

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Departamento de Alimentos e Nutrição

ANA LUCIA CHUNG CARAVANTE

**USO DE INVERTASE IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE
MILHO PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**

ARARAQUARA-SP

2014

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Departamento de Alimentos e Nutrição

ANA LUCIA CHUNG CARAVANTE

**USO DE INVERTASE IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE
MILHO PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Goulart

ARARAQUARA-SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C262u Caravante, Ana Lúcia Chung
Uso de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho para produção de açúcar invertido / Ana Lúcia Chung Caravante. – Araraquara, 2014
98 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Antonio José Goulart

1. Açúcar invertido. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Invertase. 4. Imobilização em suporte sólido. I. Goulart, Antonio José, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Ana Lúcia Chung Caravante

Uso de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho para produção de açúcar
invertido

**Comissão Examinadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre**

Prof. Dr. Antonio José Goulart
Departamento de Alimentos e Nutrição
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara
(orientador)

Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
Departamento de Biologia
Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras – USP/Ribeirão Preto

Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara

Data da defesa da dissertação de mestrado: 04 de setembro de 2014

À todos que acreditam na vida.
“Novas folhas, novas flores, na infinita bênção
do recomeço” (Chico Xavier)

Agradecimentos

À Deus, por ser minha estrela guia.

À minha mãe, por sempre estar ao meu lado e acreditar em mim.

Aos meus irmãos e primo, pelos bons momentos e amizade.

Ao meu noivo, pelo amor e força.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio José Goulart, pela amizade, oportunidade, paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti, pelo carinho e atenção.

Aos amigos de laboratório, Julián, Juliana, Thais, Ana, Andrea, Caio, pela troca de conhecimento científico, conversas e boas lembranças.

Às minhas amigas do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela diversão e risadas.

Aos professores do Departamento, pelo conhecimento.

Aos funcionários da FCFar, pela simpatia e serviços.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“À todas as dificuldades que enfrentei; não fossem por elas, eu não teria saído do lugar.” (Chico Xavier).

À todos que me apoiaram, MUITO OBRIGADA!

Sumário

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. SACAROSE	12
2.2. AÇÚCAR INVERTIDO	12
2.3. INVERTASE	14
2.4. OBTENÇÃO DA INVERTASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E DA INVERTASE.....	19
2.6. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	23
2.7. BIORREATORES.....	24
 CAPÍTULO I – MÉTODOS FÍSICOS DE EXTRAÇÃO DA INVERTASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS:.....	29
2.1. EXTRAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29

2.2.	ELETROFORESES NATIVA (PAGE) E DESNATURANTE (SDS-PAGE)	31
2.3.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	31
2.4.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
2.5.	DETERMINAÇÃO DO MELHOR MÉTODO EXTRATIVO.....	32
2.6.	PURIFICAÇÃO EM RESINA DEAE-SEPHACEL.....	32
2.7.	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA INVERTASE LIVRE	33
2.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	33
3.2.	SDS-PAGE E PAGE.....	35
3.3.	ESCOLHA DO MÉTODO EXTRATIVO	38
3.4.	PURIFICAÇÃO DA INVERTASE EXTRAÍDA.....	38
3.5.	CARACTERIZAÇÃO DA INVERTASE LIVRE.....	40
4.	CONCLUSÃO	42

CAPÍTULO II – IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EXTRAÍDA DE	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM PÓ DE SABUGO DE MILHO	43

RESUMO	43
---------------------	-----------

ABSTRACT	44
-----------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO	45
----------------------------	-----------

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
-----------------------------------	-----------

2.1.	OBTENÇÃO DA INVERTASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.2.	TRATAMENTO DO SUPORTE	46
2.3.	COMPOSIÇÃO DO SUPORTE	47
2.4.	ATIVAÇÃO DO SUPORTE	47
2.5.	IMOBILIZAÇÃO (PREPARO DO DERIVADO ENZIMÁTICO).....	56

2.6.	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS	57
2.1.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1.	COMPOSIÇÃO DO SUPORTE	59
3.2.	OXIDAÇÃO DO PÓ DE SABUGO DE MILHO	60
3.3.	ATIVAÇÃO DO SUPORTE – DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE PERIODATO DE SÓDIO	61
3.4.	IMOBILIZAÇÃO.....	63
3.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS	64
3.6.	ESTABILIDADE À TEMPERATURA, INATIVAÇÃO TÉRMICA E MEIA-VIDA	66
4.	CONCLUSÃO	71

CAPÍTULO III – USO DE DERIVADO INVERTASE-PÓ DE SABUGO DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO.....		72
RESUMO		72
ABSTRACT		73
1. INTRODUÇÃO		74
2. MATERIAL E MÉTODOS.....		75
2.1.	EXTRAÇÃO DA INVERTASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
2.2.	TRATAMENTO E ATIVAÇÃO DO PÓ DE SABUGO DE MILHO	75
2.3.	IMOBILIZAÇÃO.....	76
2.4.	LIMITE MÁXIMO DE CARGA ENZIMÁTICA	76
2.5.	AVALIAÇÃO DO DERIVADO EM CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM	77
2.6.	REATOR EM BATELADA	77
2.7.	REATOR DE LEITO FLUIDIZADO	77

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. CARGA ENZIMÁTICA.....	78
3.2. ESTOCAGEM	80
3.3. REATOR EM BATELADA	81
3.4. REATOR DE LEITO FLUIDIZADO	82
4. CONCLUSÃO	83
BIBLIOGRAFIA	84

Lista de tabelas

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Propriedades das invertases purificadas externa e interna de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Fonte: Gáscon <i>et al</i> , 1968.....	15
---	----

Capítulo I

Tabela 1. Concentração de proteínas, unidade enzimática (U) e atividade específica obtidos nos diferentes tratamentos para extração de invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
Tabela 2. Análise estatística das atividades específicas dos tratamentos para extração física de invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> desconsiderando o tratamento com ultrassom.....	35
Tabela 3. Propriedades da enzima livre purificada.....	40

Capítulo II

Tabela 1. Quantidade (volume ou massa) dos componentes utilizados para formação do suporte pó de sabugo-gliceril e comparativo com agarose	50
Tabela 2. Composição química do pó de sabugo de milho cru e após tratamento.....	59
Tabela 3. Resultado de oxidação máxima do pó de sabugo de milho com periodato de sódio (NaIO ₄).....	60
Tabela 4. Consumo de periodato de sódio para formação de grupos aldeído na superfície do suporte.....	62

Tabela 5. Caracterização dos derivados pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase.....	65
---	----

Capítulo III

Tabela 1. Atividade residual (%) da invertase de <i>Sacchamoryces cerevisiae</i> imobilizada por ligação covalente em pó de sabugo de milho em diferentes condições de armazenamento a 4°C.....	80
---	----

Lista de figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Mecanismo de ação da invertase. Fonte: Reddy e Maley (1996).....17

Figura 2. Estrutura terciária da invertase extracelular de *Saccharomyces cerevisiae* com exposição dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Uniprot P00724.....22

Capítulo I

Figura 1. SDS-PAGE 12% das proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* liberadas pelos diferentes métodos de extração testados. P: padrão de massa molar; 1: Congelamento; 2: Congelamento com água; 3: Ultrassom; 4: Agitação na presença de abrasivos; 5: Maceração sem reagentes químicos; 6: Maceração com éter.....36

Figura 2. PAGE 7% das proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas pelos diferentes métodos de extração. 1: Congelamento; 2: Congelamento com água; 3: Ultrassom; 4: Agitação na presença de abrasivos; 5: Maceração sem reagentes químicos; 6: Maceração com éter.....37

Figura 3. SDS-PAGE dos extratos bruto e purificado de invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. P: padrão de massa molar; B: extrato bruto; Pur: extrato parcialmente purificado; Sobr: Sobrenadante da purificação.....39

Figura 4. Gráfico de Michaelis-Menten.....40

Figura 5. Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk.....41

Capítulo II

Figura 1. Esquema de etapas de ativação do pó de sabugo de milho para obtenção de dois suportes.....	48
Figura 2. Reação simplificada de formação de grupos gliceril na celulose a partir da adição de glicidol e hidróxido de sódio.....	51
Figura 3. Reação simplificada de formação de grupos glioxil a partir da oxidação com periodato de sódio.....	53
Figura 4. Oxidação da celulose com periodato de sódio. Fonte: Sirvio <i>et al</i> , 2011.....	54
Figura 5. Reação simplificada de aminação do suporte pó de sabugo-glioxil. Formação do suporte pó de sabugo-glio-MANAE.....	55
Figura 6. Reação simplificada de aminação do suporte pó de sabugo-oxidado. Formação do suporte pó de sabugo-oxi-MANAE.....	55
Figura 7. Acompanhamento da imobilização da invertase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em pó de sabugo de milho ativado a glutaraldeído.....	63
Figura 8. Atividade enzimática dos derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase, liberação de açúcar redutor por tempo.....	65
Figura 9. Estabilidade térmica da invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> livre e derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase incubados a 60°C.....	67

Figura 10. Inativação térmica da invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> livre e derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase incubados a 65°C.....	69
Figura 11. Meia-vida da invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> livre e dos derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase, incubados a 50°C.	70

Capítulo III

Figura 1. Reator de leito fluidizado ligado a bomba peristáltica e banho de aquecimento e circulação.....	78
Figura 2. Taxa de inversão (%) de sacarose 40% em biorreator de batelada carregado com 1% de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho.....	81
Figura 3. Atividade residual da invertase imobilizada em pó de sabugo de milho, submetida a 10 ciclos de hidrólise de sacarose 40% em reator de leito fluidizado.....	82

Resumo

A imobilização da invertase em resíduos agroindustriais traz diversas vantagens, como a criação de uma inovação biotecnológica, reaproveitamento de matérias e obtenção de açúcar invertido de alta qualidade e alto grau de pureza. O objetivo do trabalho foi analisar métodos físicos de extração da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* e protocolos de ativação de pó de sabugo de milho para imobilização da enzima, e posteriormente avaliar os derivados quanto à potencialidade para produção de açúcar invertido. A levedura foi submetida a seis tratamentos físicos de rompimento: (1) congelamento, (2) congelamento com água, (3) ultrassom, (4) agitação na presença de abrasivos, (5) maceração sem solventes orgânicos e (6) maceração com éter. O extrato do melhor método foi parcialmente purificado. O pó de sabugo de milho foi ativado (1) com a formação de grupos glioxil, amino e glutaraldeído subsequentes, ou (2) com oxidação direta, formação de grupos amino e glutaraldeído, também subsequentes. A estabilidade térmica, inativação térmica e meia vida dos derivados foram avaliadas. O melhor derivado foi então estocado úmido, em água destilada, tampão fosfato de sódio pH 7 e tampão acetato de sódio pH 4,5, e submetido a experimentos de carga máxima enzimática e utilizado em reator de batelada e de leito fluidizado com solução de sacarose 40%. Dos seis tratamentos de extração da invertase, a agitação na presença de abrasivos foi capaz de extrair maior quantidade de proteínas ($3,3 \pm 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$) e unidades enzimáticas ($509,0 \pm 81,3 \text{ U.mL}^{-1}$), entretanto o tratamento com maior atividade específica foi o ultrassom ($1696,5 \pm 528,7 \text{ U.mg}^{-1}$). O método escolhido como melhor foi o congelamento puro, que após purificação parcial resultou em extrato com 1.101,27 U, atividade específica de $1.324,28 \text{ U.mg}^{-1}$, velocidade máxima de $3.333,3 \text{ } \mu\text{mols.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ e Km de 54,7 mM. A imobilização foi concluída com 90 minutos de reação, sendo que o derivado de pó de sabugo de milho oxidado direto (2) foi capaz de

reter maior atividade enzimática e ser mais estável a 60°C. Ambos os derivados apresentaram meia-vida superior a 68,5 horas de incubação a 50°C e foram inativados em 30 minutos de incubação a 65°C. O derivado resultante da oxidação direta do pó de sabugo de milho foi escolhido para armazenamento e experimentos em reator. Após 100 dias de estocagem, o derivado armazenado em tampão acetato manteve $88,4 \pm 5,6\%$ da atividade inicial. A carga máxima do suporte foi de $277,7 \pm 30,7 \text{ U.g}^{-1}$, que quando usado em reator em batelada hidrolisou 100% da solução de sacarose 40% em apenas 5 horas de operação, e quando utilizado em reator de leito fluidizado foi possível hidrólise de 24% em apenas 1 ciclo de 30 minutos. Um derivado com menor carga enzimática, quando operado em reator de leito fluidizado e solução de sacarose 40%, manteve a atividade enzimática igual à inicial após 10 ciclos. Estes resultados mostram grande potencial para produção de açúcar invertido, uma vez que a extração da enzima é simples e o derivado manteve-se funcional com o uso de altas concentrações de sacarose, além de ser estável nessas condições, ou seja, não há rompimento da interação enzima-suporte.

Palavras-chave: açúcar invertido, imobilização em suporte sólido, invertase, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Immobilization of invertase on agro-industrial byproducts has many advantages, such as a biotechnology innovation, reuse of materials and obtaining of high quality and purity invert sugar. The objective of this work was to analyze physical methods for invertase extraction from *Saccharomyces cerevisiae* and the activation of powdered corncobs for enzyme immobilization protocols, and then evaluate the potential of the derivatives for the production of invert sugar. The yeast was subjected to six physical disruption treatments: freezing, freezing with water, ultrasound, stirring in presence of abrasives, maceration without organic solvents and maceration with ether. The extract from the best extraction method was partially purified. The powdered corncobs were activated (1) with the formation of glyoxyl, amine and glutaraldehyde groups, subsequently, or (2) direct oxidation, formation of amine and glutaraldehyde groups, also subsequently. The thermal stability, thermal inactivation and half-life of the products were evaluated. The best derivative was then stored dampened, in distilled water, sodium phosphate buffer pH 7 and sodium acetate buffer pH 4.5, and subjected to maximum enzyme load test, in batch reactor and fluidized bed reactor with 40% sucrose solution. Among the six invertase extraction treatments, the agitation in the presence of abrasive extracted greater amounts of protein ($3.3 \pm 0.4 \text{ mg.mL}^{-1}$) and enzymatic units ($509.0 \pm 81.3 \text{ U.mL}^{-1}$), however treatment with higher specific activity was ultrasound ($1696.5 \pm 528.7 \text{ U.mg}^{-1}$). The method chosen as the best was freezing, that after partial purification resulted in extracts with 1101.27 U, specific activity of $1,324.28 \text{ U.mg}^{-1}$, V_{max} of $3,333.3 \text{ } \mu\text{mols.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ and K_m of 54.7 mM. Immobilization was completed after 90 minutes of reaction, whereas the derivative from direct oxidized was capable of retaining higher enzyme activity and was the more stable at 60°C. Both derivatives showed half-life superior to 68.5 hours of incubation at 50°C

and were inactivated within 30 minutes of incubation at 65°C. The resulting derivative from direct oxidation of corncob was chosen for storage and reactor tests. After 100 days of storage, the derivative stored in acetate buffer remained $88.4 \pm 5.6\%$ of the initial activity. The maximum load of the support was $277.7 \pm 30.7 \text{ U.g}^{-1}$, which could hydrolyze 100% of sucrose solution in only 5 hours of operation when used in a batch reactor, and 24% when used in a fluidized bed reactor in just one cycle. A derivative with lower enzyme load when operated in a fluidized bed reactor, kept the initial enzyme activity after 10 cycles. These results show great potential for the production of invert sugar with the enzyme immobilized on powdered corncob, once the extraction is simple and the immobilized enzyme remained functional with the use of high concentrations of sucrose, and was stable under these conditions, with no disruption of the enzyme-support interaction.

Key words: immobilization on solid support, invert sugar, invertase, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Introdução

O açúcar invertido é o produto da hidrólise da sacarose, resultando em uma mistura de glicose e frutose. Seu uso em alimentos é vantajoso quando em comparação com a sacarose, pois confere mais cremosidade ao produto, além de não cristalizar, possuir ponto mais baixo de congelamento e maior poder edulcorante (Gava *et al*, 2008). A obtenção do açúcar invertido pode ser por meios ácidos, resinas de troca iônica ou utilização de enzima invertase. Entretanto apenas o uso de enzima confere pureza ao produto, uma vez que o uso de ácido e resina podem gerar produtos secundários de coloração escura e sabor amargo, influenciando negativamente o alimento em que será empregado (Moroz *et al*, 1973).

Entre os anos de 2008 e 2010 o Brasil produziu mais de 800.000 toneladas de xaropes de açúcar por ano, incluindo xaropes de açúcar invertido. Entretanto, a produção brasileira de açúcar invertido é exclusivamente feita pela via ácida e resinas de troca iônica, resultando em um produto de baixa qualidade e alto custo energético (IBGE, 2012; 2011; 2010).

A utilização de enzimas imobilizadas para a produção de açúcar invertido pode beneficiar, tanto a indústria, quanto os consumidores, pois um produto de maior qualidade poderá ser oferecido.

Técnicas de imobilização de enzimas têm sido descritas regularmente, mas poucas obtiveram sucesso para a utilização em larga escala. A escolha da técnica de imobilização deve ser criteriosa, pois deve conferir vantagens catalíticas, como por exemplo, maior estabilidade da enzima. Outro item importante é a escolha do suporte, que deve ser estável às condições de ativação, imobilização e atividade da enzima, além de ser de fácil obtenção.

Nesse contexto, o uso de resíduos agroindustriais como suporte para imobilização enzimática poderá gerar um produto de alta qualidade e transformar um elemento residual em uma invenção biotecnológica com incentivo à sustentabilidade.

O objetivo desse trabalho foi obter um derivado com invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em pó de sabugo de milho capaz de hidrolisar soluções de sacarose em alta concentração. Para isso, foram avaliadas diferentes técnicas de extração da enzima da levedura e mecanismos de ativação do pó de sabugo de milho, com o intuito de obter o máximo possível de enzima em suporte com características adequadas ao procedimento de imobilização para produção de açúcar invertido.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Sacarose

Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), ou β -D-frutofuranosil- α -D-glicopiranosídeo, é um dissacarídeo não redutor formado por uma molécula de frutose e glicose unidas por ligação glicosídica α 1,2 (Bobbio, 2003). É produzida por plantas fotossintetizantes e é o principal açúcar na seiva das plantas, sendo comercialmente extraída da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) e beterraba (*Beta* sp). Trata-se um açúcar fermentescível, que em concentrações aproximadas de 60% é resistente ao desenvolvimento bacteriano e cristaliza-se. Na indústria de alimentos é amplamente utilizada devido ao seu poder edulcorante, adesividade e viscosidade em solução (Vettorazzi & MacDonald, 1989), podendo atuar também como conservante quando em altas concentrações por aumento da pressão osmótica (Gava *et al*, 2008).

O açúcar de mesa brasileiro é proveniente exclusivamente da cana-de-açúcar. Para ser obtido, a cana passa por um processo industrial de lavagem, moagem, tratamento, clarificação, cristalização, entre outros, transformando o original caldo escuro e aromático em um produto cristalizado, branco e sem aromas. Estima-se que no Brasil sejam produzidas 36,45 milhões de toneladas de açúcar na safra de 2014/15, o que equivale a aproximadamente 729 milhões de sacas de 50 kg (CONAB, 2014).

