem outros trabalhos que também reportam que a invertase pode sofrer uma inibição anticompetitiva por altas concentrações de substrato (98). Trata-se de um mecanismo segundo o qual ocorre ligação reversível entre substrato e a enzima quando em altas concentrações de sacarose (99). Além da inibição por altas concentrações de substrato, a invertase em um meio com excesso de produto pode apresentar atividade de

transglicosilação formando conjugados glicosídicos que também podem afetar sua atividade (100–102).

5.5.5. Reuso dos derivados SM-GLU e AG-GLU em sistema descontínuo

Os derivados foram submetidos a ciclos de reuso por meio de um sistema descontínuo (batelada), conforme metodologia melhor descrita no item 4.2.9.4 na seção de material e métodos.

A Figura 19 apresenta as conversões (%) obtidas nos tempos (2h, 4h e 8h) determinados para cada derivado.

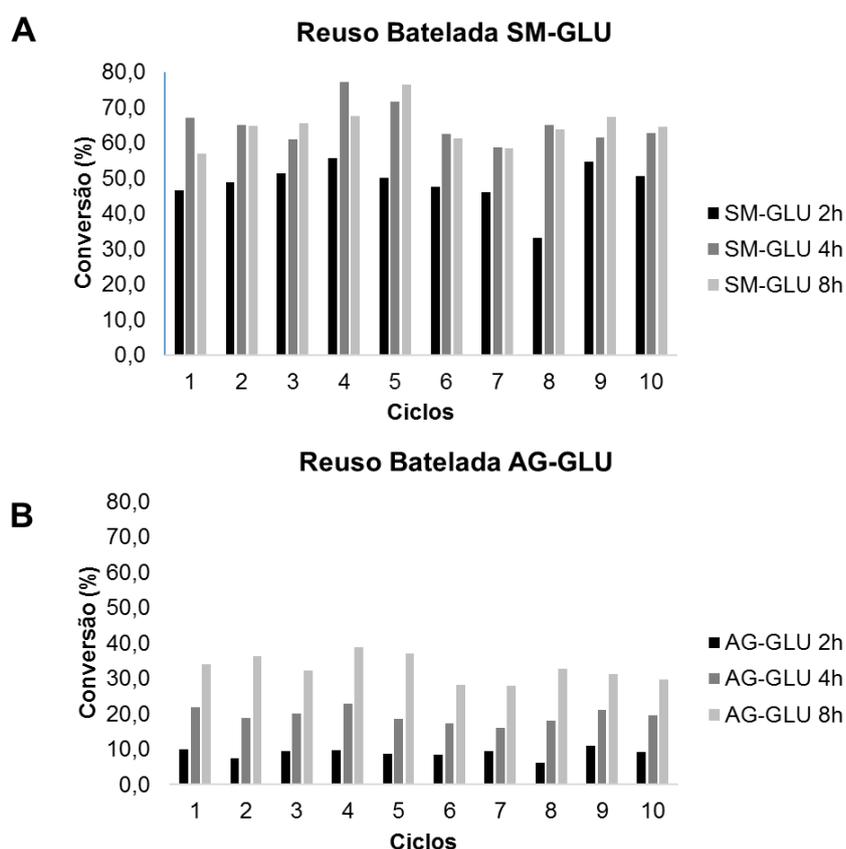


Figura 39. Conversões (%) obtidas a partir do reuso realizado em sistema descontínuo (batelada) AG-GLU e SM-GLU em três tempos diferentes de reação.

De acordo com a Figura 19, houve uma grande diferença nas de conversões de substrato em produto final para os derivados avaliados (AG-GLU e SM-GLU). Utilizando-se o mesmo método de reação, máxima conversão para o derivado AG-GLU foi de 39% em oito horas de reação, enquanto que para o derivado SM-GLU houve praticamente o dobro de conversão 77%, em apenas 4 horas de reação.

As enzimas por estarem com sua mobilidade restringida pelo fato de estarem ligadas aos suportes dificultam o acesso do substrato as mesmas, levando a redução da atividade, provocado por efeitos difusionais, ou seja, uma restrição no acesso da sacarose ao sítio ativo devido a presença das matrizes de imobilização. Tendo um acúmulo de produto ao redor do sítio ativo, afetando a cinética de reação, reduzindo a velocidade de reação ou alterando o pH do microambiente das enzimas (103).

5.5.6. Reuso dos derivados AG-GLU e SM-GLU em sistema contínuo

O reuso dos derivados realizado em reator de leito fixo (modo contínuo), foi detalhadamente descrito no item 4.2.9.5.

