
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

TÉCNICAS DE RECICLO DE PROTEASE VISANDO A DESFLOCULAÇÃO
CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

HENRIQUE ROSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Abril - 2008

**TÉCNICAS DE RECICLO DE PROTEASE VISANDO A
DESFLOCULAÇÃO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae***

HENRIQUE ROSA

Orientador: Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus
de Rio Claro, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Microbiologia Aplicada)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Abril de 2008**

576 Rosa, Henrique
R788t Técnicas de reciclo de protease visando a desfloculação celular de *Saccharomyces cerevisiae* / Henrique Rosa. – Rio Claro : [s.n.], 2008
v, 98 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Microorganismos. 2. Floculação. 3. Imobilização. 4. Papaína. 5. Quitina. 6. Celulose. 7. Biotecnologia industrial.
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me acompanhado nesta jornada, mesmo nos momentos em que eu não acreditava nisso.

Aos meus pais, por tudo o que já fizeram por mim, por estarem sempre ao meu lado e pela certeza de que sempre estarão.

Aos meus avós, Alcides Pilan e Maria de Lourdes Pangoni Pilan, meus segundos pai e mãe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, por sua paciência comigo durante todo esse tempo desde a graduação, por toda a experiência com ele adquirida e pela compreensão com relação às dificuldades encontradas no decorrer do trabalho.

Ao amigo e companheiro de trabalho no laboratório, Douglas Fernandes da Silva, sem o qual esse trabalho não existiria.

À Dra. Valéria Marta Gomes de Lima, pelas valiosas orientações teóricas e práticas acerca do meu trabalho.

Ao amigo e ex co-orientador, Dr. Oldair Donizeti Leite, por todo o aprendizado, pelos valiosos conselhos, pelas carapaças de camarão e pela revisão deste trabalho.

Ao amigo Vinicius D’Arcádia Cruz, pelo companheirismo, pela experiência de vida e pela companhia durante as longas e cansativas (porém muito divertidas) viagens semanais até Rio Claro.

À amiga e companheira desde a graduação, Cíntia Regina Rodrigues da Silva, por sua amizade, companheirismo e por ter defendido sua dissertação antes de mim para, assim, ter condições de me aconselhar sobre os procedimentos finais do trabalho.

Ao amigo, parceiro, colega de trabalho e compadre, Prof. Vinicius Eduardo Moreira Tomazinho, por sua amizade incondicional desde a infância, seu companheirismo no trabalho, nos cafés e nos balcões, sem esquecer sua fundamental contribuição na revisão ortográfica deste trabalho.

Ao amigo e “guru” João Carlos Merlim, com o qual adquiri, em um ano, experiência e aprendizado que talvez eu não conseguisse em vinte.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (hoje, Laboratório de Biotecnologia Industrial) da Unesp de Assis pelo apoio técnico e pelo companheirismo.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, por ter me acolhido e fornecido todo o suporte necessário para a fase experimental de minha pesquisa científica.

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo suporte financeiro.

Ao grupo Nova América pela doação das amostras de fermento e de bagaço de cana.

À Dra. Sandra Mara Martins Franchetti, pelo auxílio e presteza dispensados em relação aos processos administrativos e burocráticos da etapa final deste trabalho.

Aos amigos Bruno Bruschi, Bruno Simonetti, Daniel Queiroz e Luís Fernando Rosa pelo apoio, companheirismo e amizade.

A todos que, de uma forma ou de outra participaram da elaboração desse trabalho e que porventura eu tenha esquecido de citar aqui, minhas desculpas e meus mais sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUÇÃO.....	3
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
4.1. Contaminação microbiana na indústria de álcool.....	6
4.2. Flocculação.....	8
4.2.1. Causas da flocculação.....	10
4.2.2. Controle da flocculação.....	15
4.3. Papaína.....	17
4.4. Imobilização de enzimas.....	18
4.4.1. Quitina.....	21
4.4.2. Celulose.....	23
4.4.3. Glutaraldeído.....	25
4.4.4. Polietilenoimina.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1. Material de estudo.....	29
5.1.1. Microrganismos utilizados.....	29
5.1.2. Papaína (EC 3.4.22.2).....	29
5.1.3. Glutaraldeído.....	30
5.1.4. Polietilenoimina (PEI).....	30
5.1.5. Suportes.....	30
5.1.5.1. Quitina.....	30
5.1.5.2. Celulose.....	31
5.2. Imobilizações.....	33
5.2.1. Imobilização da papaína em quitina.....	33

5.2.2. Imobilização da papaína em celulose de bagaço de cana.....	34
5.3. Procedimentos analíticos.....	35
5.3.1. Determinação da atividade proteolítica.....	35
5.3.2. Determinação de proteínas.....	35
5.3.3. Efeito do glutaraldeído e da polietilenoimina sobre a atividade enzimática..	35
5.3.4. Determinação da viabilidade celular do fermento submetido ao tratamento enzimático.....	36
5.4. Determinação do rendimento da atividade enzimática.....	36
5.5. Desfloculação celular.....	37
5.5.1. Utilização da enzima imobilizada na desfloculação celular.....	37
5.5.2. Utilização da enzima solúvel na suspensão de fermento para a desfloculação celular.....	38
5.6. Tratamento estatístico.....	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1. Concentração mínima de papaína livre necessária para a desfloculação do fermento.....	40
6.2. Viabilidade celular do fermento submetido à alta concentração de papaína.....	42
6.3. Efeito do glutaraldeído e da polietilenoimina sobre a atividade enzimática.....	42
6.4. Imobilização da papaína em quitina.....	47
6.5. Imobilização da papaína em celulose de bagaço de cana.....	60
6.6. Reciclo da enzima solúvel na suspensão de leveduras para a desfloculação celular.....	64
7. CONCLUSÕES.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. RESUMO