2.2. Açúcar invertido

A hidrólise da sacarose resulta em um produto denominado açúcar invertido, constituído por porções equimolares de glicose e frutose. O nome “invertido” é decorrente da rotação óptica da solução, pois uma solução pura de sacarose altera um

feixe de luz polarizada a $+66,5^\circ$ (direita), enquanto que uma solução totalmente hidrolisada altera o feixe a $-39,6^\circ$ (esquerda), que corresponde à soma da rotação da glicose ($+52,7^\circ$) e da frutose ($-92,3^\circ$). Tal produto possui diversas vantagens em relação à sacarose, dentre elas, maior capacidade edulcorante, alta higroscopicidade, maior possibilidade de concentração, ponto de ebulição mais alto, ponto de congelamento mais baixo e resistência à cristalização (Koblitz, 2010), melhorando a qualidade de determinados produtos, como por exemplo, bebidas carbonatadas, frutas cristalizadas e bombons com recheios cremosos (Moroz *et al*, 1973). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2013), em 2011 foram produzidas 844.206 toneladas de xaropes de açúcares, incluindo xaropes de açúcar invertido, equivalente a R\$ 870.122.000,00.

A hidrólise da sacarose pode ser realizada por via ácida, resina de troca iônica ou enzimática. A hidrólise ácida, também chamada de hidrólise homogênea, é feita através da adição de um ácido à solução de sacarose, podendo ser ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, entre outros, e aquecimento da mistura, que após a inversão deverá ser neutralizada com uma base, como hidróxido de sódio. A escolha do ácido irá depender das características desejáveis do produto final e condições do processo. Por exemplo, segundo Moroz *et al* (1973), para a produção de 1.000 a 10.000 galões de açúcar 50% invertido, aquece-se a solução de sacarose 60-70% (m/v) a $60-70^\circ\text{C}$ acidificada com ácido clorídrico, pH 2, por 2 horas. Já para a produção de açúcar 95% invertido, a temperatura precisa ser aumentada a 80°C e o período de aquecimento também é prolongado. Entretanto, temperaturas elevadas causam a degradação do açúcar, que é submetido a um processo de escurecimento não enzimático com a produção de 5-(hidroximetil)-2-furaldeído, conhecido também como hidroximetilfurfural (HMF) (Bobbio, 2001; Moroz *et al*, 1973).

A inversão por meio de resina de troca iônica, ou hidrólise heterogênea, ocorre através da liberação de íons H^+ por uma resina iônica. Em geral, a solução de sacarose passa com a velocidade constante por uma coluna contendo resina fortemente catiônica e temperatura entre 50° e 75°C. A hidrólise diminui conforme ocorre a exaustão da resina, que deverá ser carregada novamente com um ácido (Moroz *et al*, 1973). Assim como ocorre na hidrólise ácida, esse método de inversão degrada o açúcar, com formação de HMF, pois resinas de troca iônica também são grupos catalíticos da reação (Lewkowski, 2001).

O composto hidroximetilfurfural é desejável em diversas situações, como por exemplo, na caramelização, em panificação e como intermediário na obtenção de biocombustíveis (Bobbio, 2001; Román-Leshkov, 2007). Entretanto, no processo de hidrólise da sacarose torna-se um produto indesejável por gerar cor e sabor à solução de açúcar invertido, diminuindo sua qualidade. Apesar de não existir naturalmente em alimentos frescos, a toxicidade do HMF não foi comprovada (Abraham *et al*, 2011).

A hidrólise enzimática da sacarose é promovida por meio da enzima invertase, ou β -D-frutofuranosídeo fruto-hidrolase (EC 3.2.1.26), que cliva a molécula de sacarose na ligação α 1,2. A inversão por este método não requer altas temperaturas e não produz sabor e compostos escuros, como HMF, sendo, portanto, um método interessante para aprimorar a produção de açúcar invertido.

2.3. Invertase

A invertase é uma enzima que pode ser encontrada em diversos seres vivos, como vegetais, onde está relacionada com o amadurecimento e apodrecimento de frutas, em animais, liberando monossacarídeos para absorção, em leveduras e outros

microrganismos. Apresenta um papel muito importante na história da Enzimologia, pois foi a partir de seus estudos que foram descritas as hipóteses de chave-fechadura, equação de Michaelis-Menten, entre outras, além de ser a primeira enzima a ser imobilizada (Nelson e Griffin, 1916).

A principal invertase estudada é a obtida de *Saccharomyces cerevisiae*, a qual produz dois tipos de invertase, uma externa glicosilada localizada no espaço periplasmático, e outra interna não glicosilada localizada no citoplasma. É uma enzima multimérica, podendo ser encontrada na forma de dímero a octâmero (Esmon *et al*, 1987). Sua temperatura ótima de atividade é 55°C e faixa estabilidade à temperatura é de 30°C a 50°C (Vitolo, 2004). As diferenças das invertases interna e externa foram estudadas por Gáscon *et al*, 1968, e abaixo segue uma tabela comparativa das suas propriedades.

Tabela 1. Propriedades das invertases externa e interna purificadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: Gáscon *et al*, 1968.

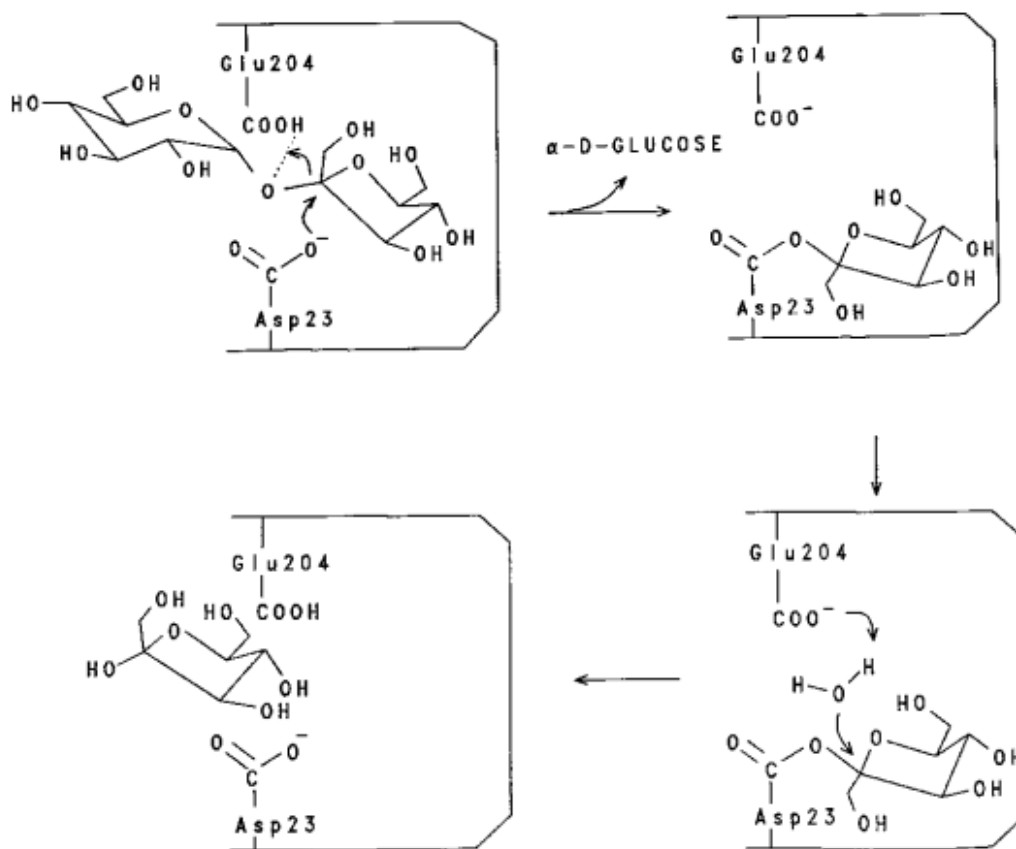
Propriedade	Invertase externa	Invertase interna
Massa molar (kDa)	270	135
Atividade Específica (U/mg proteína)	2.700	2.900
K _m (mM)	26	25
pH _{ótimo}	3,5-5,5	3,5-5,5
pH _{estabilidade}	3,0-7,5	6,0-9,0

Ambas as estruturas da invertase são codificadas pelo mesmo gene em diferentes códons de iniciação, permitindo que a invertase externa seja transportada ao espaço periplasmático devido à presença de um peptídeo sinal, que é ausente na invertase interna. A invertase glicosilada é constituída por 50% de carboidratos e 3% de glucosaminas e sua produção é regulada pela presença de glicose, enquanto que a

invertase interna praticamente não possui carboidratos em sua composição e é essencialmente produzida. A presença de carboidratos na invertase muda algumas propriedades físicas da invertase, como por exemplo, a solubilidade (Gascón, Neumann *et al.*, 1968; Carlson e Botstein, 1982).

Conforme Reddy e Maley (1996), o mecanismo de ação da invertase é semelhante ao da maioria das enzimas que hidrolisam carboidratos, onde dois resíduos de aminoácido ácido atuam diretamente no substrato, sendo um deles o nucleófilo e o outro doador de próton (figura 1). 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 invertase-frutose. 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.

Figura 1. Mecanismo de ação da invertase. Fonte: Reddy e Maley (1996)



Para a produção de açúcar invertido, o uso da invertase é muito interessante, pois a mistura não precisa ser aquecida a altas temperaturas para elevada taxa de inversão e o produto não precisará passar por neutralização com o uso de bases, resultando em economia de energia, mão-de-obra e materiais. Entretanto, se a enzima for utilizada na forma solubilizada, a solução de açúcar invertido irá conter resíduos proteicos não desejáveis; deste modo, a imobilização da invertase torna-se um método atrativo.

2.4. Obtenção da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é popularmente conhecida como fermento biológico, amplamente empregada na indústria de alimentos para fabricação de massas, fermentação de cervejas, vinhos etc. Devido sua fácil manipulação e sistema mais simples do que organismos pluricelulares, diversos estudos da literatura científica podem ser encontrados com o objetivo de elucidar áreas do conhecimento ligadas à genética, proteômica, regulação de vias metabólicas, entre outras. Dentre as diversas propriedades e aplicações desta levedura está a produção de enzimas, como a invertase.

Diversos métodos são empregados para obtenção da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, resultando na extração da invertase extracelular e/ou intracelular, conforme as técnicas utilizadas e objetivo do trabalho.

A extração da invertase pode ocorrer através de métodos químicos, físicos ou ambos. Entretanto, antes da escolha do método de extração da invertase, deve-se avaliar o objetivo do trabalho e os fatores que podem ou não influenciar, como por exemplo, a presença de solventes orgânicos, custos, etapas de purificação, possibilidade de aumento da escala, entre outros.

Hudson (1914) descreve os primeiros métodos para obtenção da invertase pelos cientistas do início do século XX e propõe um procedimento para extração da invertase através da adição de tolueno para liquefação da levedura.

Gáscon *et al*, em seu trabalho publicado em 1968 sobre o estudo comparativo das invertases intracelular e extracelular de *S. cerevisiae*, utilizaram o método de congelamento e descongelamento da levedura para obtenção da invertase intracelular.

Mahmoud (2007) obteve a invertase para imobilização em serragem através de agitação com pérolas de vidro e posterior concentração com etanol.

Vujčić *et al* (2010) realizaram a autólise das células da levedura com tolueno e Na_2CO_3 para posterior imobilização da invertase liberada em cápsulas de alginato de cálcio.

2.5. Imobilização de enzimas e da invertase

A imobilização consiste em confinar ou ligar enzimas ou sistemas enzimáticos em um suporte insolúvel com retenção de suas atividades catalíticas, permitindo sua utilização contínua e repetidamente, formando, portanto, um derivado (enzima + suporte) (Guisán, 2006).

O procedimento de imobilização pode ocorrer de diversas formas, dentre elas: aprisionamento, encapsulação, ligação covalente, ligação iônica, adsorção, entre outras. Para a enzima invertase, a imobilização ocorre principalmente por adsorção, aprisionamento e ligação covalente (Kotwal e Shankar, 2009).

A adsorção envolve a ligação da enzima em um suporte insolúvel através de forças físicas fracas, como as forças de Van der Waals. É a técnica de imobilização mais simples e mais antiga, uma vez que foi primeiramente utilizada por Nelson e Griffin para imobilizar a invertase em carvão ativado, em 1916. Apesar de simples, esta técnica envolve alguns inconvenientes, dentre elas, o desligamento da enzima durante sua utilização.

O aprisionamento ou inclusão consiste na retenção da enzima em um suporte insolúvel poroso; portanto, a enzima ficará confinada em um determinado espaço, onde

o substrato e produto poderão circular livremente para seu interior e exterior. Este método pode ser realizado por meio de suportes poliméricos, como gel de acrilamida, colágeno, alginato de sódio etc. Para essa técnica, deve-se avaliar a porosidade do suporte, visando permitir a passagem do substrato e produto, e ao mesmo tempo, reter a enzima.

A imobilização por ligação covalente ocorre por meio da ligação da enzima em um suporte através de uma ligação forte, podendo ser realizada com a interação dos grupos funcionais da enzima (p.e. grupos amino) com grupos reativos do suporte naturais ou adicionados (p.e. hidroxilas). Este método pode utilizar diversos suportes, como materiais inorgânicos (cerâmica, vidro, metais, entre outros) e materiais orgânicos (celulose, quitina, agarose, entre outros). Apesar de mais complexa, a imobilização por ligação covalente mantém a enzima mais estável, dificultando o desligamento da enzima do suporte e permitindo a utilização de substratos mais concentrados.

Comercialmente, a imobilização traz diversas vantagens, pois admite: aproveitar a atividade enzimática por mais tempo, montar um biorreator com enzimas imobilizadas, melhorar a estabilidade térmica de enzimas, operar de forma contínua, entre outras.

Diversos materiais têm sido descritos na literatura como suportes eficientes para a imobilização de enzimas. Entretanto, devido às diferenças entre cada enzima, o mesmo suporte e/ou metodologia de imobilização pode reagir diferentemente conforme as propriedades da enzima em estudo. Portanto, as características do suporte, grupos reativos e condições de imobilização devem ser cuidadosamente escolhidos para poder melhorar os resultados do trabalho (Mateo, Palomo *et al.*, 2007).

Para iniciar os estudos de imobilização da invertase é conveniente estudar tanto as metodologias e resultados obtidos por outros pesquisadores quanto a estrutura tridimensional da enzima.

A invertase já foi imobilizada por inúmeros métodos e suportes, como é possível observar no trabalho intitulado “Immobilized invertase”, publicado por Kotwal e Shankar (2009). Tendo em vista que o produto da invertase, o açúcar invertido, é comercializado em altas concentrações, o derivado da enzima imobilizada deve ser capaz de hidrolisar soluções de sacarose em alta concentração. Na literatura podemos destacar algumas imobilizações da invertase que foram bem sucedidas, como:

- Adsorção iônica em algodão revestido com polietilenoimina seguida de *crosslink* com glutaraldeído, efetivada por Godbole *et al* (1990). Também neste trabalho, um reator de leito fixo de 1,5 litros foi preenchido com 400 gramas do derivado, que conseguiu hidrolisar 97% de uma solução de sacarose 80% (m/v) a um fluxo de 15 litros por dia.
- Adsorção iônica em Sepabeads revestidos com polietilenoimina (PEI) realizada por Torres *et al* (2002). Conforme os autores, 1 grama do derivado foi capaz de hidrolisar completamente uma solução de 5 litros de sacarose 40% após, aproximadamente, 100 minutos.
- Ligação covalente em palha de milho realizada por Monsan e Combes (1984), no qual o derivado alcançou a uma taxa de hidrólise de 93,7% de solução de sacarose de 69% (m/m). Em um reator enzimático tubular agitado, o derivado foi capaz de alcançar uma produção de 9,1 kg de sacarose invertida por hora.

- Ligação covalente em microbeads de nylon-6, por Amaya-Delgado *et al* (2006), onde 1,1g do derivado, ao ser colocado em um reator de leito fixo, resultava na hidrólise de 95% de solução de sacarose 1,2M.

Com relação à estrutura tridimensional da enzima, seu estudo tem como objetivo identificar zonas de interesse para imobilização. Conforme o modelo P00724 da base de dados Uniprot, a invertase extracelular de *Saccharomyces cerevisiae* possui uma cadeia de 513 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 19 aminoácidos. O sítio ativo da invertase é composto pelo aspartato 42, glutamina 60, glutamato 223 e triptofano 311 (figura 2).

Figura 2. Estrutura terciária da invertase extracelular de *Saccharomyces cerevisiae* com exposição dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Uniprot P00724.



2.6. Resíduos agroindustriais e sabugo de milho como suporte para imobilização de enzimas

Apesar de diversos estudos focarem a imobilização de enzimas, poucos métodos são utilizados em escala industrial, principalmente pelo custo envolvido na imobilização. Nesse contexto, tem-se estudado a possibilidade da utilização de suportes alternativos para a imobilização de enzimas, visando redução do custo e utilização de material de baixo valor agregado e sem destinação final definida, como por exemplo, resíduos agroindustriais.

Resíduos agroindustriais provenientes de cultivo agrícola, como bagaço, cascas, entre outros, são compostos lignocelulósicos que após tratamento adequado possuem potencial para imobilização de enzimas, como demonstraram Monsan *et al* (1984), na imobilização de invertase em palha de milho, Mahmoud (2007), na imobilização da invertase em serragem de madeira, D'Souza e Godbole (2002), na imobilização da invertase em casca de arroz, Brigida *et al* (2008), na imobilização de lipase em fibras de coco, entre outros autores. Assim sendo, estudos para viabilizar a utilização de enzimas imobilizadas em resíduos agroindustriais são de extrema importância, pois transformam itens considerados resíduos em produtos biotecnológicos com valor agregado e, ao mesmo tempo, possibilitam uma produção sustentável e de menor custo energético, com produtos de maior qualidade e alto grau de pureza.

O sabugo de milho é um resíduo agroindustrial derivado da produção de milho. O peso seco do sabugo pode variar entre 16-20% do peso seco total da espiga de milho, conforme as condições de cultivo (Beleze *et al*, 2003). A produção brasileira de milho na safra de 2011/2012 chegou a 69.480,5 toneladas (CONAB, 2012b), portanto, estima-se que nessa safra tenham sido produzidas em torno de 12.000 toneladas de sabugo de

milho. O potencial de uso do sabugo de milho não é totalmente explorado e seu uso fica restrito a atividades secundárias, como complementar rações de animais, enchimento, fonte de carvão, polimento, absorvente, cobertura de solo, filtro, entre outros. De acordo com Kumar *et al* (2010), o peso seco de sabugo de milho é composto principalmente por xilose (28,23%), lignina Klason (14,01%), lignina solúvel (2,02%), celulose (73,04%) e outros compostos em menor proporção.

A alta porcentagem de celulose presente no sabugo torna possível seu uso como suporte da invertase, uma vez que a superfície da estrutura de celulose possui grupos hidroxilas livres que podem ser modificados permitindo a ativação do suporte e consequente imobilização da enzima através de ligação covalente multipontual.