Na Figura 20, estão representadas as conversões obtidas com o reuso em sistema contínuo (reator enzimático) do derivado AG-GLU. Para efeitos de comparação entre métodos, o hidrolisado obtido após a reação no reator enzimático, foi analisado pelo método de Miller (1959) para quantificação de açúcares redutores utilizando-se o ácido DNS, e analisado por cromatografia líquida (CLAE), para quantificação dos mesmos açúcares.

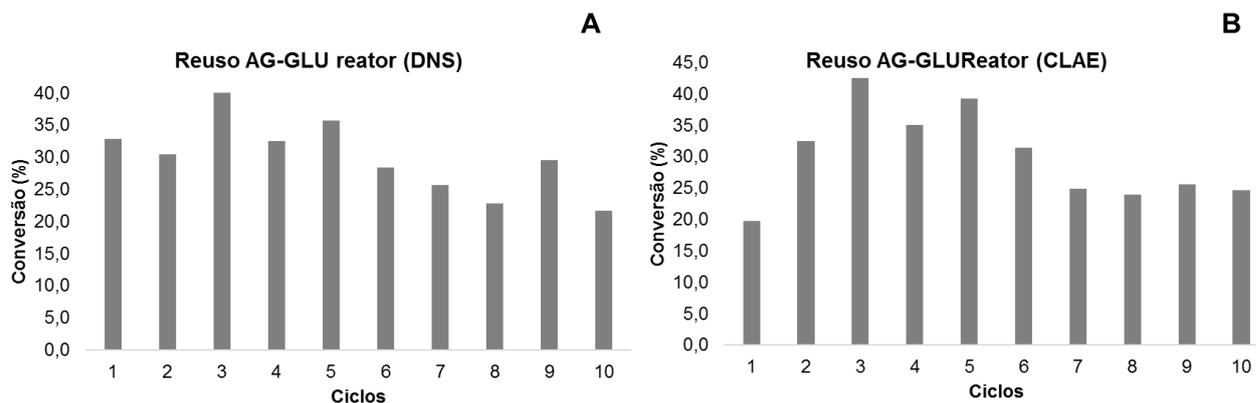


Figura 20. Representação das conversões obtidas por meio do reator enzimático de leito fixo (sistema contínuo) do derivado AG-GLU, analisadas por dois métodos de quantificação de açúcares redutores. (A) DNS; (B) CLAE.

A quantificação dos açúcares redutores, por ambos os métodos foi bem próxima, confirmando a precisão de diferentes metodologias para a quantificação do mesmo produto.

A conversão de sacarose em glicose e frutose do derivado AG-GLU, com o uso deste reator em específico, foi de 30%, em média, em ambos os métodos de quantificação. Uma hipótese que explicaria esse valor relativamente baixo no reator enzimático poderia ser a resistência a transferência de massa própria de um reator de leito empacotado com partículas de diâmetro muito pequeno, resultando assim, nessa taxa de hidrólise bem mais baixa que as observadas nas micro bateladas com agitação. Outra razão seria de que os derivados sofreram uma pequena movimentação, ocorrendo elevação do derivado conforme a entrada do substrato, resultando numa interação menor do substrato com as enzimas imobilizadas. A Figura 21, mostra as determinações das conversões obtidas

agora para o derivado SM-GLU. O hidrolisado resultante foi analisado pelos mesmos métodos: DNS e CLAE.

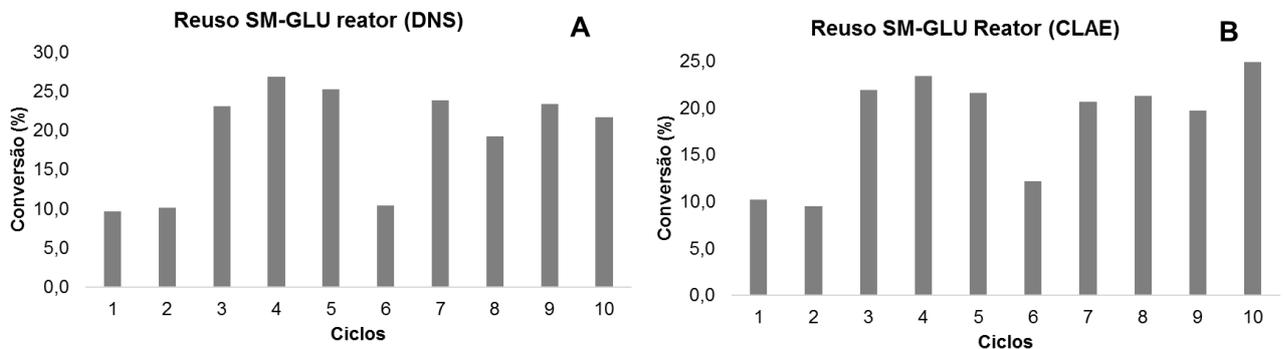


Figura 21. Representação das conversões obtidas por meio de reator enzimático de leito fixo (sistema contínuo) do derivado SM-GLU, analisadas por dois métodos de quantificação de açúcares redutores. (A) DNS; (B) CLAE.

A conversão para o derivado SM-GLU, foi de 19%, em média, o que representou um valor menor de conversão de sacarose em glicose e frutose em relação ao derivado AG-GLU. Presume-se que o mesmo problema de resistência à transferência de massa tenha ocorrido nesse caso. A Figura (Figura 22) dos reatores enzimáticos e os respectivos derivados durante a reação de hidrólise mostra um elevado grau de empacotamento e a formação de zonas mortas devido a inexistência de agitação dentro do reator.

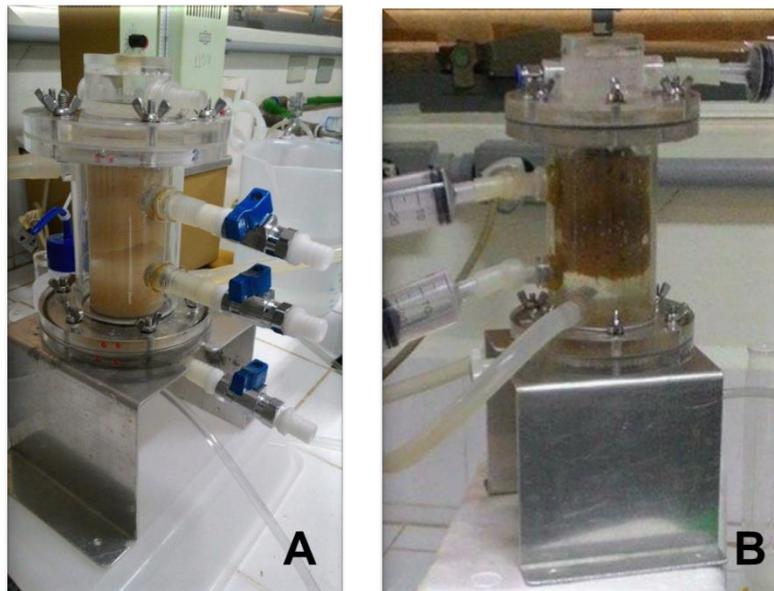


Figura 22. Reatores enzimáticos com seus respectivos derivados. AG-GLU (A); SM-GLU (B).

Conforme observado na Figura 22, o derivado SM-GLU, sendo menos denso que o derivado AG-GLU, foi elevado até o nível superior do reator.

Dessa forma teve maior contato com o substrato ao final das duas horas de reação impostas pela vazão do reator. A ausência de movimentação do derivado enzimático fez com que as enzimas imobilizadas não entrassem em contato com substrato pelo tempo de reação planejado. No caso do derivado AG-GLU, um melhor e maior contato do substrato com as enzimas pode ter ocorrido pela imobilização das mesmas somente na superfície do suporte. Em ambos os suportes, possivelmente houve limitação de transferência de massa. Especificamente no sabugo o efeito mais pronunciado devido a imobilização dentro dos poros onde o substrato do meio reacional tem de chegar até o sítio catalítico da enzima que por sua vez está presente muitas vezes no interior da matriz de imobilização.

Outra hipótese aventada foi a falta de derivado enzimático para que houvesse um completo preenchimento do espaço reacional do reator por inteiro.

5.5.7. Aplicação dos derivados otimizados (estabilidade e eficiência) para a produção de açúcar invertido em reator de tanque agitado (batelada) em três diferentes tempos de reação:

A Figura 23, apresenta as conversões (%) obtidas da determinação de atividade enzimática dos derivados AG-GLU e SM-GLU, em sistema descontínuo realizado com duas concentrações de sacarose diferentes.