2.7. Biorreatores

Atualmente existem diversos biorreatores com enzimas imobilizadas, utilizados para diversas finalidades, como para a produção de leite livre de lactose, aminoácidos livres, ácido 6-aminopenicilânico (precursor das penicilinas semissintéticas), entre outros (Bon *et al*, 2008). Cada processo produtivo possui um modelo de reator ótimo, que podem ser: sistemas particulados (em batelada, tanque agitado contínuo, leito fixo e leito fluidizado), reatores de placa (membranas enroladas em espiral, camada delgada e membrana) e reatores lineares (fibras ocas ou diferentes configurações).

A escolha do reator dependerá de diversos fatores, entre eles: forma do derivado (partículas, membranas, entre outros), natureza do substrato, requisitos operacionais da reação (pH, temperatura), cinética da reação (p.e. inibição enzimática pelo produto), custos (Zanin e Moraes, 2004).

Existem diversos tipos de reatores que possibilitam a utilização de enzimas imobilizadas. Conforme Vitolo (2001), quatro tipos de reatores são os mais utilizados nesta situação:

1. Reator em batelada: consiste em um vaso vedado com agitador integrado no qual o derivado fica em suspensão na mistura, sendo separado da solução final por filtração, por exemplo;
2. Reator agitado contínuo: semelhante ao reator em batelada, entretanto há entrada e saída contínua de fluido;
3. Reator de leito fixo: consiste em tudo vedado com o derivado estacionário em seu interior enquanto o substrato é bombeado; e
4. Reator de leito fluidizado: semelhante ao reator de leito fixo, entretanto o derivado fica em suspensão no interior do tubo e a velocidade do fluxo deve ser ajustada para que o derivado não fique depositado no fundo do recipiente.

CAPÍTULO I – Métodos físicos de extração da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados para obtenção da invertase, enzima capaz de hidrolisar sacarose em frutose e glicose. O objetivo do trabalho foi avaliar métodos físicos de obtenção de invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura comercial foi submetida a seis tratamentos de rompimento: congelamento, congelamento com água, ultrassom, agitação com abrasivos, maceração sem solvente orgânico e maceração com éter, seguidos de centrifugação e, posteriormente, foram realizadas eletroforeses nativa (PAGE) e desnaturante (SDS-PAGE), dosagem de proteínas e determinação da atividade enzimática. O extrato do melhor método extrativo foi parcialmente purificado em resina DEAE-Sephacel e realizada a caracterização enzimática. O método de agitação na presença de abrasivos foi o que conseguiu extrair maior concentração de proteínas ($3,3 \pm 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$) e unidades enzimáticas ($509,0 \pm 81,3 \text{ U.mL}^{-1}$), entretanto o tratamento com maior atividade específica foi o ultrassom ($1696,5 \pm 528,7 \text{ U.mg}^{-1}$). As eletroforeses comprovaram que os tratamentos resultam em diferentes perfis proteicos. Porém, o método extrativo escolhido foi o de congelamento puro. Após purificação parcial, a enzima livre apresentou 1.101,27 U, atividade específica de $1.324,28 \text{ U.mg}^{-1}$, velocidade máxima de $3.333,3 \text{ } \mu\text{mols.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ e K_m de 54,7 mM. A técnica de congelamento mostrou-se eficaz na obtenção da enzima, além de ser de baixa complexidade e fácil utilização em maiores escalas.

Abstract

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most widely used microorganisms for obtaining the invertase enzyme, which is capable of hydrolyzing sucrose into fructose and glucose. The objective of this work was to evaluate physical methods of obtaining invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. The commercial yeast was subjected to six disruption treatments: freezing, freezing with water, ultrasound, shaking with abrasives, maceration without organic solvent and maceration with ether, followed by centrifugation and subsequently was performed native and denaturing electrophoresis and determination of protein concentration and enzyme activity. The extract from the best extraction method was partially purified on DEAE-Sephacel resin and subjected to enzymatic characterization. The method of agitation in the presence of abrasive managed to extract greater portion of protein ($3.3 \pm 0.4 \text{ mg.mL}^{-1}$) and enzymatic units ($509.0 \pm 81.3 \text{ U.mL}^{-1}$), but treatment with highest specific activity was ultrasound ($1696.5 \pm 528.7 \text{ U.mg}^{-1}$). The electrophoresis showed that the treatments result in different protein profiles. However, the extraction method chosen was pure freezing. After partial purification, the free enzyme showed 1,101.27 U, specific activity $1,324.28 \text{ U.mg}^{-1}$, maximum speed of $3,333.3 \text{ } \mu\text{mols.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ and K_m of 54.7 mM. The freezing technique was effective in obtaining the enzyme, besides being of low complexity and ease of use at larger scales.

1. Introdução

A invertase é uma enzima amplamente distribuída em plantas, microrganismos e animais, com a função de hidrolisar a sacarose em frutose e glicose. Comercialmente é utilizada para a produção de açúcar invertido, o qual possui grande uso na indústria de alimentos uma vez que mantém os alimentos mais frescos e macios por período mais prolongado em comparação com aqueles produzidos com sacarose (Koblitz, 2010; Moroz *et al*, 1973).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma importante fonte de invertase para a indústria de alimentos. A principal vantagem do seu uso é o fato deste microrganismo ser barato e de fácil manuseio.

Existem diversas técnicas de obtenção da invertase, entretanto a escolha da técnica deve ser condizente com o destino da invertase extraída e o planejamento do projeto. Além disso, tendo em vista que a levedura possui dois tipos de invertase, uma extracelular e outra intracelular, os procedimentos para a obtenção da invertase devem considerar suas diferenças e a estrutura celular da levedura.

Foram avaliados diferentes métodos para extração física da invertase de *S. cerevisiae*, com o intuito de sua imobilização, visando minimizar a interferência de solventes orgânicos na estrutura da enzima e nas etapas no processo de extração e purificação.

2. Material e Métodos:

2.1. Extração da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comercialmente conhecida como fermento biológico fresco, adquirida no mercado local, foi da marca Fleischmann, lote 02/09 1. Todos os métodos extrativos foram realizados em triplicata e após os procedimentos o extrato foi submetido à centrifugação por 20 minutos a 4°C e 9.000 rpm (7395 g). O sobrenadante de cada extrato foi recolhido e armazenado a -18°C para análises.

2.1.1. Rompimento por congelamento: Quinze (15) gramas de levedura foram congeladas lentamente em refrigerador doméstico a uma velocidade de congelamento de, aproximadamente, -1,5°C/min e armazenadas em temperatura de -18°C. Após o procedimento, a levedura foi descongelada em temperatura ambiente e adicionada a 30 mL de água milliQ. O extrato foi homogeneizado e centrifugado.

2.1.2. Rompimento por congelamento com adição de água: Quinze (15) gramas de levedura foram adicionadas a 30 mL de água milliQ. Após homogeneização a mistura foi congelada lentamente em refrigerador doméstico a, aproximadamente, -1,5°C/min e armazenada a -18°C. Após o procedimento a mistura foi descongelada em temperatura ambiente, homogeneizada e centrifugada.

2.1.3. Rompimento por ultrassom: Quinze (15) gramas de levedura foram adicionadas a 30 mL de água milliQ e mantidas por 30 minutos em

banho ultrassônico com frequência de 40 kHz. Após o procedimento, o extrato foi homogeneizado e centrifugado.

2.1.4. Rompimento por agitação na presença de abrasivos: Quinze (15)

gramas de levedura foram adicionadas a 15 mL de água milliQ e 15 gramas de pérolas de vidro com diâmetros entre 2 e 4 mm e agitadas em agitador de tubo tipo vórtex (motor de 3.800 rpm) a aproximadamente 2.700 rpm por 10 minutos. Esta agitação foi realizada descontinuamente com intervalos de 2 minutos em banho de gelo para evitar o aumento da temperatura e consequentemente a desnaturação da enzima. Após o procedimento foram removidas as pérolas de vidro, adicionados 15 mL de água milliQ e o extrato foi homogeneizado e centrifugado.

2.1.5. Rompimento por maceração sem reagentes químicos: Quinze (15)

gramas de levedura foram maceradas manualmente em almofariz com 5 gramas de areia tratada e 30 mL de água, em banho de gelo. O extrato foi macerado por 30 minutos, mantido em repouso por 30 minutos, homogeneizado e centrifugado.

2.1.6. Rompimento por maceração com éter: Quinze (15) gramas de

levedura foram maceradas manualmente em almofariz com 5 gramas de areia limpa, 30 mL de água e 10 mL de éter, em banho de gelo. O extrato foi macerado por 30 minutos, mantido em repouso por 30 minutos, homogeneizado e centrifugado.

2.2. Eletroforeses nativa (PAGE) e desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas em condições nativas foi realizada em gel de poliacrilamida 7% conforme metodologia descrita por Davis (1964) com aproximadamente 5µg de proteína por poço. A eletroforese de proteínas em condições desnaturantes foi realizada em gel de poliacrilamida 12% conforme Laemmli (1970) com aproximadamente 5µg de proteína por poço. Ambas eletroforeses foram realizadas em placas de volume máximo de 10 mL e as corridas desempenhadas em voltagem fixa de 200 V e amperagem de 10 mA. As bandas proteicas foram visualizadas com coloração de prata (Blum et al, 1987).

2.3. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas do sobrenadante foi realizada através do método de Bradford (1976) e leituras das absorbâncias em λ 595 nm.

2.4. Atividade enzimática

A atividade enzimática das invertases extraídas foi determinada por meio da quantificação de açúcares redutores formados usando ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), conforme método de Miller (1959). A temperatura de atividade foi 50°C e pH 5,0, conforme estudo de temperatura e pH ótimos obtidos por Santos (2010). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de açúcar redutor por minuto e a atividade específica da enzima foi definida como a quantidade de µmol de produto liberados por minuto por miligrama de proteína extraída (U.mg prot⁻¹). Abaixo segue fórmula para determinação da atividade enzimática (U).

$$U = \frac{\Sigma \text{Absorbância} \times 1000 \times \text{Volume total do ensaio (mL)}}{\epsilon \text{ (molar)} \times \Sigma \text{ tempo (min)} \times \text{Volume de enzima (mL)}}$$

Para análise dos resultados obtidos foi construída uma curva analítica com diferentes concentrações de glicose (0,56mM a 5,6mM) para obtenção do coeficiente de extinção molar (ϵ , $\mu\text{mol}^{-1} \cdot 0,25\text{mL}^{-1}$), resultado em ϵ (molar) de $88,075 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.5. Determinação do melhor método extrativo

Para determinação do melhor método extrativo foram avaliados os resultados sobre a atividade específica de cada sobrenadante e quantidade de bandas proteicas identificadas através das eletroforeses. Considerou-se o melhor método extrativo aquele que apresentou maior atividade específica e menor quantidade de bandas; também foi considerado a facilidade de extração e a possibilidade de ampliação de escala na escolha.

2.6. Purificação em resina DEAE-Sephacel

O extrato do método escolhido foi purificado em resina DEAE (dietilaminoetil) Sephacel através da técnica de “batch”. As cargas iônicas da resina foram equilibradas com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0. O extrato bruto foi adicionado à resina na proporção 10:1 (extrato:resina) e mantido em agitação suave *over-night*. A interação iônica da enzima à resina foi monitorada através da realização de ensaios de atividade enzimática do sobrenadante. Após o período de interação, o sobrenadante foi separado da resina por filtração e armazenado sob refrigeração para análise.

A resina foi adicionada à solução de cloreto de sódio 1M, na proporção de 10% do volume inicial do extrato, e mantida em agitação para liberação da enzima e concentração do extrato purificado. Após liberação, a resina foi separada do sobrenadante por filtração, que foi dialisado para remoção do sal.

O extrato parcialmente purificado foi armazenado para análises.

2.7. Caracterização enzimática da invertase livre

As constantes cinéticas aparentes de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) foram calculadas através de ensaios com diferentes concentrações de sacarose (27 mM a 1200 mM) e velocidade inicial de cada ensaio, utilizando-se o gráfico de Lineweaver-Burk.

2.8. Análise estatística

A comparação dos resultados dos diferentes métodos de extração de invertase foi realizada utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste Tukey, nível de significância $p < 0,05$.

Os testes estatísticos foram feitos utilizando o software SigmaStat.

3. Resultados e Discussão

3.1. Dosagem de proteínas e determinação da atividade enzimática

A dosagem de proteínas dos extratos revelou que todos os métodos são capazes de extrair proteínas da levedura, entretanto, em proporções diferentes. Como pode ser observado na Tabela 1, o tratamento que mais extraiu proteínas foi o de agitação na presença de abrasivos ($3,3 \pm 0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$) enquanto que os tratamentos de extração com ultrassom, congelamento sem e com água foram o que apresentaram menor quantidade de proteínas.

Após a avaliação da atividade enzimática de todos os extratos foi possível calcular a quantidade de unidades enzimáticas (U) presentes em cada extrato e as atividades específicas das invertases obtidas nos diferentes tratamentos. A partir dos dados obtidos, resumidos na Tabela 1, foi possível observar que o tratamento de agitação na presença

de abrasivos apresenta maior unidades enzimáticas (U) por mililitro de extrato ($509,0 \pm 81,3 \text{ U.mL}^{-1}$), entretanto, o tratamento com maior atividade específica foi o ultrassom ($1696,5 \pm 528,7 \text{ U.mg}^{-1}$).

Tabela 1. Concentração de proteínas, unidade enzimática (U) e atividade específica obtidos nos diferentes tratamentos para extração de invertase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tratamento	Proteína (mg.mL^{-1})	U.mL^{-1}	Atividade específica ($\text{U.mg proteína}^{-1}$)
Congelamento	$0,4 \pm 0,0^a$	$182,3 \pm 1,2^a$	$473,0 \pm 9,0^a$
Congelamento com água	$0,3 \pm 0,0^a$	$187,8 \pm 2,6^a$	$621,2 \pm 6,2^a$
Ultrassom	$0,2 \pm 0,0^a$	$332,0 \pm 59,1^b$	$1696,5 \pm 528,7^b$
Agitação na presença de abrasivos	$3,3 \pm 0,4^c$	$509,0 \pm 81,3^c$	$154,0 \pm 5,1^a$
Maceração sem reagentes químicos	$1,5 \pm 0,1^b$	$393,6 \pm 4,9^{bc}$	$259,4 \pm 24,3^a$
Maceração com éter	$1,5 \pm 0,6^b$	$160,4 \pm 59,1^a$	$108,8 \pm 13,5^a$

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Nos dados sobre a concentração de proteínas, pode-se observar que algumas técnicas possuem alto desvio padrão, causado provavelmente por fator externo na aplicação da técnica. Por exemplo, o resultado da maceração está relacionado com a força aplicada pelo operador.

O método que apresentou maior atividade específica foi o Ultrassom, diferindo estatisticamente dos demais métodos. No entanto, quando consideramos este valor “outlier” e o excluímos da análise (ANOVA e Tukey) os valores de atividade específica dos demais métodos foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2. Análise estatística das atividades específicas dos tratamentos para extração física de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* desconsiderando o tratamento com ultrassom.

Tratamento	Atividade específica (U.mg proteína ⁻¹)
Congelamento	473,0 ± 9,0 ^b
Congelamento com água	621,2 ± 6,2 ^a
Agitação na presença de abrasivos	154,0 ± 5,1 ^d
Maceração sem reagentes químicos	259,4 ± 24,3 ^c
Maceração com éter	108,8 ± 13,5 ^e

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

3.2. SDS-PAGE e PAGE

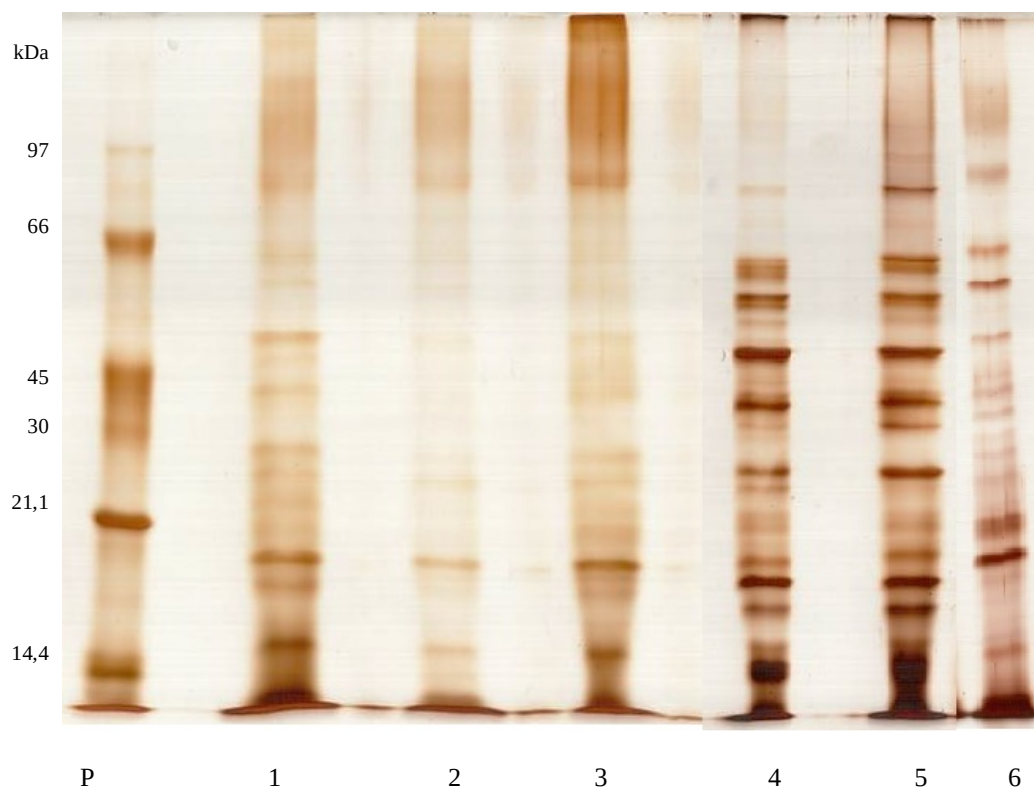
As eletroforeses, tanto nativa, quanto em condições desnaturantes, tiveram o objetivo de elucidar o padrão proteico dos diferentes métodos extrativos. A partir disso é possível identificar o método que extraiu maior variedade de proteínas, indicando uma extração “menos pura”.

As eletroforeses em condições desnaturante e nativa apresentaram diferentes padrões entre os métodos extrativos, como pode ser observado nas figuras 1 e 2.

Segundo Gáscon *et al* (1968), a utilização de técnica de congelamento e descongelamento é capaz de liberar a invertase intracelular. Nesse caso, a invertase externa, associada à parede celular da levedura, é precipitada no momento da centrifugação, junto com as moléculas de grande massa molar. Portanto, a liberação da invertase extracelular depende da fragmentação da parede celular da levedura, o que ocorre quando existe agitação na presença de abrasivos e maceração. O mesmo ocorre

com a utilização da técnica de ultrassom, uma vez que o ultrassom é capaz de romper a parede celular da levedura e liberar o conteúdo citoplasmático (Guerrero *et al*, 2001).