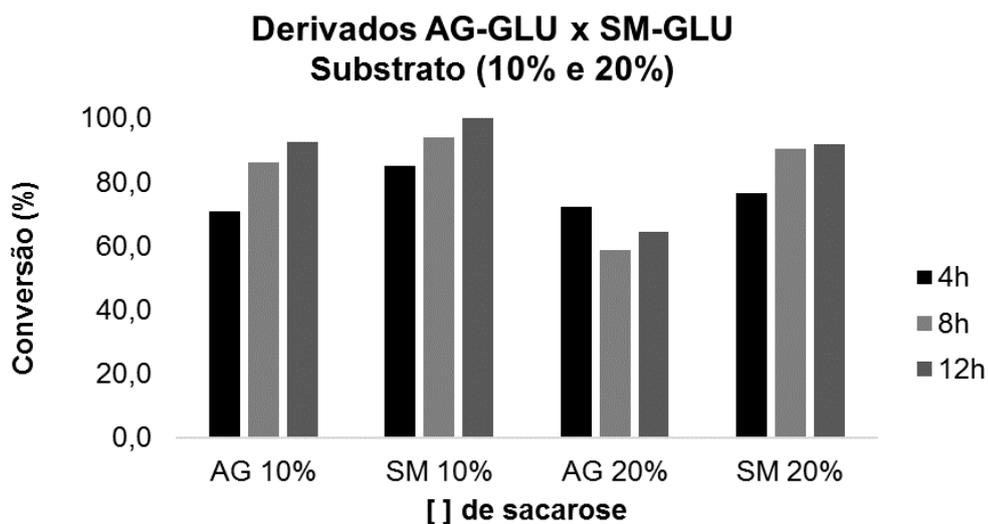


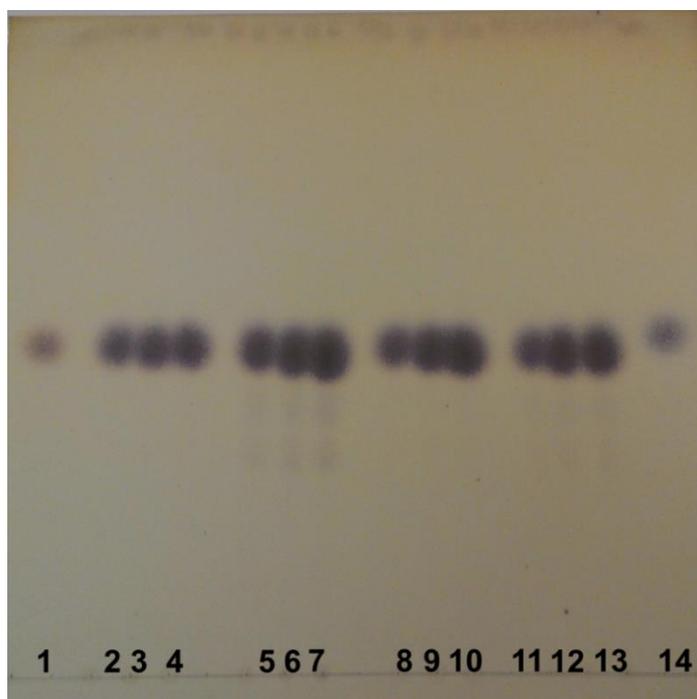
Figura 23. Conversão (%) dos derivados AG-GLU e SM-GLU submetidos a diferentes concentrações de sacarose (10% e 20% m/v).

Conforme observado na figura 23, pode se notar que as maiores conversões de substrato em produto foram do derivado SM-GLU, nas duas concentrações de sacarose, obtendo uma conversão $\geq 76\%$. Observou-se um pequeno declínio na conversão (em média de 6%) quando submetidos à maior concentração de sacarose. Já para o derivado AG-GLU, a queda nessa

conversão foi maior (média de 19%). O fato da menor concentração de substrato gerar uma conversão maior, deve-se à não interferência dos seus produtos gerados, ao contrário da concentração maior de sacarose, que gera uma enorme quantidade de glicose e frutose as quais começam a interferir na ação das enzimas durante a reação de hidrólise, tornando a conversão mais lenta por um processo de inibição por excesso de substrato (inibição pelo substrato).

5.5.8. Cromatografia em camada delgada

Os produtos de hidrólise obtidos na reação em sistema de tanque agitado (batelada) em modo descontínuo no item 4.2.9.6, foram aplicados em folha de sílica gel. A Figura 24 apresenta a presença dos açúcares hidrolisados.



Legenda: 1- Padrão glicose; 2-4 AG-GLU 10%; 5-7 AG-GLU 20%; 8-10 SM-GLU 10%; 11-13 SM-GLU 20%; 14- Padrão frutose.

Figura 24. Corrida cromatográfica, dos produtos obtidos das reações de hidrólises com as diferentes concentrações de sacarose.

O que pode observado qualitativamente, é a presença dos açucares glicose e frutose, conforme os padrões utilizados nas extremidades. E que nos derivados aos quais foram submetidos uma maior concentração de sacarose (20% m/v), pode ser observado um resquício aparente, podendo ser a sacarose que não foi completamente hidrolisada durante as reações de batelada.

6. Conclusão

A extração da enzima invertase por um método físico de abrasão manual foi importante, pelo fato de não se utilizar métodos mais complexos com usos de equipamentos sofisticados encarecendo o procedimento;

Foi possível realizar a imobilização da enzima invertase em pó de sabugo de milho glutaraldeído (SM-GLU), por sua vez ocorrendo a hidrólise da sacarose assim gerando o açúcar invertido;

Os derivados enzimáticos obtidos apresentaram maior estabilidade a temperatura, a estabilidade térmica (60°C), aos ciclos de reuso, a altas concentrações de substrato, comparados a enzima invertase solúvel;

O melhor derivado que obteve uma maior conversão de substrato em produto (glicose e frutose) em sistema descontínuo, foi o SM-GLU com uma média de 90% de hidrólise enzimática.

O suporte pó de sabugo milho, é uma alternativa mais barata e pode ser considerada de grande relevância quando comparada a agarose, sendo um resíduo agroindustrial de fácil obtenção e custo bem reduzido, é uma alternativa sustentável também. Ocorrendo aproveitamento de um subproduto que seria descartado e podendo ser de forma errônea tornando-se prejudicial ao meio ambiente, ou simplesmente utilizada na forma de ração animal. Como esse suporte tem grande potencial, é interessante que haja uma continuidade nos estudos com esse resíduo e não simplesmente descartado.

Em resposta aos reatores na reação enzimática, as maiores conversões foram obtidas no reator de tanque agitado de modo descontínuo (batelada);

As conversões de substrato em glicose e frutose, utilizando o reator enzimático de leito fixo não atingiram 100%, mas os resultados obtidos possibilitarão que estudos futuros aprimorem a cinética do uso do reator, aumentando a conversão.

De forma geral, o presente trabalho pode ser utilizado como fonte para que trabalhos futuros aprimorem o estudo com o reator enzimático (sistema de modo contínuo) objetivando trabalhos em escalas industriais que seriam de grande avanço na tecnologia do estudo com enzimas imobilizadas, buscando um melhor método e uma eficácia que gere produtos de qualidade com custo e benefício a todos.

Referências

1. Kim DY, Kumar V, Kumar U. Relationship between quality management practices and innovation. *J Oper Manag* [Internet]. 2012;30(4):295–315. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jom.2012.02.003>
2. Rodrigues MVN, Rodrigues RAF, Serra GE, ANDRIETTA SR, Franco TT. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. *Ciênc Tecnol Aliment* ., 2000 Campinas Apr.; 20 (1):103-9.
3. Kumar S, Chauhan VS, Nahar P. Invertase embedded-PVC tubing as a flow-through reactor aimed at conversion of sucrose into inverted sugar. *Enzyme Microb Technol*. 2008;43(7):517–22.
4. Marques PRBDO, Yamanaka H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quim Nova*. 2008;31(7):1791–9.
5. Kotwal SM, Shankar V. Immobilized invertase. *Biotechnol Adv*. 2009;27(4):311–22.
6. Marquez LDS, Cabral B V., Freitas FF, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. *J Mol Catal B Enzym*. 2008;51(3–4):86–92.
7. Cadena PG, Jeronimo RAS, Melo JM, Silva RA, Filho JLL, Pimentel MCB. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresour Technol*. 2010;101(6):1595–602.
8. Gava AJ, Silva CAB, Frias JR. *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel; 2008. 511 p.
9. Safarik I, Sabatkova Z, Safarikova M. Invert sugar formation with *Saccharomyces cerevisiae* cells encapsulated in magnetically responsive alginate microparticles. *J Magn Magn Mater*. 2009;321(10):1478–81.
10. Canli O, Erdal S, Taskin M, Kurbanoglu EB. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2011;27(1):35–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713431>
11. Lorenzoni ASG, Aydos LF, Klein MP, Ayub MAZ, Rodrigues RC, Hertz PF. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2015;111:51–5. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.002>

12. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Industrial - Produto 2011. Pesquisa Industrial. 2013. p. 188.
13. Blanchard PH, Geiger ED. Production of high fructose corn syrup in the USA. *Sugar Technology Rev.* 1984;11:1–94.
14. Chou CC, Jasovsky GA. Advantages of Ecosorb TM precoat in liquid sugar production. *Int Sugar J.* 1993;95:425–30.
15. Vujčić Z, Miloradović Z, Milovanović A, Božić N. Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. *Food Chem.* 2011;126(1):236–40.
16. Bergamasco R, Bassetti FJ, De Moraes FF, Zanin GM. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Brazilian J Chem Eng.* 2000;17(4):873–80.
17. Coutinho Filho U, Ribeiro EJ, Maugeri Filho F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. *An do Simpósio Nac Ferment 2005.* 2005;
18. Mansfeld J, Schellenberger A, R?mbach J. Application of polystyrene-bound invertase to continuous sucrose hydrolysis on pilot scale. *Biotechnol Bioeng.* 1992;40(9):997–1003.
19. Emregul E, Sungur S, Akbulut U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chem.* 2006;97(4):591–7.
20. Amaya-Delgado L, Hidalgo-Lara ME, Montes-Horcasitas MC. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chem.* 2006;99(2):299–304.
21. Raj L, Chauhan GS, Azmi W, Ahn JH, Manuel J. Kinetics study of invertase covalently linked to a new functional nanogel. *Bioresour Technol.* 2011;102(3):2177–84.
22. Karkaş T, Önal S. Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. *Biochem Eng J.* 2012;60:142–50.
23. Mendes AA, De Castro HF, Andrade GSS, Tardioli PW, Giordano RDLC. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. *React Funct Polym.* 2013;73(1):160–7.
24. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Vol. 40, *Enzyme and Microbial Technology.*

2007. p. 1451–63.
25. Reddy A, Maley F. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J Biol Chem*. 1996;271(24):13953–8.
 26. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. Vol. 353, *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2011. p. 2885–904.
 27. Christopher LP, Hemanathan Kumar, Zambare VP. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. Vol. 119, *Applied Energy*. 2014. p. 497–520.
 28. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2013;42(15):6223–35. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60075K>
 29. Alnoch R, Rodrigues de Melo R, Palomo J, Maltempo de Souza E, Krieger N, Mateo C. New Tailor-Made Alkyl-Aldehyde Bifunctional Supports for Lipase Immobilization. *Catalysts* [Internet]. 2016;6(12):191. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4344/6/12/191>
 30. Zwirter de Oliveira IRW, Fernandes SC, Vieira IC. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41(2):366–72.
 31. Zhang B, Weng Y, Xu H, Mao Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(1):61–70.
 32. Soumanou MM, Pérignon M, Villeneuve P. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. Vol. 115, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2013. p. 270–85.
 33. Dalla-Vecchia R, Nascimento MDG, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. In: *Química Nova*. 2004. p. 623–30.
 34. Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F, et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol*. 2006;39(2):274–80.
 35. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2009;38(2):453–68. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B711564B>
 36. Ma J, Zhang L, Liang Z, Zhang W, Zhang Y. Recent advances in

- immobilized enzymatic reactors and their applications in proteome analysis. Vol. 632, *Analytica Chimica Acta*. 2009. p. 1–8.
37. Zhang C, Xing XH. Enzyme Bioreactors. In: *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*. 2011. p. 319–29.
 38. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol*. 2013;6(4):185–205.
 39. Liese A, Seelbach K, Wandrey C. *Industrial Biotransformations, Second Edition*. Industrial Biotransformations, Second Edition. 2006. 1-556 p.
 40. Liese A, Hilterhaus L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2013;42(15):6236. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs35511j>
 41. Brena BM, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes. *Immobilization of Enzyme and Cells*. 2006. 15-30 p.
 42. Azodi M, Falamaki C, Mohsenifar A. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon. *J Mol Catal B Enzym*. 2011;69(3–4):154–60.
 43. Banerjee S, Mudliar S, Sen R, Giri B, Satpute D, Chakrabarti T, et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: Technology bottlenecks and possible remedies. Vol. 4, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2010. p. 77–93.
 44. Murugan S, Arnold D, Pongiya UD, Narayanan PM. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State Fermentation. *Enzyme Res* [Internet]. 2011;2011:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/696942/>
 45. Caravante ALC. Ana lucia chung caravante uso de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho para produção de açúcar invertido. Universidade Estadual Paulista - UNESP Araraquara; 2014.
 46. D'souza SF, Godbole SS. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *J Biochem Biophys Methods*. 2002;52(1):59–62.
 47. Brígida AIS, Pinheiro ÁDT, Ferreira ALO, Gonçalves LRB. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008;146(1–3):173–87.
 48. Aguiar CM. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. Dissertação. [Mestrado em Engenharia Química]. Toledo, PR: Universidade