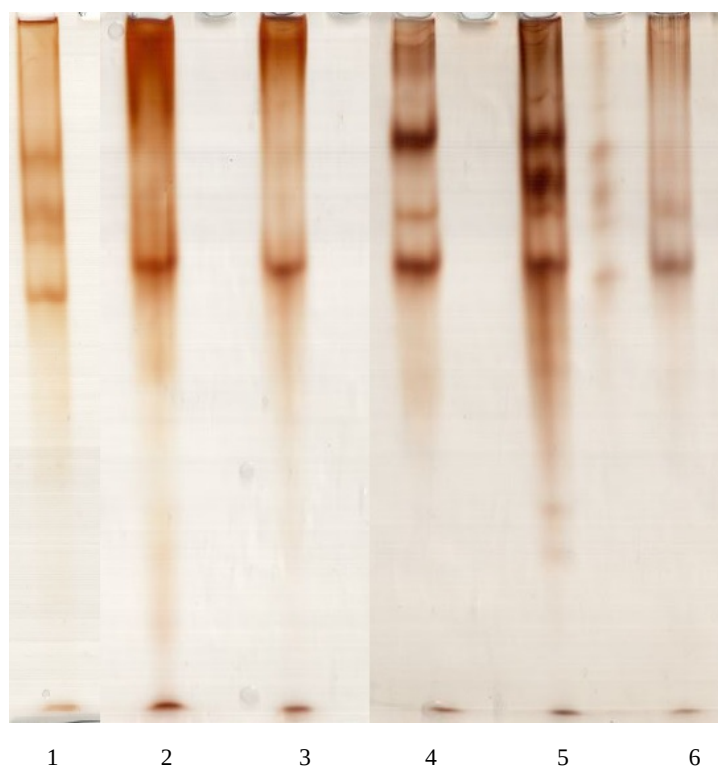
Figura 1. SDS-PAGE 12% das proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* liberadas pelos diferentes métodos de extração testados. P: padrão de massa molar; 1: Congelamento; 2: Congelamento com água; 3: Ultrassom; 4: Agitação na presença de abrasivos; 5: Maceração sem reagentes químicos; 6: Maceração com éter.



O perfil proteico obtido através da SDS-PAGE revelou que métodos de extração que resultam na fragmentação da parede celular da levedura são capazes de liberar maior diversidade de proteínas. Entretanto, tal efeito não é desejado, pois quanto maior a diversidade de proteínas, mais difícil torna-se a purificação do extrato. Levando em

consideração que a imobilização não é específica para a invertase, a presença de diversas proteínas no extrato pode interferir na imobilização, pois o suporte pode imobilizar outras proteínas ao invés da invertase, alvo do trabalho.

Figura 2. PAGE 7% das proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas pelos diferentes métodos de extração. 1: Congelamento; 2: Congelamento com água; 3: Ultrassom; 4: Agitação na presença de abrasivos; 5: Maceração sem reagentes químicos; 6: Maceração com éter.



A PAGE também mostra diferentes padrões entre as proteínas que são liberadas conforme cada método extrativo.

3.3. Escolha do método extrativo

Os métodos extrativos foram escolhidos por serem métodos físicos de extração, com possibilidade de aumento de escala para utilização em escala piloto e industrial. Tendo em vista que o melhor método extrativo, dentre os avaliados nesse trabalho, foi aquele que apresentou menor número de bandas na eletroforese (menor variação de tipos de proteína), e maior atividade específica, ou seja, dentre as proteínas extraídas há maior atividade caracterizada como sendo da invertase, optou-se pelo método de congelamento puro, sem adição de água.

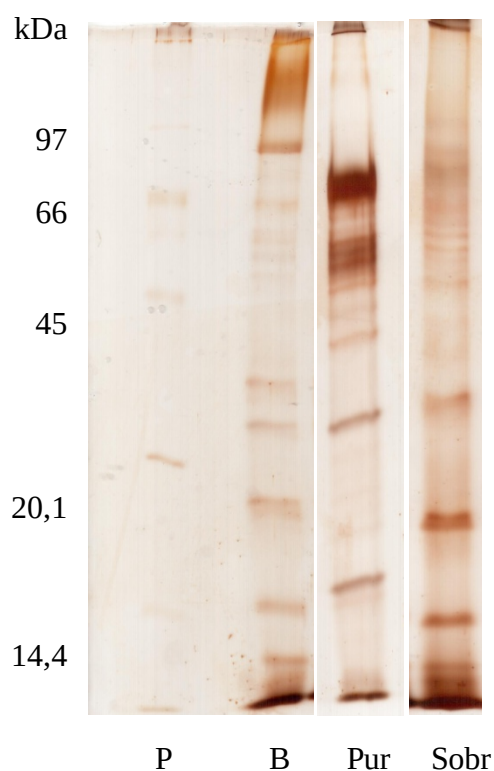
Apesar de ter-se constatado que os métodos de rompimento por congelamento com água e ultrassom também apresentam resultados satisfatórios, estes não foram selecionados, pois o método de congelamento com água não proporcionou os mesmos resultados de unidades enzimáticas e atividade específica quando a escala foi aumentada 5 vezes ($0,4 \pm 0,0$ mg de proteína.mL⁻¹; $136,1 \pm 30,0$ U.mL⁻¹ e $350,8 \pm 17,8$ U.mg⁻¹) e o método de rompimento de ultrassom pode ser caro e difícil em escala piloto e industrial.

3.4. Purificação da invertase extraída

O sobrenadante da mistura de resina e invertase extraída foi monitorado através da realização de atividades enzimáticas para averiguar a interação da enzima com a resina. Ao final de 18 horas, não havia mais atividade no sobrenadante e inferiu-se que a enzima estava totalmente ligada à resina.

A Figura 3 mostra os perfis proteicos dos extratos bruto, purificado e o sobrenadante recolhido após adesão da enzima na resina.

Figura 3. SDS-PAGE dos extratos bruto e purificado de invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. P: padrão de massa molar; B: extrato bruto; Pur: extrato parcialmente purificado; Sobr: Sobrenadante da purificação.



No perfil do extrato parcialmente purificado observa-se uma banda na região dos 60 kDa, que pode indicar a presença de monômeros de invertase (Trimble & Maley, 1977). A dissociação dos monômeros de invertase pode ocorrer pois a interação entre eles é fraca e, dependendo das condições ambientais do experimento, podem se desestabilizar (Sainz-Polo *et al*, 2013).

3.5. Caracterização da invertase livre

Após a remoção da enzima da resina com solução salina, e conseqüentemente, sua concentração, foi realizada a atividade enzimática e determinação das constantes cinéticas (Tabela 2, Figuras 4 e 5).

Através do gráfico de velocidade inicial ($\mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) por concentração do substrato foi possível constatar que a invertase comporta-se como uma enzima Michaeliana.

Tabela 3. Propriedades da enzima livre purificada.

Parâmetro	Valor
Unidades internacionais	1.101,27 U
Atividade específica	1.324,28 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
Velocidade máxima	3.333,33 $\mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
Km	54,7 mM

Figura 4. Gráfico de Michaelis-Menten.

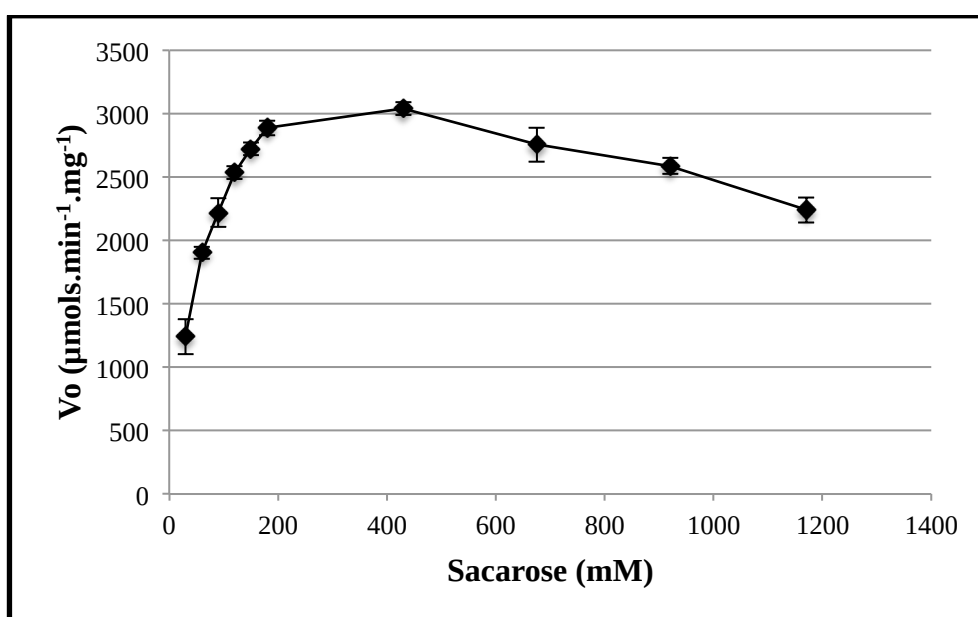
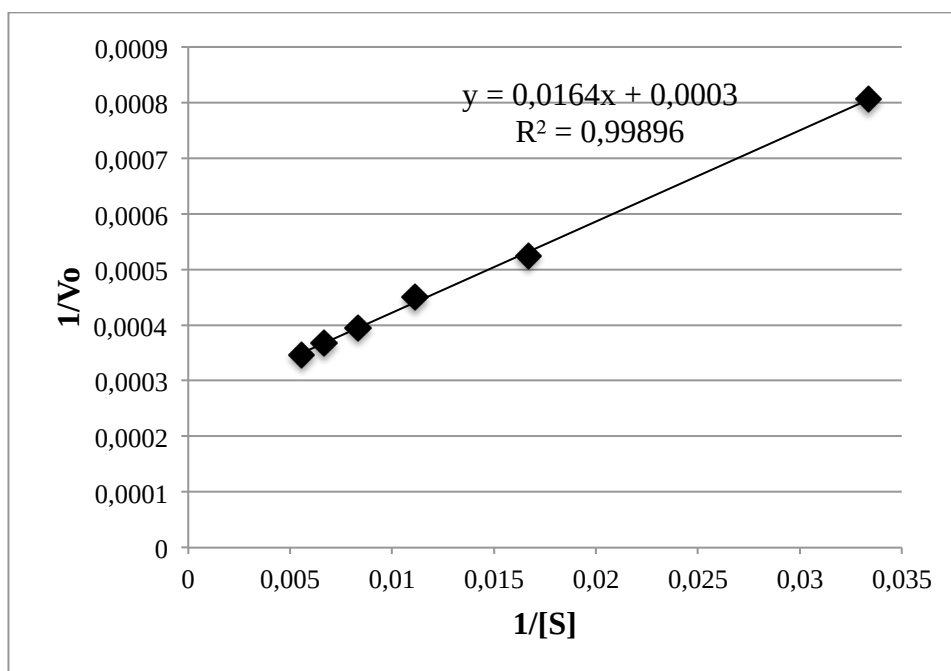


Figura 5. Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk.

Tendo como referência o estudo realizado por Gáscon *et al* (1968) e considerando que os autores estudaram a invertase completamente purificada, avalia-se que a K_m da invertase é de 25 mM. Nesse contexto, valores mais próximos dessa K_m obtida por Gáscon *et al* são considerados ideal, pois revelam a afinidade da enzima pelo substrato. Neste trabalho, a K_m da invertase parcialmente purificada de *Saccharomyces cerevisiae* foi de 54,7 mM.

Além disso, o gráfico de Michaelis-Menten (figura 4) demonstra a relação das altas concentrações de sacarose e a velocidade de hidrólise, semelhante ao encontrado por Bowski *et al* (1971), o qual verificou que a invertase é inibida pelo substrato e água, ou seja, em concentrações acima de 0,29M as moléculas de sacarose estão incompletamente hidratadas, fazendo com que estas se interajam formando aglomerados que são inacessíveis ao sítio ativo da enzima. Além disso, Combes e Monsan (1983)

comprovaram que, não apenas com a sacarose, mas também ocorre a inibição da invertase pelos produtos, sendo que a frutose atua como um inibidor competitivo e a glicose como um inibidor não competitivo.

4. Conclusão

Métodos físicos de extração de invertase são importantes para técnicas de imobilização de enzimas, uma vez que não existirão solventes orgânicos no extrato. Desta feita, há economia no processo de extração e purificação da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dentre os métodos estudados, a técnica de congelamento e descongelamento puro da levedura comercial foi o que melhor atendeu aos objetivos, pois proporcionou alta atividade enzimática do extrato, baixa complexidade e possibilidade de ser usado em maiores escalas.

Além disso, a purificação parcial do extrato obtido com a técnica de congelamento foi eficaz na obtenção de um material com alta concentração de invertase.

CAPÍTULO II – Imobilização de invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em pó de sabugo de milho

Resumo

Materiais lignocelulósicos, como resíduos agroindustriais, podem servir de suporte para imobilização de enzimas, contribuindo para a obtenção de inovações biotecnológicas e reaproveitamento de materiais. O objetivo do trabalho foi avaliar duas técnicas de ativação do pó de sabugo de milho para imobilização de invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente, o pó de sabugo de milho foi tratado com álcool 70%, descompressão térmica e NaOH 2M. A primeira técnica de ativação consistiu na criação de um grupo glioxil, posteriormente aminado e agrupado com glutaraldeído. A segunda técnica consistiu na oxidação direta do pó de sabugo de milho, posteriormente aminado com etilenodiamina e agrupado com glutaraldeído. Após a imobilização, foram calculadas a atividade enzimática dos derivados, a atividade recuperada, estabilidade à temperatura, inativação térmica e meia-vida. O rendimento da imobilização foi superior a 99% em ambos os derivados após 90 minutos. O derivado pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase apresentou atividade significativamente maior ($30,5 \pm 1,5 \text{ U.g}^{-1}$) do que o derivado pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase ($21,0 \pm 0,7 \text{ U.g}^{-1}$). Ao serem incubados a 60°C por 60 minutos, o derivado pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase teve maior estabilidade. Ao serem incubados a 65°C, ambos derivados perderam mais de 80% da atividade inicial após 30 minutos. Após 68,5 horas de incubação a 50°C, os derivados pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase mantiveram $51,5 \pm 2,9 \%$ e $61,9 \pm 4,1\%$ da atividade, respectivamente. Esses resultados mostram que os métodos de ativação do pó

de sabugo de milho obtiveram sucesso e que o método de oxidação direta do pó de sabugo é mais vantajoso, uma vez que economiza reagentes químicos e promove melhor estabilidade da enzima imobilizada.

Abstract

Lignocellulosic materials such as industrial byproducts may provide support for the immobilization of enzymes, contributing to the achievement of biotechnological innovations and reuse of materials. The objective of this work was to evaluate two techniques of activation of corncob powder for immobilization of invertase extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. Initially, the corncob powder was treated with 70% ethanol, thermal decompression and 2M NaOH. The first technique of activation was the creation of a glyoxyl group subsequently aminated with ethylenediamine and grouped with glutaraldehyde. The second technique consisted of the direct oxidation of powdered corncobs, subsequently aminated with ethylenediamine and grouped with glutaraldehyde. After immobilization, the enzymatic activities of the derivatives, the recovered activity, thermal stability, thermal inactivation and half-life were calculated. The immobilization yield was greater than 99% in both derivatives after 90 minutes of reaction. The corncob-oxy-glutaraldehyde-invertase derivative showed significantly higher activity ($30.5 \pm 1.5 \text{ U.g}^{-1}$) than the corncob-glyo-glutaraldehyde-invertase derivative ($21.0 \pm 0.7 \text{ U.g}^{-1}$). When they were incubated at 60°C for 60 minutes, corncob-oxy-glutaraldehyde-invertase derivative had greater stability. When they were incubated at 65°C, both derivatives lost more than 80% of initial activity after 30 minutes. After 68.5 hours of incubation at 50°C, the corncob-oxy-glutaraldehyde-invertase and corncob-glyo-glutaraldehyde-invertase derivatives remained $51.5 \pm 2.9\%$

and $61.9 \pm 4.1\%$ of initial activity, respectively. These results show that powder corncob activation methods were successful and the method of direct oxidation of corncob is more advantageous since it saves chemicals and promotes better stability of the immobilized enzyme.

1. Introdução

A imobilização de enzimas consiste no processo de confinar ou conectar determinada enzima em um material ou superfície de tal forma que a enzima mantenha sua atividade catalítica, podendo ser usada por mais tempo ou repetidamente.

Diversas técnicas de imobilização são descritas na literatura, como a imobilização por ligação covalente, aprisionamento, microencapsulação, *cross linking*, entre outros, que resultam em derivados, ou seja, interação entre enzima e suporte, que podem ser usados como catalizadores em processos químicos industriais, química fina, biossensores e aplicações terapêuticas (Guisan, 2006).

Apesar dos diversos estudos em imobilização de enzimas, apenas poucas técnicas obtiveram sucesso para serem utilizadas em grande escala (DiCosimo *et al*, 2013). Para tal, no estudo da imobilização de enzimas é necessário levar em consideração a técnica de imobilização e o suporte escolhido, e estudar suas características, pois o material deve ser resistente aos procedimentos da imobilização, ser capaz de manter a atividade catalítica da enzima e, ao mesmo tempo, permanecer estável nas condições ideais da atividade da enzima.

Materiais de origem vegetal, especificamente compostos lignocelulósicos, possuem grande potencial para utilização como suporte para imobilização de enzimas,

pois sua estrutura pode ser alterada através de reações químicas e, por serem abundantes, podem ser fontes econômicas de matéria-prima.

Neste trabalho objetivou-se avaliar duas técnicas de ativação do pó de sabugo de milho que será utilizado como suporte para imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* através de ligação covalente, produzindo derivados ainda não descritos na literatura científica.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

Para obtenção da invertase (EC 3.2.1.26), 15 gramas de fermento de pão foram congelados. Após o descongelamento, foram adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 4°C e 7395 *g*. O extrato foi parcialmente purificado e concentrado 10 vezes com resina DEAE-Sephacel equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, pela técnica de *batch*.

2.2. Tratamento do suporte

O pó de sabugo de milho foi gentilmente cedido pela Rasul – Indústria e Comércio de Rações Ltda., empresa especializada em moagem e revenda da farinha, farelo e granulado. O pó de sabugo em pó foi lavado em água abundante, tratado com álcool 70% e submetido à descompressão explosiva térmica, por meio de autoclave, visando expandir os materiais lignocelulósicos e aumentar a superfície de contato. Posteriormente, o pó de sabugo de milho foi mantido sob agitação de 140 rpm por 24 horas em NaOH 2M para quebra e remoção da lignina, e lavado com água abundante e filtrado a vácuo.

O pó de sabugo de milho tratado foi armazenado até o momento da ativação e imobilização em solução de álcool 20% a 8°C, visando evitar contaminação biológica do material.

2.3. Composição do suporte

Para avaliar a mudança da estrutura, o pó de sabugo cru e tratado foi quantificado quanto à presença de lignina total, glucana, xilana, arabinosil, acetil e extrativos. A quantificação foi realizada conforme metodologia descrita por Ferraz *et al.* (2000), onde o material lignocelulósico, matéria prima, foi submetido à hidrólise com ácido sulfúrico 72%, 30°C, por 1 hora. Após o período, o ácido sulfúrico foi diluído a 3% e a mistura aquecida a 125°C por 1 hora. O material residual foi esfriado e filtrado. A lignina total foi dosada somando-se a quantidade dos sólidos residuais da filtragem, que corresponde à lignina insolúvel, e lignina solúvel, quantificada no filtrado pela absorbância em 250 nm. A concentração de monômeros de carboidratos foi determinado usando HPLC com coluna BIORAD HPX87H a 45°C.

2.4. Ativação do suporte

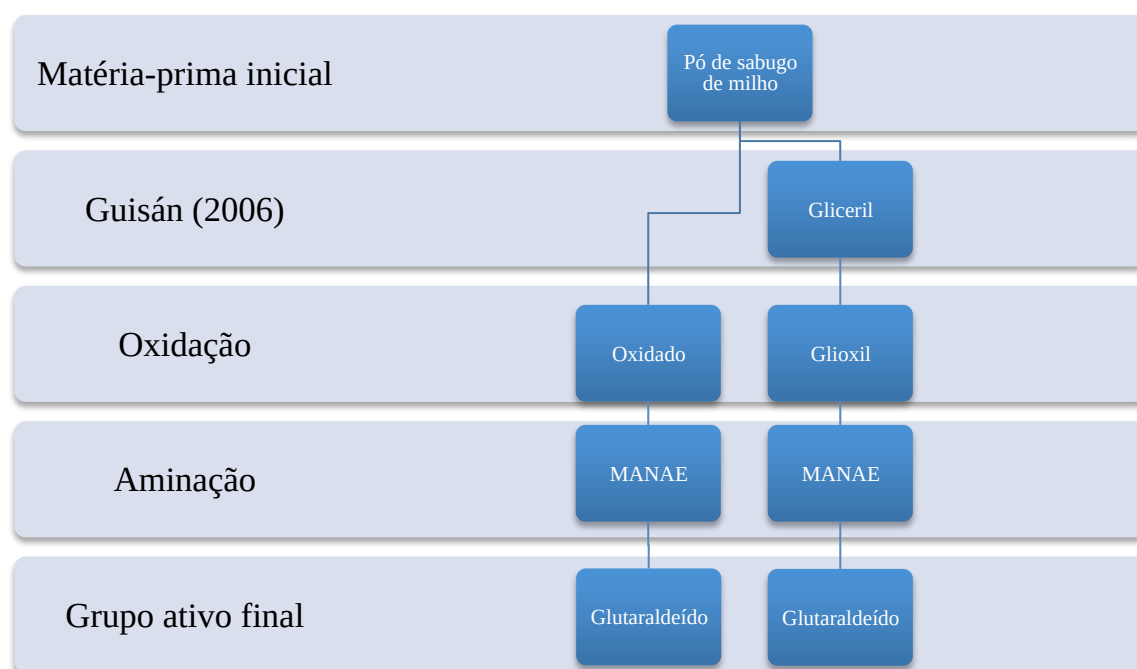
A ativação do suporte foi realizada com base no protocolo utilizado para o suporte agarose, descrito por Guisán (2006). O pó de sabugo de milho tratado foi seco em estufa a 40°C por 24 horas para poder ser utilizado na ativação. Este processo permitiu uma interferência mínima da água utilizada no tratamento. Tendo em vista que a estrutura do pó de sabugo não é totalmente elucidada, foram realizadas alterações no método de ativação, com objetivo de identificar diferenças e aperfeiçoar a ativação do pó de sabugo (figura 1).

O primeiro experimento de ativação teve como alvo a criação de um “braço espaçador” entre a estrutura da celulose e enzima, através da inserção de um grupo

gliceril. Este grupo gliceril foi oxidado, formando o grupo glioxil, e posteriormente aminado e agrupado com glutaraldeído. As proporções de reagentes para formação do grupo gliceril foram variadas, objetivando verificar alterações no método de ativação.

O segundo método de ativação foi realizado através da oxidação direta da celulose, ou seja, sem criação do grupo gliceril. A celulose oxidada foi diretamente aminada e agrupada com glutaraldeído, com mesma metodologia utilizada no primeiro experimento.

Figura 1. Esquema de etapas de ativação do pó de sabugo de milho para obtenção de dois suportes.



2.4.1. Formação do suporte pó de sabugo-gliceril

Com o objetivo de elucidar o comportamento do pó de sabugo de milho na primeira etapa de ativação foram realizados experimentos com o pó de sabugo em diferentes quantidades de reagentes, separados em grupos A, B, C, D e E.

A determinação do volume/massa de reagentes teve como base a metodologia de ativação proposta por Guisán (2006). O primeiro passo foi determinar o volume final total de reagentes que poderia ser adicionado a uma determinada massa de pó de sabugo de milho e permitisse que a mistura final tivesse uma consistência homogênea e fluida, uma vez que o pó de sabugo de milho possui características físicas diferentes da agarose. O volume final considerado ideal foi de 15 mL de fase líquida para cada grama de pó de sabugo de milho tratado e seco. Tendo em vista que o volume final para ativação de cada grama de pó de sabugo é aproximadamente 15 vezes maior quando comparado com a ativação da agarose, o tempo de reação foi alterado para permitir que a reação de ativação ocorresse.

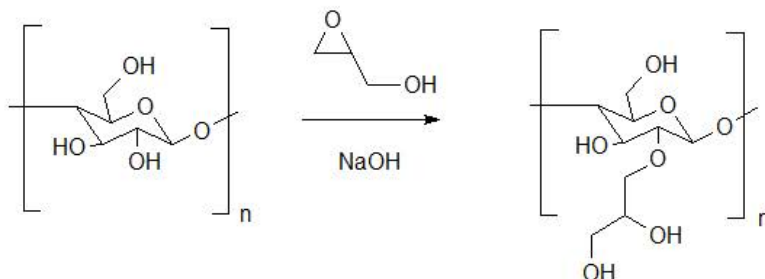
A ativação do pó de sabugo foi realizada utilizando a proporção de reagentes descrita na tabela 1:

Tabela 1. Quantidade (volume ou massa) dos componentes utilizados para formação do suporte pó de sabugo-gliceril e comparativo com agarose.

Componente	Grupo					
	A	B	C	D	E	Agarose
Pó de sabugo de milho tratado e seco	1g	1g	1g	1g	1g	1g
Água destilada	0,286 mL	0,286 mL	8,477 mL	8,134 mL	5,486 mL	0,286 mL
Hidróxido de sódio (NaOH) 1,7 M	14,371 mL	14,371 mL	6,18 mL	6,18 mL	9,161 mL	0,461 mL
Molaridade final do NaOH	1,6	1,6	0,7	0,7	1	0,7
Boroidreto de sódio (NaBH ₄) dissolvido em NaOH na proporção 28,5mg/mL de NaOH	0,4096 g	0,4096 g	0,176 g	0,176 g	0,261 g	0,0136 g
Glicidol	0,343 mL	0,343 mL	0,343 mL	0,686 mL	0,343 mL	0,343 mL
Tempo de reação	36 horas	18 horas	36 horas	36 horas	36 horas	18 horas
VOLUME FINAL	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	1,09 mL

Os reagentes foram adicionados sequencialmente e a mistura foi mantida em agitação suave pelo tempo indicado, sendo que a primeira hora em banho de gelo, e após a reação foi realizada a lavagem e filtragem com água destilada abundante. Após o período de reação, estima-se que os anéis de glicose presentes na estrutura do pó de sabugo de milho tenham sua estrutura alterada conforme a figura 2, com a formação de grupos gliceril na superfície da celulose.

Figura 2. Reação simplificada de formação de grupos gliceril na celulose a partir da adição de glicidol e hidróxido de sódio.



Na determinação da quantidade dos reagentes, a ideia principal foi manter a quantidade de glicidol original, ou seja, para a ativação de 1 g de agarose, utilizou-se 0,343 mL de glicidol, e o mesmo foi usado nesse experimento. Para verificar se a quantidade de glicidol influencia a ativação do suporte, um grupo (D) teve a quantidade duplicada.

Os grupos A e B tiveram a molaridade final de hidróxido de sódio aumentada, o qual tem como função ionizar a estrutura da celulose ao retirar um hidrogênio da hidroxila da superfície da celulose e permitir que o grupo O^- fique disponível para reação. Nesse caso, como o pó de sabugo de milho possui uma estrutura complexa, o aumento da molaridade pode influenciar ao retirar maior quantidade de hidrogênio da estrutura da celulose e modificar o tempo de reação; portanto, o grupo A teve o tempo de reação de 36 horas e o grupo B de 18 horas.

O grupo C teve a molaridade final de hidróxido de sódio igual à molaridade final na ativação da agarose. O grupo D teve a quantidade de glicidol duplicada, como dito anteriormente, e o grupo E teve um aumento suave da molaridade final de hidróxido de sódio.

2.4.2. Experimento de oxidação do pó de sabugo

Os 5 grupos descritos anteriormente foram oxidados com periodato de sódio (NaIO_4) 100mM na proporção 4:1 (4 mL de periodato de sódio para cada grama de pó de sabugo-gliceril úmido, com volume final de 10 mL). A reação foi realizada sob agitação suave por 3 horas e o consumo de periodato de sódio foi monitorado. O consumo de NaIO_4 indica a formação de grupos aldeído, portanto é uma ferramenta auxiliar para verificar a efetiva formação dos grupos gliceril na superfície do pó de sabugo de milho.

Outro experimento realizado foi de oxidação completa do pó de sabugo de milho, com o objetivo de identificar a quantidade máxima possível de consumo de periodato de sódio, indicando um limite de formação da função aldeído. Para tal, 1 g (peso úmido) de pó de sabugo de milho tratado e 1g (peso úmido) de pó de sabugo-gliceril foram oxidados com 8 mL de NaIO_4 100 mM e 2 mL de água destilada, durante 18 horas na ausência de luz, para evitar a degradação do NaIO_4 pela luz. O consumo de NaIO_4 foi monitorado ao longo do tempo (item 2.4.5)

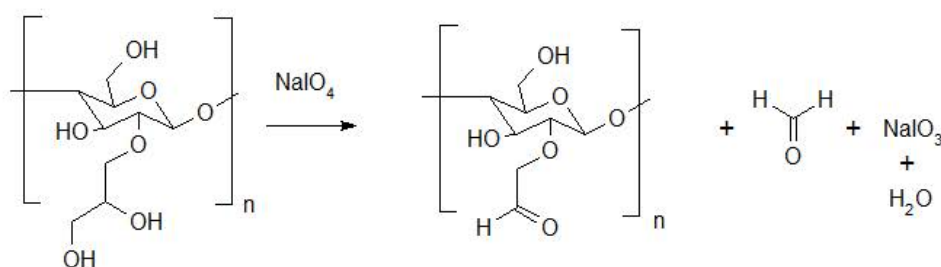
Após os experimentos de oxidação do pó de sabugo de milho, um dos grupos foi selecionado para dar continuidade à ativação do suporte.

2.4.3. Formação do suporte pó de sabugo-glioxil

O pó de sabugo de milho ativado (pó de sabugo de milho – gliceril) foi oxidado com periodato de sódio (NaIO_4) 100mM, na proporção de 3 mL de periodato de sódio e 7 mL de água destilada para cada grama de pó de sabugo-gliceril úmido. A reação foi realizada sob agitação suave por 1,5 horas, para ruptura dos grupos gliceril e formação de grupos glioxil. Após, foi realizada a lavagem e filtração com água destilada abundante.

Após o período de reação, é esperado que os grupos gliceril formados na etapa anterior de ativação do suporte sejam modificados em grupos glioxil, conforme a figura 3.

Figura 3. Reação simplificada de formação de grupos glioxil a partir da oxidação com periodato de sódio.

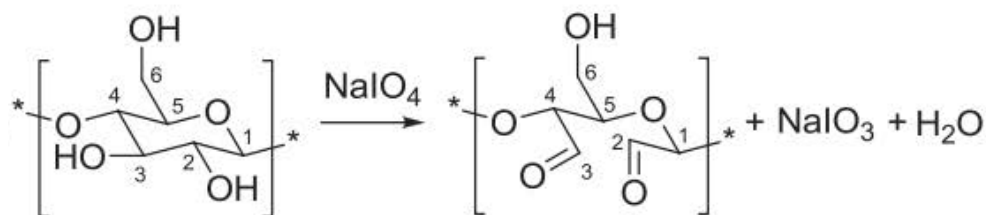


2.4.4. Oxidação direta do pó de sabugo de milho tratado: formação do suporte pó de sabugo-oxidado

O pó de sabugo de milho tratado e seco foi oxidado utilizando periodato de sódio (NaIO₄) na proporção 5:1 (5 mL de periodato de sódio 100mM para 1 g de pó de sabugo tratado seco) sob agitação suave por 1 hora. A reação ocorreu com adição de 10 mL de água, para manter o volume final de 15 mL.

A reação de oxidação do pó de sabugo de milho com periodato de sódio tem como objetivo alterar a estrutura da celulose, especificamente “abrindo” os anéis de glicose, conforme a figura 4.

Figura 4. Oxidação da celulose com periodato de sódio. Fonte: Sirvio *et al*, 2011.



2.4.5. Monitoramento do consumo de periodato de sódio

O consumo de periodato de sódio foi monitorado através da reação com iodeto de potássio (KI) 10% (m/v) e solução de bicarbonato de sódio saturada. A leitura da reação colorimétrica foi feita em espectrofotômetro em 450 nm. Foram recolhidas alíquotas do sobrenadante da reação de oxidação dos suportes em tempos determinados (Guisan, 1988).

2.4.6. Formação do suporte pó de sabugo-MANAE

A aminação dos suportes teve como base a metodologia descrita por Fernandez-Lafuente *et al* (1993) e Benassi *et al* (2013). Aos suportes pó de sabugo-glioxil e pó de sabugo-oxidado foram adicionados etilenodiamina (EDA) 2M, pH 10, durante 4 horas, na proporção: 1 g de suporte úmido para cada 5,715 mL de EDA. Em seguida foi adicionado NaBH₄ por mais 2 horas, na proporção 0,0571 g de NaBH₄ para cada 1 grama de suporte, para formação de grupos amino, resultando, respectivamente, nos suportes pó de sabugo-glio-MANAE e pó de sabugo-oxi-MANAE. O suporte foi lavado com água destilada em abundância, tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4 em abundância, e novamente com água destilada em abundância.

A reação de aminação tem como alvo principal grupos aldeídos, tendo a capacidade de formação de molécula de água com o oxigênio do aldeído e substituição

deste oxigênio pelo nitrogênio da etilenodiamina. Esta reação forma um braço espaçador, como pode ser observado na figura 5 e 6.

Figura 5. Reação simplificada de aminação do suporte pó de sabugo-glioxil.

Formação do suporte pó de sabugo-glio-MANAE.

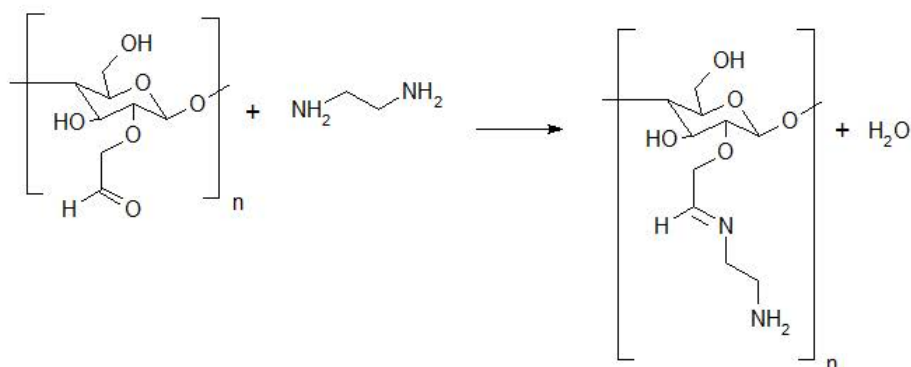
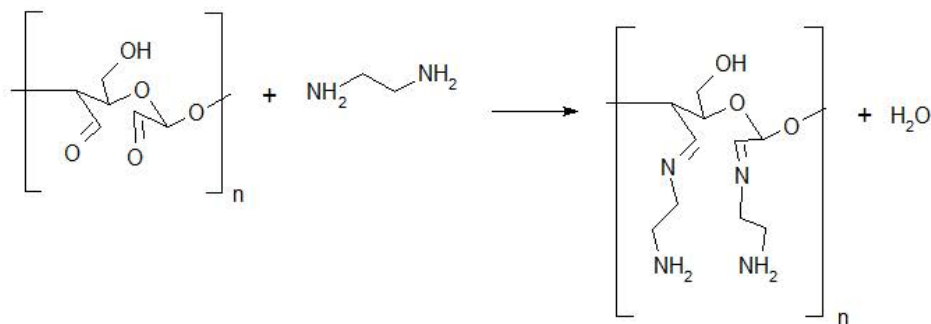


Figura 6. Reação simplificada de aminação do suporte pó de sabugo-oxidado.

Formação do suporte pó de sabugo-oxi-MANAE.



2.4.7. Formação do suporte pó de sabugo-glutaraldeído

A formação do suporte pó de sabugo-glutaraldeído teve como base a metodologia descrita por Betancor *et al* (2006). Aos suportes pó de sabugo-glio-MANAE e pó de

sabugo-oxi-MANAE foram adicionadas solução de glutaraldeído 15% em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7, na proporção 1g de pó de sabugo-MANAE úmido para 6 mL de solução, e mantido em agitação suave por 15 horas, em temperatura ambiente, para formação de dímeros de glutaraldeído na superfície do pó de sabugo-MANAE. Após, foi realizada a lavagem com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, exaustivamente; em seguida, com água destilada. Os suportes pó de sabugo-glio-glutaraldeído e pó de sabugo-oxi-glutaraldeído foram filtrados a vácuo e armazenados, sendo que o período entre a lavagem e sua utilização para imobilização da enzima não ultrapassou 2 horas.

2.5. Imobilização (preparo do derivado enzimático)

A imobilização foi realizada utilizando a seguinte proporção: para cada grama (peso úmido) de suporte pó de sabugo-glutaraldeído, foram utilizados 10 mL de solução de enzima parcialmente purificada 0,5% (v/v), aproximadamente 50 U, em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7. A mistura foi mantida em temperatura ambiente e em agitação suave, sendo que 1 mL da solução de enzima foi reservado previamente e mantido separado do suporte e nas mesmas condições da imobilização, visando monitorar a atividade (controle).

Para acompanhar a imobilização, a atividade enzimática do sobrenadante de imobilização e da solução de enzima controle foi determinada em tempos predeterminados. Finalizada a imobilização, os derivados foram lavados com água destilada em abundância e armazenados.

O rendimento da imobilização foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Rendimento da imobilização (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Onde A equivale à atividade da enzima livre (controle) e B, à atividade do sobrenadante.

2.6. Caracterização dos derivados

Os derivados foram caracterizados através de ensaio realizado com 20 mg de derivado em 4 mL de sacarose 2% em tampão acetato de sódio 50 mM , pH 5, a 50°C. A quantidade de açúcares redutores foi quantificada com DNS a cada 10 minutos, durante 40 minutos.

Para calcular a atividade dos derivados foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{U}{g} = \frac{\sum \text{Absorbância} \times 1000 \times \text{Volume total do ensaio (mL)}}{\epsilon \text{ (molar)} \times \sum \text{Tempo (min)} \times \text{Massa do derivado (g)}}$$

Observação: o volume total do ensaio deve conter o volume de solução de sacarose e o volume do derivado.