- Estadual do Oeste do Paraná; 2010.
49. Kaliyan N, Morey RV. Densification characteristics of corn cobs. *Fuel Process Technol.* 2010;91(5):559–65.
 50. Ashour A, Amer M, Marzouk A, Shimizu K, Kondo R, El-Sharkawy S. Corncobs as a potential source of functional chemicals. *Molecules.* 2013;18(11):13823–30.
 51. Tamanini C, Celia de Oliveira Hauly M. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. *Semin Ciências Agrárias.* 2004;25(4):315–30.
 52. Ziglio B, Bezerra JRM V, Branco IG, Bastos R, Rigo M. Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho Bread-making with corncob flower. *Rev Ciências Exatas E Nat.* 2007;9:115–28.
 53. Preto EV, Mortoza GL. Geração De Energia Elétrica Utilizando Biomassa. 2010; 92p. Available from: <file:///C:/Users/Francielle/Downloads/02-05-2014-15-08geracao-de-energia-eletrica-utilizando-biomassa.unlocked.pdf>
 54. Chisti Y, Moo-Young M. Improve the performance of airlift reactors. *Chem Eng Prog.* 1993;89(6):38–45.
 55. Jegannathan KR, Abang S, Poncelet D, Chan ES, Ravindra P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. *Crit Rev Biotechnol [Internet].* 2008;28(4):253–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19051104>
 56. Mateo C, Grazu V, Palomo JM, Lopez-Gallego F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat Protoc [Internet].* 2007;2(5):1022–33. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.133>
 57. Freitas FF, Marquez LDS, Ribeiro GP, Brandão GC, Cardoso VL, Ribeiro EJ. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biochem Eng J [Internet].* 2011;58–59(1):33–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.08.011>
 58. Fernandes BS. Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo. USP; 2008.
 59. Liszka MJ, Clark ME, Schneider E, Clark DS. Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions. *Annu Rev Chem Biomol Eng [Internet].* 2012;3(1):77–102. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114239>

60. Balcão VM, Paiva AL, Malcata FX. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. Vol. 18, Enzyme and Microbial Technology. 1996. p. 392–416.
61. Wang X, Liu X, Zhao C, Ding Y, Xu P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. Bioresour Technol. 2011;102(10):6352–5.
62. Silva WC, Teixeira LF, Carvalho AKF, Mendes AA, de Castro HF. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. J Ind Eng Chem. 2014;20(3):881–6.
63. Peixoto G, Saavedra NK, Varesche MBA, Zaiat M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. Int J Hydrogen Energy. 2011;36(15):8953–66.
64. Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem [Internet]. 1951;193(1):265–75. Available from: http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf
65. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 1972;48(2):422–7.
66. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426–8.
67. James Sumner BB, Noback V. THE ESTIMATION OF SUGAR IN DIABETIC URINE, USING DINITROSALICYLIC ACID. JBiolChem [Internet]. 1924; Available from: <http://www.jbc.org/>
68. Villela GG, Bacila M, Tastaldi H. Bioquímica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976. 780p.
69. Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J Biol Chem. 1934;56:658–65.
70. Hayashida S, Yoshioka H. Purification and properties of B-Glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. Agric Biol Chem. 1980;44(8):1729–35.
71. Ferreira Filho EX. Purification and characterization of a P-glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. Can J Microbiol, 1996 Jan.; 42(1):1-5.
72. Coughlan M, McHale A. Purification of B-D-glucoside glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. Methods Enzymol. 1988;160:437–43.
73. Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential

- industrial applications. *Biotechnol Adv.* 1997;15(3-4):583-620.
74. Costa DM. Sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase. Tese. [Doutorado em Engenharia de Processos]. Aracajú, SE: Universidade Tiradentes - UNIT.; 2015.
 75. Guisán JM. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 1988;10(6):375–82.
 76. Betancor L, López-Gallego F, Alonso-morales N, Dellamora G, Mateo C, Fernandez-lafuente R, et al. Glutaraldehyde in Protein Immobilization. A Versatile Reagent. In: *Immobilization of Enzymes and Cells.* 2006. p. 57–64.
 77. Vieira D. Imobilização da enzima xilanase em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação. Universidade Federal de São Carlos; 2009.
 78. Pereira GHA. Estudo da imobilização multipontual da Penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil”, Dissertação. [Mestrado em Engenharia Química]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. Universidade Federal de São Carlos; 1996.
 79. Nevell TP. Determination of uronic acid groups. In: *Methods in carbohydrate chemistry.* 1963. p. 39–42.
 80. Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15(7):546–50.
 81. Benassi VMH, Silva TM Da, Pessela BC, Guisan JM, Mateo C, Lima MS, et al. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;89:93–101.
 82. Guisán JM, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R, García-Junceda E. Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose. *Methods Biotechnol Immobil Enzym Cells.* 1997;1:277–87.
 83. Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Penzol G, Hernández-Justiz O, Irazoqui G, et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. In: *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic.* 1999. p. 181–9.
 84. Fontana JD, Gebara M, Blumel M, Schneider H, MacKenzie CR, Johnson KG. α -4-O-methyl-d-glucuronidase component of xylanolytic complexes. *Methods Enzymol.* 1988;160:560–71.

85. Santos AF. Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho. Dissertação. [Mestrado em Alimentos e Nutrição]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2010.
86. Toralles RP, Kuhn CR, Silva de Sá P, Ruiz WA. Extração e caracterização parcial de invertase de levedura de purê e resíduo de pêssego extraction and partial characterization of invertase of peach puree yeast its residue. Rev Bras Tecnol Agroindustrial. 2014;8:1399–415.
87. Goulart AJ, Benedetti ACEP, Tavano OL, Marques DP, Contiero J, Carmona EC, et al. Multipoint Immobilization of Invertase on Agarose : Stability and Kinetic Properties Multipoint Immobilization of Invertase on Agarose : Stability and Kinetic Properties. Curr Trends Biotechnol Pharm. 2008;2(January):462470.
88. Segel IH. Bioquímica teoria e problemas. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro : Livros Técnicos e Científicos, 1979.; 1979. 527 p.
89. Vu TKH, Le VVM. Biochemical Studies on the Immobilization of the Enzyme Invertase (EC . 3 . 2 . 1 . 26) in Alginate Gel and its Kinetics. 2008;15(1):73–8.
90. Cox MM, Nelson DL. Oxidative Phosphorylation. In: Lehninger Principles of Biochemistry [Internet]. 50th ed. Freeman and Company; 2008. Chapter 19. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/48376766>
91. Giraldo MA. Purificação e Caracterização Bioquímica da Invertase Extracelular Produzida pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus terreus*. Dissertação. [Mestrado em Biotecnologia]. Araraquara: Instituto de Química: UNESP; 2011.
92. Bailey JE, Ollis D, Bailey JE, Ollis DF. Bichemical Engineering Fundamentals . 2nd. ed. New York: McGraw-Hill; 1986.
93. Blanch HW, Clark DS. Principles of catalysis. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker; 1997.
94. Sanjay G, Sugunan S. Invertase immobilised on montmorillonite: Reusability enhancement and reduction in leaching. Catal Commun. 2005;6(1):81–6.
95. Eijsink VGH, GÅseidnes S, Borchert T V., Van Den Burg B. Directed evolution of enzyme stability. Biomol Eng. 2005;22(1–3):21–30.
96. Kim Y, Mosier NS, Ladisch MR. Enzymatic Digestion of Liquid Hot Water Pretreated Hybrid Poplar. 2009;10–2.

97. Bowski L, Saini R, Ryu DY, Vieth WR. Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotechnol Bioeng.* 1971;13(5):641–56.
98. Vásquez-Bahena J, Montes-Horcasitas MC, Ortega-Lopez J, Magana-Plaza I, Flores-Cotera L b. Multiple steady states in a continuous stirred tank reactor : an experimental case study for hydrolysis of sucrose by invertase. *Process Biochem.* 2004;39:2179–82.
99. Chaplin MF, Bucke C. *Enzyme Technology.* Cambridge: Cambridge University Press; 1990. 280 p.
100. Goosen C, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Exo-inulinase of *Aspergillus niger* n402: a hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity. *Biocatal Biotransformation.* 2007;9–11.
101. Du L, Pang H, Hu Y, Wey Y, Huang R. Expression and characterization in *E. coli* of a neutral invertase from a metagenomic library. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:419–428.
102. Zhou J, He L, Gao Y, Han N, Zhang R, Wu Q, et al. Characterization of a novel low-temperature-active, alkaline and sucrose-tolerant invertase [Internet]. Vol. 6, *Scientific Reports.* 2016. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep32081>
103. Pessela BCC, Mateo C, Filho M, Carrascosa A, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α - and β -galactosidases. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(2):242–8.