A atividade recuperada no derivado foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Atividade recuperada (\%)} = \frac{C}{U_{\text{esperado}}} \times 100$$

Onde C equivale à atividade do derivado após o final da imobilização e U_{esperado} a atividade esperada por grama de pó de sabugo pela quantidade de enzima oferecida ao suporte, considerando o rendimento da imobilização. O cálculo do U_{esperado} pode ser observado abaixo:

U esperado/g de pó de sabugo =

$$\frac{U \times \text{Volume de enzima usado na imobilização } (\mu\text{L})}{1000 \times \text{Massa do derivado usado na imobilização}} \times \text{Rendimento da imobilização}$$

Nesse caso, U corresponde à atividade enzimática do controle usado para acompanhamento da imobilização e o rendimento da imobilização deve ser usado na escala de 0-1.

2.6.1. Estabilidade à temperatura

Os derivados pó de sabugo-glutaraldeído-invertase foram incubados em diferentes temperaturas, com objetivo de avaliar o comportamento do derivado em comparação com a enzima livre.

Para determinar a estabilidade térmica, uma massa considerável dos derivados foi incubada a 60°C, na proporção 20 mg de derivado em 100 µL de tampão de reação (acetato de sódio 50 mM, pH 5). Uma solução de enzima livre purificada 0,5% em tampão de reação também foi incubada nas mesmas condições para controle. Em tempos determinados, parte do pó de sabugo e da enzima livre foram retiradas da incubação e realizada a atividade com solução de sacarose 2% em tampão de atividade, 50°C.

2.6.2. Inativação térmica e meia-vida

Para determinar a inativação térmica e meia-vida, a mesma metodologia foi utilizada, entretanto com temperatura a 65°C e 50°C, respectivamente.

2.1. Análise estatística

Para a comparação dos resultados de caracterização do suporte e dos dois derivados de pó de sabugo-invertase foi realizado teste-T, nível de significância $p < 0,05$.

Os testes estatísticos foram feitos utilizando o software SigmaStat.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição do suporte

O pó de sabugo de milho, após tratamento, teve sua composição alterada, conforme pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Composição química do pó de sabugo de milho cru e após tratamento.

Suporte	Composição química (%)						Soma
	Lignina total	Glucana	Xilana	Arabinosil	Acetil	Extrativos	
Sabugo cru	$12,73 \pm 0,03^a$	$28,02 \pm 0,05^b$	$24,16 \pm 0,16^a$	$7,15 \pm 0,02^b$	$2,32 \pm 0,02^a$	6,12	80,8
Sabugo tratado	$8,01 \pm 0,18^b$	$47,62 \pm 0,87^a$	$22,08 \pm 0,20^b$	$7,43 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,03^b$	0,97	86,1

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste t ($p > 0,05$)

Tendo em vista a utilização do pó de sabugo de milho para imobilização de enzimas, a maior disponibilidade porcentual de glucanas se torna ideal, dado que a ativação do suporte tem como principal alvo a celulose. Neste caso, o tratamento do suporte levou a um aumento significativo do porcentual final relativo de glucana disponível no suporte, de aproximadamente 28,02% para 47,62%.

Diversas técnicas de remoção de lignina de compostos lignocelulósicos são descritos na literatura, desde processos físicos, como explosão a vapor, água em alta temperatura, assim como processos químicos, com o uso de ácido, amônia, entre outros (Mosier *et al.*, 2005). Todos os métodos possuem o mesmo objetivo, ou seja, obter a celulose separada de outros componentes da biomassa, para que possa ser utilizada em outras tecnologias, como fermentação e imobilização de enzimas.

No tratamento utilizado neste trabalho houve associação de algumas técnicas que foram eficientes no preparo de um material com menor proporção de lignina final.

3.2. Oxidação do pó de sabugo de milho

O comportamento da reação de oxidação entre os grupos A, B, C, D e E foi semelhante após as 3 horas de monitoramento. Entre os grupos, foram consumidos $340,8 \pm 9,5$ μmols de NaIO_4 . Portanto, pode-se afirmar que dentre os grupos em estudo não houve diferença marcante e o prosseguimento da ativação é indiferente entre os grupos. Para dar continuidade à ativação do pó de sabugo foi escolhido o grupo E.

O pó de sabugo de milho, ao ser oxidado ao máximo, apresentou os seguintes resultados (Tabela 3):

Tabela 3. Resultado de oxidação máxima do pó de sabugo de milho com periodato de sódio (NaIO_4).

Suporte inicial	Quantidade de NaIO_4 consumido (μmols)
NaIO_4 0,1M (controle)	$52,1 \pm 18,3$
Pó de Sabugo de milho tratado	$562,3 \pm 18,7$
Pó de Sabugo-gliceril	$475,7 \pm 14,2$

Esses resultados indicam que o pó de sabugo de milho possui grande capacidade de formação de grupos aldeídos em sua superfície. Essa grande densidade de grupos pode ser um fator positivo ou negativo para a imobilização de enzimas, pois o suporte fará mais ligações com a enzima, possibilitando mais interações, mas ao mesmo tempo, poderá causar uma alteração conformacional na estrutura da enzima, que possivelmente perderá sua atividade.

Segundo Isobe *et al* (2011), a adição de grupos aldeídos na estrutura da celulose causa alteração mínima na estrutura, sendo que a quantidade de grupos aldeídos pode ser controlada pela quantidade de NaIO_4 adicionado. No caso destes autores, a adição de 0,6 mmol de NaIO_4 a 45 g de celulose resultou na oxidação de 18,6% das unidades de glicose da celulose e formação de 1,04 mmol de aldeídos por grama de celulose.

3.3. Ativação do suporte – determinação do consumo de periodato de sódio

A dosagem do consumo de periodato de sódio (NaIO_4) ao longo da reação de oxidação é importante para acompanhar a formação de grupos aldeído na superfície do suporte. Entretanto, o periodato de sódio é instável e, portanto, não é possível fazer uma dosagem dos grupos aldeído do suporte, uma vez que parte do consumo pode ser atribuída à degradação do periodato pela luz, por exemplo (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo de periodato de sódio para formação de grupos aldeído na superfície do suporte.

Suporte inicial	Suporte final	Tempo de reação (h)	NaIO ₄ oferecido (μmol)	NaIO ₄ consumido (μmol)	Massa final (g)
Sabugo-gliceril	Sabugo-glioxil	1,5	300	264,1 ± 3,8	0,901 ± 0,1
Sabugo tratado	Sabugo-oxidado	1,0	500	500,0 ± 0,0	2,050 ± 0,0

Deve ser levado em consideração que reação com o pó de sabugo-gliceril, transformado em pó de sabugo-glioxil teve como peso inicial úmido de 1 g e finalizou com média de 0,901. Tal alteração ocorreu pela perda de massa ao longo do processo de lavagem e da reação. Entretanto, ao observar a massa inicial e final do suporte oxidado direto, a massa inicial (1 g) dobrou, mesmo com as perdas ao longo do processo de lavagem. Portanto, ao final da reação, ambos suportes terão consumido quantidades aproximadas de periodato de sódio por grama de suporte final, ou seja, aproximadamente 250 μmols de periodato de sódio por grama úmido de suporte.

Outro fato importante é que na reação de oxidação é utilizada uma molécula de NaIO₄ para formação de 2 grupos aldeídos, entretanto, na reação para formação de grupos glioxil, um grupo aldeído se desprende da estrutura principal do suporte e é perdido na lavagem do pó de sabugo-glioxil. Esta perda não ocorre quando o pó de sabugo é oxidado diretamente, uma vez que o anel da glicose é aberto e os carbonos 2 e 3 irão compor os grupos aldeídos.

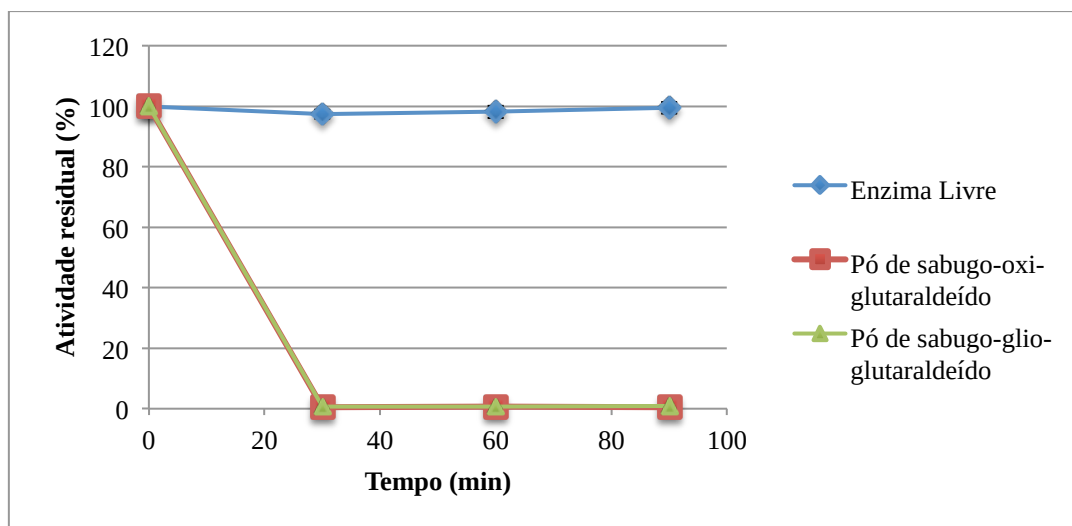
Considerando o experimento de oxidação máxima do pó de sabugo como 100% de oxidação, pode-se inferir que o pó de sabugo-oxidado possui 44,46% da sua estrutura oxidada e o pó de sabugo-glioxil, 55,51%.

3.4. Imobilização

O processo de imobilização da invertase no pó de sabugo-oxi-glutaraldeído e pó de sabugo-glio-glutaraldeído foi acompanhado pela diferença de atividade enzimática do sobrenadante da solução em processo de imobilização e atividade enzimática do controle (Figura 7). A queda da atividade do sobrenadante indica que a enzima está sendo imobilizada, enquanto que o controle mantém sua atividade elevada.

Nos dois casos, a imobilização teve um rendimento acima de 99%, sendo 99,48% para a imobilização da invertase no suporte pó de sabugo-glio-glutaraldeído, e 99,28% no pó de sabugo-oxi-glutaraldeído.

Figura 7. Acompanhamento da imobilização da invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em pó de sabugo de milho ativado a glutaraldeído.



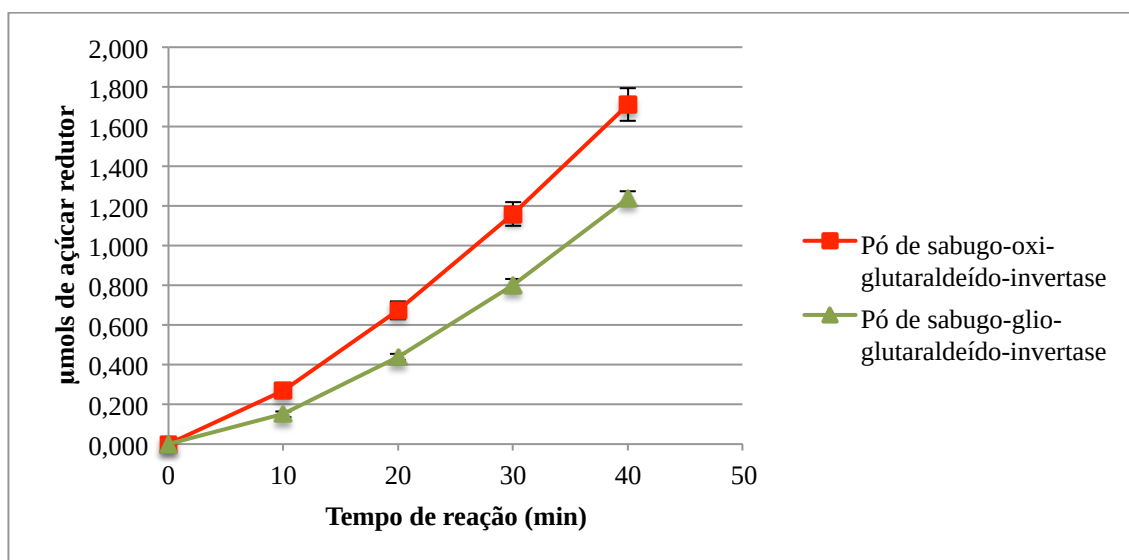
O glutaraldeído é uma substância muito utilizada em reações que envolvem proteínas, por sua alta reatividade e capacidade de realizar “crosslink”. O comportamento do glutaraldeído pode ser modulado através das condições da reação, como pH, força iônica e temperatura. Para a utilização com enzimas, o glutaraldeído tem como primeiro alvo o amino terminal da enzima, sendo que, após algum tempo de reação, começa a interagir com outros resíduos de aminoácidos (Migneault *et al*, 2004).

Um fator que pode ter auxiliado na rápida imobilização da invertase ao pó de sabugo de milho ativado a glutaraldeído foi a utilização de dímeros de glutaraldeído, obtidos pelas condições específicas da reação de ativação do suporte. Conforme Betancor *et al* (2006), o dímero de glutaraldeído promove uma imobilização mais rápida e, por ser um braço maior entre o suporte e a enzima, diminui a rigidez de movimentação da enzima. Além disso, a utilização de baixa força iônica na reação de imobilização faz com que a imobilização inicie com a interação intramolecular rápida entre os nucleófilos da enzima e o glutaraldeído. Os mesmos autores descrevem que, mesmo após a incubação dos derivados em soluções em altas concentrações salinas, não houve perda de atividade enzimática, sugerindo que há a formação de ligação covalente após a adsorção da enzima ao suporte ativado a glutaraldeído.

3.5. Caracterização dos derivados

Após o processo de imobilização, os derivados foram caracterizados com o objetivo de identificar o melhor derivado entre os dois em estudo. Inicialmente foi observada a atividade enzimática dos derivados, que pode ser observada na Figura 8.

Figura 8. Atividade enzimática dos derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase, liberação de açúcar redutor por tempo.



A partir desses resultados foi possível calcular a atividade enzimática dos derivados, assim como a atividade recuperada, conforme tabela 5:

Tabela 5. Caracterização dos derivados pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase.

Derivado	Atividade (U.g ⁻¹)	Atividade recuperada (%)
Pó de Sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase	30,497 ± 1,547 ^a	61,9
Pó de Sabugo-glio-glutaraldeído-invertase	21,035 ± 0,748 ^b	42,8

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste t (p>0,05)

Goulart *et al* (2008) utilizaram o mesmo processo de imobilização da invertase em agarose, ou seja, preparando um suporte com base em agarose ativada a glioxil,

MANAE e glutaraldeído, com as adaptações próprias para a agarose. Os autores descreveram que o derivado agarose-glutaraldeído-invertase apresenta atividade 9,9 U.mg⁻¹ de proteína e retenção de 33,6% da atividade em comparação com a invertase livre. Comparando os derivados com base na agarose (Goulart *et al*, 2008) e do pó de sabugo de milho, pode-se observar que o derivado de pó de sabugo de milho conseguiu reter maior atividade da invertase.

Santos (2010), ao imobilizar a invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* em pó de sabugo de milho ativado a glioxil e depois glutaraldeído, obteve uma atividade de 25,50 U.mL⁻¹ de derivado, ou seja, próxima da atividade encontrada nesse estudo.

Um processo semelhante de imobilização de invertase em poliuretano ativado em diferentes formas foi realizado por Cadena *et al* (2010). Os autores descrevem que o resultado da imobilização foi mais eficaz com o poliuretano ativado com HCl, polietilenoimina (PEI) e glutaraldeído, retendo 42,7% da atividade da invertase, sendo que, quando a imobilização foi desempenhada na presença do substrato da enzima (sacarose), um derivado melhor foi obtido, uma vez que o sítio catalítico da enzima ficou protegido.

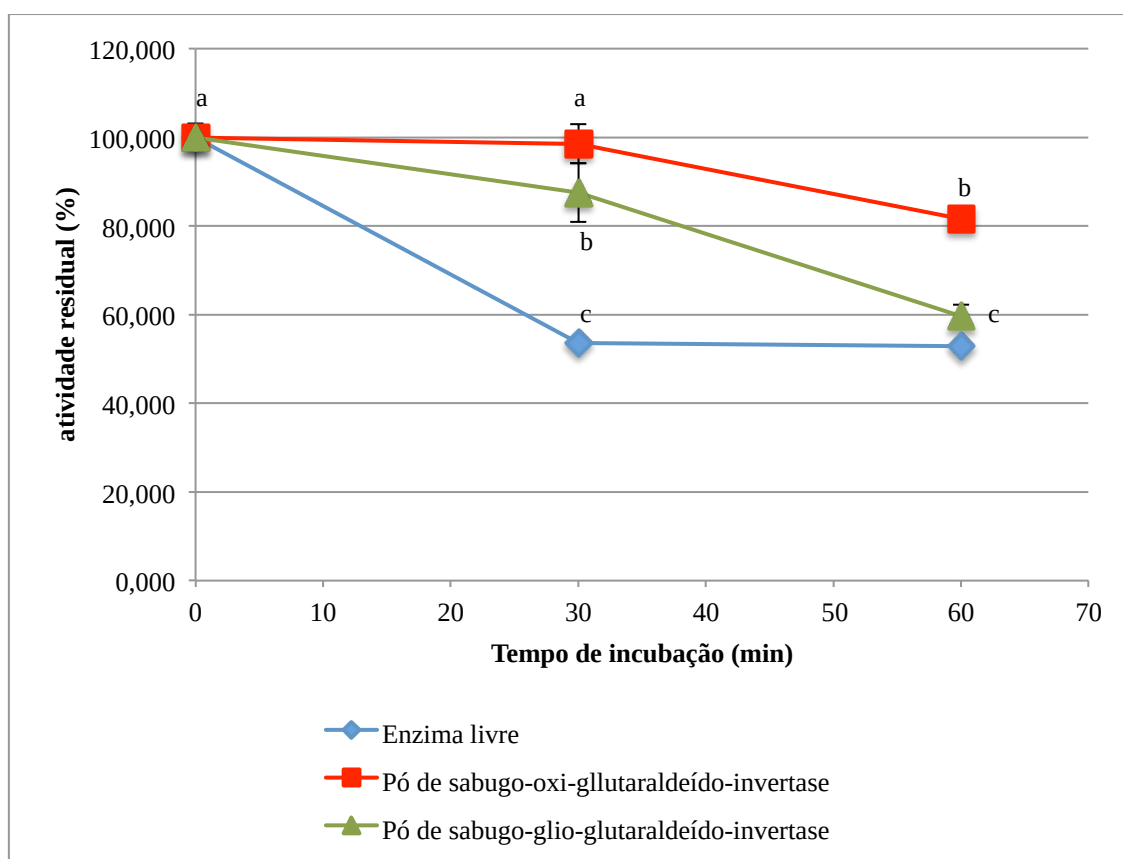
Amaya-Delgado *et al* (2006) também obtiveram um derivado de invertase utilizando *microbeads* de nylon-6 ativadas com glutaraldeído e PEI como braço espaçador. Nesse caso, o derivado apresentou 93% de retenção de atividade.

3.6. Estabilidade à temperatura, inativação térmica e meia-vida

A estabilidade tem como objetivo avaliar a atividade da enzima em temperatura levemente acima da temperatura ótima de atividade, neste caso, 60°C. O

comportamento da invertase livre e dos derivados em estudo pode ser observado na Figura 9, onde é possível verificar que os derivados foram mais estáveis que a enzima livre.

Figura 9. Estabilidade térmica da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* livre e derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase incubados a 60°C.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Após 1 hora de incubação a 60°C antes de iniciar a atividade enzimática nas condições ótimas, o derivado pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase foi o que apresentou melhor estabilidade, retendo $81,6\% \pm 1,1$ da atividade inicial, enquanto que

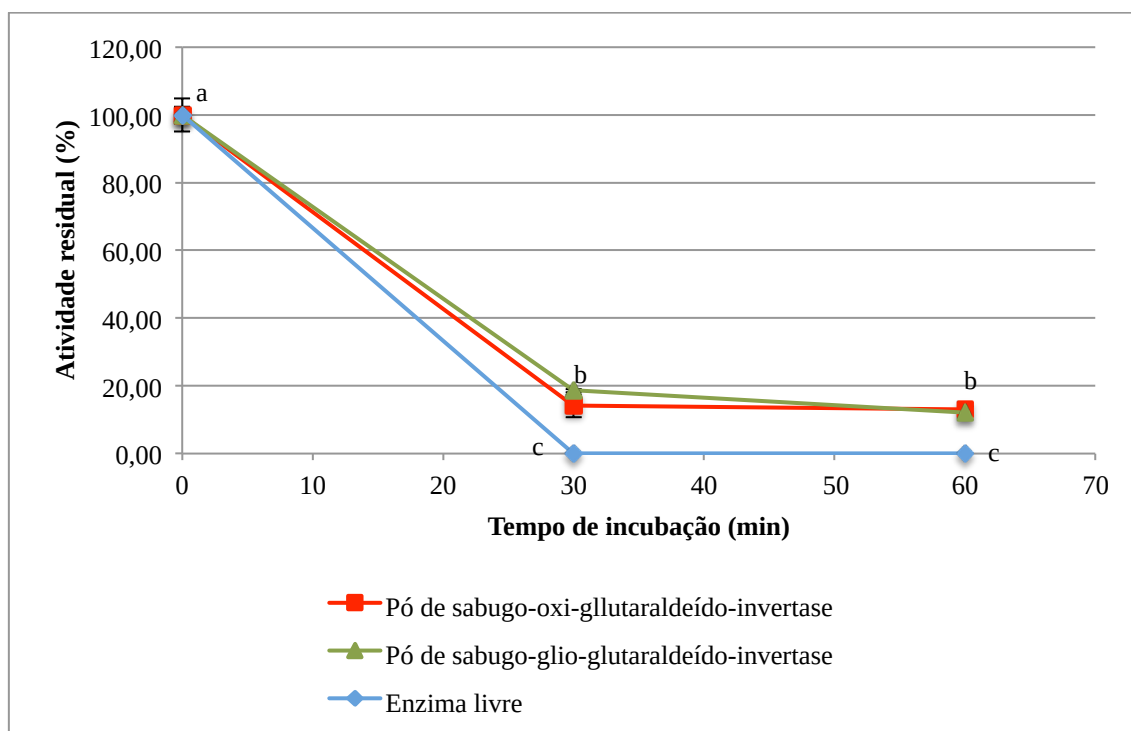
o derivado pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase apresentou $59,7\% \pm 2,7$, e a invertase livre, $52,9\% \pm 1,3$.

Goulart *et al* (2008), ao realizarem o experimento de estabilidade do derivado agarose-glutaraldeído-invertase, concluíram que o derivado mantinha aproximadamente 40% da atividade inicial após incubação a 60°C por 24 horas, enquanto que a invertase livre perdia totalmente sua atividade antes de completar 5 horas de incubação a 60°C, mostrando que o derivado possui maior estabilidade térmica que a enzima livre.

Este resultado foi diferente do observado por Amaya-Delgado *et al* (2006) que, ao incubar o derivado de invertase a 60°C, observou uma queda de mais de 60% da atividade inicial após 10 minutos de incubação.

Ao elevar a temperatura de incubação para 65°C, foi observado um rápido declínio da atividade enzimática da invertase livre e ambos os derivados, conforme figura 10.

Figura 10. Inativação térmica da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* livre e derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase incubados a 65°C.



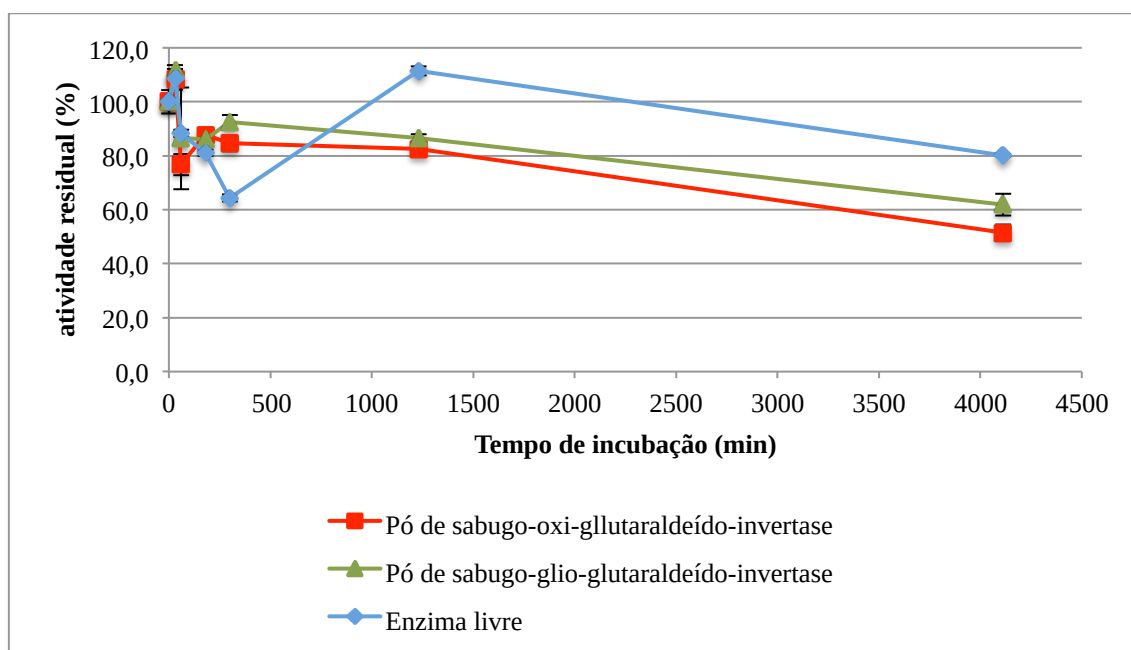
*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Conclui-se que os derivados têm sua atividade reduzida a menos de 20% em comparação com a atividade enzimática inicial após a incubação a 65°C por 30 minutos. Resultado semelhante foi encontrado por Santos (2010), que demonstrou que a invertase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em pó de sabugo de milho ativado a glutaraldeído tinha sua atividade reduzida após incubação a 65°C.

No estudo de meia-vida, os derivados e a invertase livre foram incubados a uma temperatura de 50°C, temperatura ótima de atividade. Conforme a Figura 11, pode-se perceber que após 20,5 horas de incubação (1230 minutos), a enzima livre apresenta

atividade $111,50\% \pm 1,77$ com relação à atividade inicial, enquanto que o derivado pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase exibiu $86,47\% \pm 1,50$ da atividade inicial, e o derivado pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase, $82,46\% \pm 1,37$. Após 68,5 horas (4110 minutos) de incubação, a atividade da invertase livre, assim como dos derivados, apresentou queda em comparação com a amostra anterior, ou seja, a invertase livre teve sua atividade reduzida para $80,09\% \pm 0,50$, o derivado pó de sabugo-glio-glutaraldeído-invertase para $61,90\% \pm 4,14$, e o derivado pó de sabugo-oxi-glutaraldeído-invertase $51,54\% \pm 2,97$.

Figura 11. Meia-vida da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* livre e dos derivados pó de sabugo de milho-oxi-glutaraldeído-invertase e pó de sabugo de milho-glio-glutaraldeído-invertase, incubados a 50°C.



Esses resultados indicam que ambos os derivados possuem comportamento semelhante quando incubados a 50°C, mas que diferem do comportamento da invertase livre, que possui um segundo pico de atividade após 20,5 horas de incubação.

4. Conclusão

O pó de sabugo de milho mostrou grande potencial no uso como suporte para imobilização de enzimas, pois fornece estrutura que possibilita alteração química, é estável nas condições de ativação, imobilização e atividade da enzima. Além disso, o sabugo de milho, por ser um resíduo agroindustrial, é um produto de fácil aquisição e manuseio, que, ao ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas, torna-se um produto biotecnológico com valor agregado e incentivo à sustentabilidade.

Os resultados mostraram que as diferentes técnicas de ativação resultam em derivados com diferentes características. Neste trabalho, o derivado obtido com a oxidação direta do pó de sabugo de milho foi melhor, pois, apesar de ser muito semelhante ao outro derivado, apresentou melhor estabilidade térmica e o procedimento de ativação é mais curto, economizando tempo e material, e evitando o uso de glicidol, composto altamente tóxico.

O procedimento de ativação do pó de sabugo de milho foi eficaz em imobilizar a invertase, que manteve sua atividade catalítica após a imobilização e lavagem do derivado. Por ter sido realizada ligação covalente, inicialmente unipontual, a invertase manteve-se estável após a imobilização, indicando que o derivado tem potencial para utilização em concentrações de substrato maiores e até em biorreatores. Além disso, não há registros na literatura da utilização de pó de sabugo de milho como suporte para imobilização de enzimas.

CAPÍTULO III – Uso de derivado invertase-pó de sabugo de milho para produção de açúcar invertido

Resumo

A utilização da invertase imobilizada pode contribuir na produção de açúcar invertido, pois pode ser utilizada em biorreatores para uso contínuo e repetido, com a obtenção de produto puro e de qualidade. Este trabalho objetivou avaliar um derivado de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em pó de sabugo de milho em biorreator e sua atividade após estocagem. A invertase foi obtida por congelamento e descongelamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o pó de sabugo de milho foi ativado por oxidação direta, etilenodiamina e glutaraldeído, e foi avaliada a carga máxima enzimática do suporte. O derivado foi armazenado a 4°C umedecido, em água destilada, tampão fosfato pH 7 e tampão acetato pH 4,5, e a atividade residual da enzima foi monitorada. O derivado foi utilizado em biorreator de batelada e leito fluidizado com solução de sacarose 40% e a taxa de hidrólise foi monitorada com DNS. A carga máxima enzimática foi atingida após 90 minutos de reação de imobilização, resultando em um derivado com $277,7 \pm 30,7 \text{ U.g}^{-1}$. Após 100 dias de estocagem, o derivado armazenado em tampão acetato foi capaz de manter $88,4 \pm 5,6\%$ da atividade inicial, significativamente maior do que os outros meios de armazenamento. Em batelada, o derivado hidrolisou 100% da solução de sacarose 40% em apenas 5 horas de operação, enquanto que quando utilizado em reator de leito fluidizado foi possível hidrólise de 24% em apenas 1 ciclo de 30 minutos. Um derivado com menor carga enzimática, quando utilizado em reator de leito fluidizado e solução de sacarose 40%, manteve a atividade enzimática igual à inicial após 10 ciclos. Esses resultados indicam

que o derivado de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho possui grande potencial para utilização em escala ampliada.

Abstract

The use of immobilized invertase can contribute to the production of invert sugar, because it can be used in bioreactors for continuous and repeated use, obtaining a pure and of high quality product. This work aimed to evaluate a bioreactor and storage of a derivative of *Saccharomyces cerevisiae* invertase immobilized in powdered corncob. The invertase was obtained by freezing and defrosting the yeast, and the corncob powder was activated by direct oxidation, ethylenediamine and glutaraldehyde, and the maximum enzyme load of the support was evaluated. The derivative was stored at 4°C dampened, in distilled water, phosphate buffer pH 7 and acetate buffer pH 4.5, and residual enzyme activity was monitored. The derivative was used in batch and fluidized bed bioreactors with 40% sucrose solution and the hydrolysis rate was monitored with DNS. The maximum enzyme load is reached after 90 minutes of immobilization reaction, resulting in an activity of $277.7 \pm 30.7 \text{ U.g}^{-1}$. After 100 days of storage, the derivative maintained in acetate buffer has retained $88.4 \pm 5.6\%$ of the initial activity, which is significantly greater than the others storage medias. The derivative in a batch reactor could hydrolyze 100% the sucrose solution in only 5 hours of operation, whereas when used in a fluidized bed reactor the hydrolysis rate was 24% in one cycle. A derivative with lower enzyme load, when operated in a fluidized bed reactor and 40% sucrose solution, could maintain the same initial activity after 10 cycles. These results indicate that the derivative of immobilized invertase in powdered corncobs has shown great potential for use on a larger scale.

1. Introdução

Uma das aplicações do uso de enzimas imobilizadas é a montagem de biorreatores industriais, que permitem o uso contínuo e repetido do derivado, trazendo benefícios na obtenção do produto. O mercado mundial de enzimas em 2010 ultrapassou U\$\$ 3,3 bilhões, sendo que deste montante, estima-se que US\$ 160 milhões equivalem às enzimas imobilizadas. Apesar dos diversos desafios, o comércio de enzimas imobilizadas está expandindo, sendo que a utilização na indústria de alimentos ainda continuará dominar o mercado (DiCosimo *et al*, 2013).

Com base em End & Schöning (2004), seguem abaixo alguns exemplos de enzimas imobilizadas que foram utilizadas industrialmente:

- Produção de inibidor de HMG-CoA redutase com o uso de lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em polipropileno, técnica usada pela empresa Bristol-Meyers Squibb;
- Síntese de L-veratrilglicina, intermediário na síntese do L-dopa (ou Levodopa), através da amidase imobilizada em polímero de quitosana, usado pela empresa Sankyo;
- Produção de ácido aspártico com aspartase imobilizada em sílica, técnica da empresa BioCatalytics.

Para que um derivado possa ser utilizado em escala industrial, ele primeiramente deve passar por experimentos laboratoriais para garantir sua aplicabilidade e segurança. Dentre estes experimentos há a simulação de condições de operação industrial em escala

laboratorial e avaliação do derivado em condições de armazenamento em longo prazo, por exemplo.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o derivado de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em pó de sabugo de milho em biorreatores e sua estocagem em longo prazo.

2. Material e métodos

2.1. Extração da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

Para obtenção da invertase (EC 3.2.1.26), 15 gramas de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae* da marca Fleishman, foram congelados. Após o descongelamento, foram adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 4°C e 7395 g. O extrato foi parcialmente purificado e concentrado 10 vezes com resina DEAE-Sephacel equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, pela técnica de *batch*.

2.2. Tratamento e ativação do pó de sabugo de milho

O pó de sabugo de milho foi inicialmente lavado com água destilada em abundância. Em seguida, foi tratado com álcool 70% e submetido à descompressão térmica em autoclave. Posteriormente, o pó de sabugo de milho foi mantido sob agitação de 140 rpm por 24 horas em NaOH 2 M, lavado abundantemente com água destilada e filtrado a vácuo. O pó de sabugo de milho foi desidratado em estufa a 40°C para armazenamento. A oxidação do pó de sabugo ocorreu com a utilização de periodato de sódio (NaIO₄) 100 mM na proporção 1:5:10 (pó de sabugo seco:periodato:água) pelo período de 1 hora, sob agitação suave e proteção de luz. O

consumo de periodato de sódio foi monitorado através de reação colorimétrica com iodeto de potássio (KI) 10% e solução saturada de bicarbonato de sódio, conforme metodologia descrita por Guisan (1988). O pó de sabugo oxidado foi aminado conforme metodologia descrita por Fernández-Lafuente et al (1993) e atualização de Benassi et al (2013), na qual 1 grama (peso úmido) de suporte era adicionado a 5,715 mL de etilenodiamina 2 M, pH 10, por 6 horas, sendo as 2 últimas na presença de 0,0571 g de borohidreto de sódio (NaBH_4). Após o período de reação, o suporte foi lavado com água destilada em abundância, tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4, e água destilada novamente. A última etapa da ativação do suporte foi a inserção de dímeros de glutaraldeído à sua estrutura, conforme metodologia descrita por Betancor et al (2006), na qual 1 grama (peso úmido) do suporte aminado foi adicionado de 6 mL de solução de glutaraldeído 15% em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7, sob agitação suave por 15 horas. Após, foi realizada a lavagem com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, exaustivamente, seguido de água destilada.

2.3. Imobilização

O pó de sabugo de milho ativado (1 grama) foi incubado com 9 mL de solução de extrato parcialmente purificado contendo de 49 a 589 U enzimáticas em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, por no mínimo 2 horas, em temperatura ambiente. O rendimento da imobilização foi determinado pela atividade enzimática do sobrenadante, medida ao longo do período de imobilização.

2.4. Limite máximo de carga enzimática

Com o objetivo de identificar o limite máximo de carga enzimática do pó de sabugo de milho ativado, foram utilizadas soluções de enzima purificada em concentrações diferentes na imobilização, sendo elas 0,5%, 2,5% e 50%. Após a

imobilização, foram realizados cálculos de rendimento da imobilização, atividade do derivado após lavagem e atividade recuperada¹.

2.5. Avaliação do derivado em condições de estocagem

O derivado de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho foi armazenado a 4°C em diferentes soluções para avaliação da retenção da atividade. Foram utilizados tampão acetato de sódio 50mM pH 4,5, conforme Amaya-Delgado *et al* (2006), tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0 e água destilada. A atividade enzimática da invertase imobilizada em pó de sabugo de milho foi avaliada por períodos determinados, através da técnica de dosagem de açúcares redutores com ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

2.6. Reator em batelada

Foi montado biorreator em batelada, de dimensões de 4 cm de diâmetro por 5,5 cm de altura, com sacarose 40% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, e 1% de derivado (v/m). O biorreator foi operado a 50°C com agitação de 150 rpm por eixo de transmissão e lâminas que cobriram dois terços do diâmetro do vaso do reator. A taxa de hidrólise da sacarose foi monitorada com DNS ao longo do tempo.

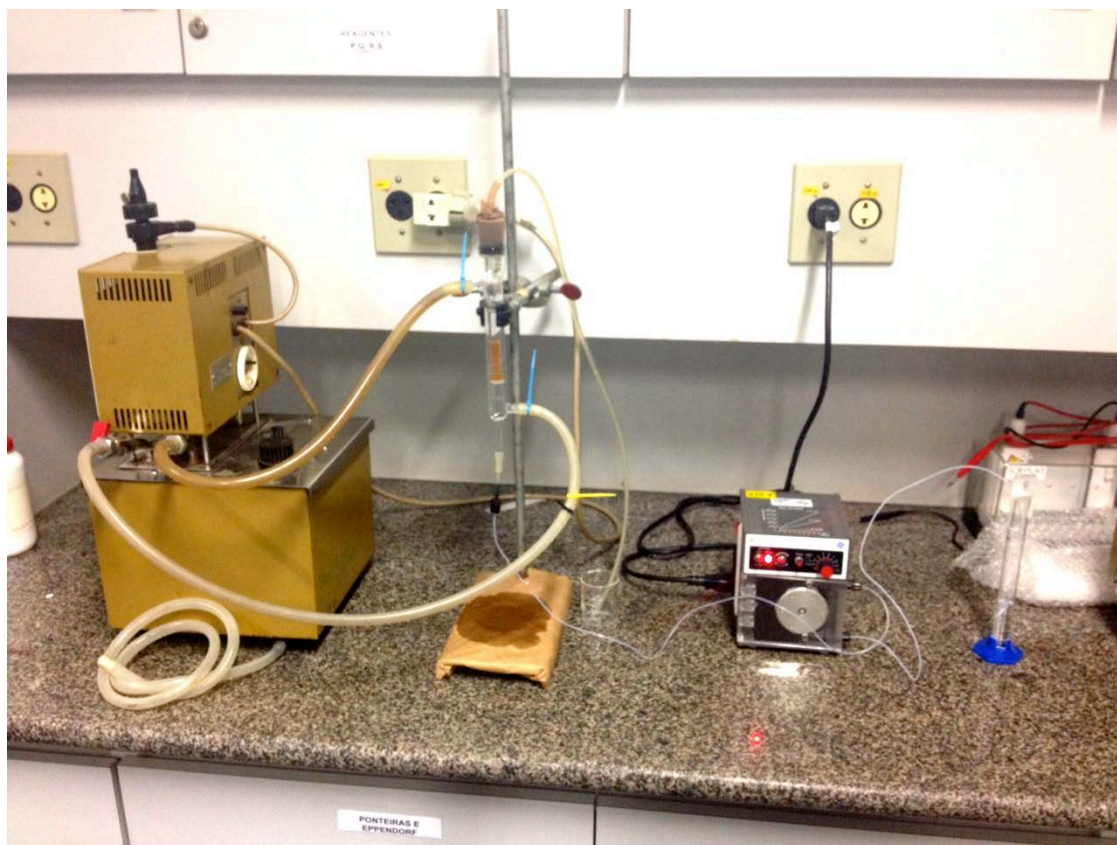
2.7. Reator de leito fluidizado

Para hidrólise contínua da sacarose, um reator de leito fluidizado de 12,5 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro, equipado com uma jaqueta conectada a um banho de aquecimento e circulação de água, foi carregado com 0,5 e 1 grama de derivado (figura 1). A temperatura foi mantida a 50°C e 50 mL de solução de sacarose 40% em tampão

¹ Detalhes sobre os cálculos de rendimento de imobilização, atividade enzimática do derivado e atividade recuperada estão descritos no capítulo II, seção 2.5. – Imobilização (preparo do derivado enzimático).

acetato de sódio 50 mM, pH 5, alimentaram o reator. O fluxo de operação foi ajustado para $1,15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ com ajuda de uma bomba peristáltica e a taxa de hidrólise monitorada com DNS.

Figura 1. Reator de leito fluidizado ligado a bomba peristáltica e banho de aquecimento e circulação.



3. Resultados e Discussão

3.1. Carga enzimática

Na imobilização com baixa concentração de enzima (49 U), ou seja, uso de solução de enzima em concentração de 0,5% para a imobilização, o suporte foi capaz de reter 61,9% da atividade da enzima livre, portanto resultando em um derivado com $30,5 \pm 1,5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

Ao utilizar concentração média de enzima (117 U), ou seja, uso de solução de enzima em concentração de 2,5%, houve retenção de 74% da atividade enzimática, resultando em um derivado com $84,2 \pm 7,9 \text{ U.g}^{-1}$.

Na utilização de enzima em excesso no processo de imobilização (589 U), ou seja, uso de solução de enzima em concentração de 50%, o período de interação entre a enzima e o suporte foi ampliado para 23 horas, com o objetivo de permitir o aumento da carga enzimática do suporte. Desta feita, após este período, a atividade do sobrenadante da mistura enzima/suporte caiu para 6,54% da atividade inicial, indicando que a enzima foi ligada ao suporte. Entretanto, ao realizar a lavagem do derivado e dosagem da atividade enzimática, verificou-se que houve a retenção de apenas 45,3% da atividade da enzima livre, resultando em um derivado com $244,2 \pm 31,6 \text{ U.g}^{-1}$. Esse resultado indica que houve, além da imobilização por ligação covalente, adsorção da enzima, a qual foi eliminada no processo de lavagem do derivado. Nesse caso, o tempo de 90 minutos também é suficiente para atingir a carga máxima de invertase no suporte.

Ao reduzir a oferta de unidades enzimáticas para o suporte ativado no momento da imobilização para 295U, ou seja, o uso de solução de enzima em concentração de 25%, por período de 90 minutos, há queda da atividade enzimática do sobrenadante para 26,0% da atividade inicial. Entretanto, após lavagem, o derivado apresentou $277,7 \pm 30,7 \text{ U.g}^{-1}$, ou seja, muito semelhante ao encontrado utilizando alta concentração de solução de enzima e retenção de 50,8% da atividade da enzima livre. Este resultado indica que houve um aprimoramento no processo de imobilização, o qual atingiu a carga máxima enzimática, com menor perda de enzima livre.

3.2. Estocagem

Diversas enzimas não são estáveis com mudanças de condições de armazenamento. Nesse contexto, avaliar a atividade residual da enzima imobilizada no derivado é importante para estimar o potencial comercial do derivado. O derivado de pó de sabugo de milho e invertase, ao ser estocado em tampão acetato de sódio, manteve sua atividade inicial sem queda estatisticamente significativa no final do estudo. Por outro lado, quando mantido em outras condições (úmido, água destilada ou tampão fosfato de sódio), há queda expressiva de atividade residual da enzima, sendo que o método de armazenamento úmido foi o que apresentou menor atividade residual após 100 dias de estocagem (tabela 1).

Tabela 1. Atividade residual (%) da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por ligação covalente em pó de sabugo de milho em diferentes condições de armazenamento a 4°C.

Ambiente de armazenamento	Tempo de armazenamento			
	8 dias	21 dias	45 dias	100 dias
Úmido	51,2 ± 3,4 ^{bAB}	33,3 ± 6,2 ^{cC}	18,9 ± 2,1 ^{dB}	18,2 ± 2,0 ^{eC}
Água destilada	61,7 ± 8,0 ^{bA}	43,7 ± 1,1 ^{cBC}	41,1 ± 3,2 ^{cB}	34,6 ± 4,1 ^{cB}
Tampão acetato de sódio pH 4,5	66,6 ± 8,7 ^{bA}	83,7 ± 8,3 ^{abA}	82,4 ± 16,5 ^{abA}	88,4 ± 5,6 ^{abA}
Tampão fosfato de sódio pH 7	42,1 ± 4,4 ^{bB}	49,0 ± 3,3 ^{bB}	25,4 ± 3,3 ^{cB}	25,2 ± 4,9 ^{cBC}

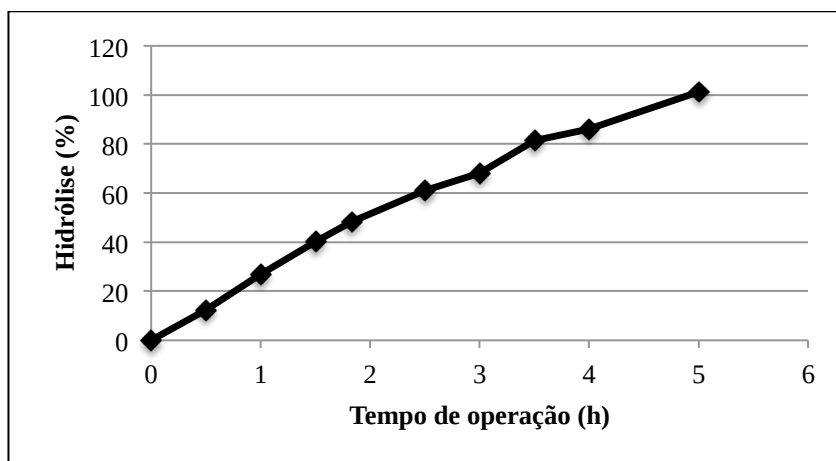
*Médias do mesmo ambiente de armazenamento (linha) seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). A letra ^a corresponde à atividade inicial da invertase imobilizada. Médias do mesmo tempo de armazenamento (coluna) seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

3.3. Reator em batelada

Nesse estudo, o derivado usado no reator em batelada possuía carga máxima de invertase com o objetivo de hidrolisar a sacarose em taxas mais elevadas. Ao longo do processo foi possível verificar que a invertase imobilizada conseguiu manter conversão média de 10,8% a cada meia hora, atingindo 100% de inversão no tempo total de 5 horas (figura 2).

Após o uso no reator, a invertase imobilizada foi submetida a um experimento isolado. Neste experimento o derivado foi lavado em tampão de atividade e água destilada, e em seguida avaliado quanto à atividade enzimática residual. Observou-se que este derivado utilizado e lavado apresentava $397,6 \pm 27,7 \text{ U.g}^{-1}$, que corresponde a um aumento de 62,8% da atividade enzimática da invertase imobilizada sem uso. Este resultado indica que não houve liberação da enzima com o uso prolongado em alta concentração de sacarose, avaliação essencial para assegurar um produto de alta qualidade e pureza, além de garantir a reutilização do derivado. Este aumento de atividade enzimática pode servir como base de estudos futuros.

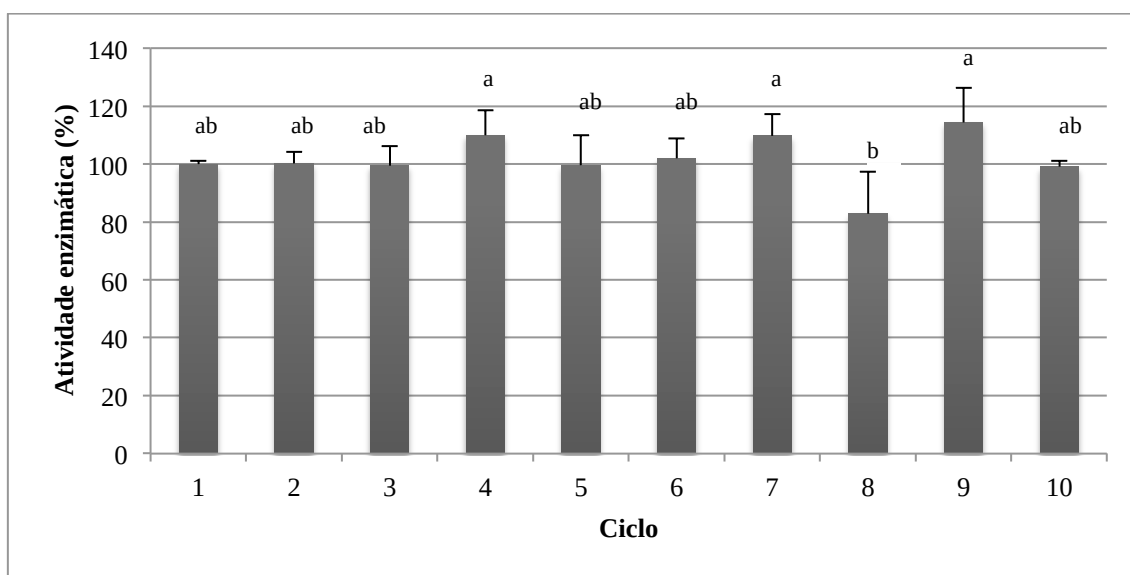
Figura 2. Taxa de inversão (%) de sacarose 40% em biorreator de batelada carregado com 1% de invertase imobilizada em pó de sabugo de milho.



3.4. Reator de leito fluidizado

O reator montado com 0,5 gramas de derivado com baixa carga enzimática apresentou baixa taxa de hidrólise da sacarose 40%. Entretanto, ao ser alimentado por 10 ciclos com 30 mL de sacarose 40%, sendo que nos intervalos o reator foi lavado com 200 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, a atividade enzimática do derivado manteve-se semelhante à atividade enzimática do primeiro ciclo, inferindo-se que não houve perda de atividade ao longo da reutilização (tabela 2).

Figura 3. Atividade residual da invertase imobilizada em pó de sabugo de milho, submetida a 10 ciclos de hidrólise de sacarose 40% em reator de leito fluidizado.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Entretanto, o mesmo reator, ao ser alimentado com 1 grama de derivado com alta carga enzimática, foi capaz de hidrolisar 50 mL de sacarose 40% numa taxa de 24,02%

em apenas 1 ciclo, indicando que um aprimoramento das condições do reator podem aumentar a taxa de hidrólise.

Esses resultados indicam que, em reator de leito fluidizado, o derivado é capaz de manter atividade por diversos ciclos e em concentrações elevadas de substrato.

4. Conclusão

O derivado invertase-pó de sabugo de milho mostrou grande potencial para produção de açúcar invertido, uma vez que se manteve funcional com o uso de altas concentrações de sacarose, além de ser estável nessas condições, ou seja, não há rompimento da interação enzima-suporte.

O uso de altas concentrações de sacarose no protocolo de atividade enzimática da invertase imobilizada é dificilmente encontrado na literatura, portanto, este trabalho infere que o modelo de ativação e imobilização utilizado obteve sucesso.

Além disso, o estudo de estocagem foi importante para avaliar o comportamento do derivado, o qual manteve atividade enzimática elevada quando armazenado em tampão acetato de sódio, pelo período de 100 dias. Este dado é essencial, uma vez que, tanto em condições laboratoriais, como em trabalhos piloto ou industriais, o procedimento de imobilização poderá ser realizado algum momento antes do uso efetivo do derivado.

Apesar da necessidade de maiores estudos para confirmar a segurança alimentar do uso do derivado invertase-pó de sabugo de milho para a produção de açúcar invertido, este trabalho conclui que este derivado possui grande potencial para ser estudado em maior escala.

BIBLIOGRAFIA

AMAYA-DELGADO, L.; HIDALGO-LARA, M.E.; MONTES-HORCASITAS, M.C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6-microbeads. *Food Chemistry*, v. 99, v.2, p.299-304, 2006.

BELEZE, J.R.F.; ZEOULA, L.M.; CECATO, U.; DIAN, P.H.M.; MARTINS, E.N.; FALCÃO, A.J.S. Avaliação de cinco híbridos de milho (*Zea mays*, L.) em diferentes estádios de maturação. 2. Concentração dos componentes estruturais e correlações. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.3, p.538-545, 2003.

BENASSI, V.M.; SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; GUIBAN, J.M.; MATEO, C.; LIMA, M.S.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.89, p. 93-101, 2013.

BETANCOR, L.; LÓPES-GALLEGU, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M.. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.877-882, 2006.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J.. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, n.2, p. 93-99, 1987.

BOBBIO, F.S.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 3ª edição. São Paulo: Varela, 2003. 238 p.

BOWSKI, L.; SAINI, R.; RYU, D.Y.; VIETH, R.. Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase.. *Biotechnology and bioengineering*, v. 13, p. 641-656, 1971.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

BRIGIDA, A.I.; PINHEIRO, A.D.; GONÇALVES, L.R. Immobilization of *Candida antartica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.146, n.1-3, p. 173-187, 2008.

CADENA, P.G.; JERONIMO, R.A.S.; MELO, J.M.; SILVA, R.A.; LIMA FILHO, J.L.; PIMENTEL, M.C.B.. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dracon. *Bioresource Technology*, v.101, p. 1595-1602, 2010.

COMBES, D., MONSAN, P.. Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. *Carbohydrate research*, v. 117, p.215-228, 1983.

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar*, v.1 safra 2014/15, n.1 primeiro levantamento, abril, 2014. Brasília: CONAB, 2014, 25p.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira: Grãos*, safra 2011/2012, décimo levantamento, julho, 2012. Brasília: CONAB, 2012. 29p.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.121, p. 404-427, 1964

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A.J.; BOHLMANN, G.. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, v.42, p. 6437-6474, 2013.

D'SOUZA, S.F.; GODBOLE, S.S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal of biochemical and biophysical methods*, v.52, n.1, p.59-62, 2002.

END, N.; SCHÖNING, K.U.. Immobilized biocatalysts in industrial research and production. *Topics in current chemistry*, v.242, p.273-317, 2004.

ESMON, P.C.; ESMON, B.E.; SCHAUER, I.E.; TAYLOR, A.; SCHEKMAN, R.. Structure assembly and secretion of octameric invertase. *The journal of biological chemistry*, v.262, n.9, p.4387-4394, 1987.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M.. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A

new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p.546-550, 1993.

GÁSCON, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of properties of purified internal and external invertases from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v. 243, p. 1573-1577, 1968.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, 2008. 511p.

GOULART, A.J.; BENEDETTI, A.C.E.P.; TAVANO, O.L.; MARQUES, D.P.; CONTIERO, J.; CARMONA, E.C.; MONTI, R.. Multipoint immobilization of invertase on agarose: stability and kinetic properties. *Current trends in biotechnology and pharmacy*, v.2, n.3. p. 462-470, 2008.

GUERRERO, S.; LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M.. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.2, p. 31-29, 2001.

GUISAN, J.M.. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microbiology Technology*, v.10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J.M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2ª edição. Totowa: Humana Press, 2006. 449p.

HUDSON, C.S.. The inversion of sucrose by invertase. VIII. An improved method for preparing strong solutions from top or bottom yeast. *Journal of the American Chemical Society*, v.36, n.7, p. 1566-1571, 1914.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa Industrial – Produto* – 2011, volume 30, número 2. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 188p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa Industrial – Produto* – 2010, volume 29, número 2. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 183p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa Industrial – Produto* - 2009, volume 28, número 2. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 206p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa Industrial – Produto* - 2008, volume 27, número 2. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. 209p.

ISOBE, N.; LEE, D.; KWON, Y.; KIMURA, S.; KUGA, S.; WADA, M.; KIM, U.. Immobilization of protein on cellulose hydrogel. *Cellulose*, v.18, p.1251-1256, 2011.

KOBLITZ, M.G.B. *Bioquímica de Alimentos*. Teoria e Aplicações Práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 242p.

KOTWAL, S.M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, v.27, p. 311-322, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

MAHMOUD, D.A.R. Immobilization of invertase by a new economical method using wood sawdust waste. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v.1, n.4., p. 364-372, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p.1451-1463, 2007.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C.. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, v.37, p. 790-802, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-429, 1959.

MONSAN, P.; COMBES, D.; ALEMZADEH, I. Invertase covalent grafting onto corn stover. *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, p. 658-664, 1984.

MOROZ, R.D.; SULLIVAN, J.P.; TROY, J.P.; BROEG, C.B. Levulose and Invert Sugar. *Sugar y Azucar*, v.68, n.8, p.46-52, 1973.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.96, p.673-686, 2005.

NELSON, J.M.; GRIFFIN, E.G. Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, v.38, n.5, p.1109-1115, 1916.

SANTOS, A.F. *Imobilização de invertase comercial e de Saccharomyces cerevisiae em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar*. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SIRVIO, J.; HYVAKKO, U.; LIIMATAINEN, H.; NIINIMAKI, J.; HORMI, O.. Periodate oxidation of cellulose at elevated temperatures using metal salts as cellulose activators. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, v. 3, p. 1293-1297, 2011.

TRIMBLE, R. B.; MALEY, F.. Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.252, n.12, p.4409-4412, 1977.

VITOLO, M. Invertase. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. São Paulo: Legis Summa, 2004. p.207-221.

VETTORAZZI, G., MACDONALD, I. *Sacarose: Aspectos Nutricionais e de Segurança no uso do Açúcar*. São Paulo: Hucitec, 1989. 226p.