Durante a de fermentação alcoólica industrial, contaminações são comuns no meio fermentativo, causadas por bactérias e/ou leveduras selvagens. Um dos principais problemas devido a contaminações microbianas é a floculação das leveduras, responsável por dificuldades operacionais na indústria e implicações econômicas. A floculação pode ser resolvida por um tratamento enzimático à base de proteases, que agem na parede celular da levedura, substituindo o tratamento convencional, que emprega ácido sulfúrico. No entanto, o tratamento enzimático é economicamente inviável para a aplicação industrial. Para reduzir esses custos, o presente trabalho estudou duas técnicas para reutilizar a atividade catalítica da papaína. A primeira foi baseada na recuperação da enzima livre pela centrifugação da suspensão de leveduras. A segunda foi a imobilização da enzima nos suportes quitina e bagaço de cana (celulose). A enzima foi imobilizada em quitina tratada ou não com glutaraldeído, empregando diferentes concentrações de polietilenoimina, perfazendo 6 diferentes protocolos de imobilização em quitina. A imobilização em bagaço de cana foi efetuada pela ativação da celulose com ácido periódico. A quantidade de proteína imobilizada e os rendimentos da atividade da enzima imobilizada foram muito baixos nas técnicas de imobilização. A atividade específica da enzima imobilizada, no entanto, foi satisfatória em algumas imobilizações, com exceção daquelas que utilizaram suporte tratado com glutaraldeído, mostrando o efeito negativo desse reagente sobre a papaína e a importância do aprimoramento dessa técnica. A suspensão de leveduras tratada com papaína livre foi centrifugada e esse processo foi realizado 14 vezes, usando a mesma papaína recuperada. O uso de SDS nesse processo para potencializar a desfloculação celular não foi eficiente. A centrifugação da suspensão de células de leveduras após o tratamento com enzima livre deve ser estudada para fins industriais.

2. ABSTRACT

During the industrial alcoholic fermentation contaminations are common due to bacterium and/or wild yeasts in the wort. One of the principal problems due to microbial contaminations is the yeasts flocculation, responsible by industrial operational difficulties and economic implications. The flocculation can be solved by protease enzymatic treatment, which acts on the yeast cellular wall, changing the conventional treatment, which employs sulfuric acid. However, the enzymatic treatment is economically impracticable for industrial application. In order to reduce these costs, this work studied two techniques to reuse the catalytic activity of papain. The first one was based on the free enzyme recuperation by yeast suspension centrifugation. The second one was the enzyme immobilization on chitin and sugar cane bagasse (cellulose) supports. The enzyme was immobilized on treated or non-treated chitin with glutaraldehyde, using different concentrations of polyethylenimine, resulting in 6 different immobilization techniques on chitin. The immobilization on cane bagasse was made by cellulose activation with periodic acid. The quantity of immobilized protein and its activity yields were very low in the immobilization techniques. Nevertheless, the specific activity of the immobilized enzyme was satisfactory in several immobilizations, except those which have used treated-support with glutaraldehyde, showing the negative effect of this reagent on papain and the importance of improvement of this technique. The yeast suspension treated with free papain in solution was centrifuged and this process was done 14 times, using the same recovered papain. The use of SDS in this process to improve the cell deflocculation wasn't efficient. The yeast cell suspension centrifugation after free-enzyme treatment must be studied to industrial purposes.

3. INTRODUÇÃO

As indústrias sucroalcooleiras enfrentam atualmente um sério problema de contaminação microbiana, devido à impossibilidade de manter as condições assépticas adequadas para seu funcionamento. O caldo-de-cana, principal substrato para a fermentação alcoólica, nesse caso, funciona como um excelente meio para o desenvolvimento de bactérias e/ou leveduras contaminantes, devido aos seus constituintes nutricionais, bem como às condições de pH e temperatura proporcionadas por esse processo (GALLO, 1989).

Vários são os problemas causados pela contaminação microbiana, sendo que pode-se destacar, dentre outros, o consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, a queda da viabilidade e morte das células de levedura, devido às toxinas lançadas no meio pelos contaminantes (AMORIM; OLIVEIRA, 1982a), fermentações secundárias oriundas da atividade desses microrganismos (BOVI; MARQUES, 1983; OLIVANETO; YOKOYA, 1994) e, por fim, o problema da floculação das células de levedura, provocado principalmente por bactérias do gênero *Lactobacillus* e também por leveduras (YOKOYA; OLIVANETO, 1991).

A floculação das células de levedura faz com que estas se agrupem e se precipitem no fundo das dornas, prejudicando o processo fermentativo. Isso porque, para que ocorra uma total conversão de açúcar em etanol e CO₂, é necessário que as leveduras permaneçam sempre suspensas e livres no líquido de fermentação (ROSE, 1980). Além disso, esse fenômeno causa o entupimento de tubulações e perda de células na centrífuga, implicando em problemas operacionais e econômicos, pois se aumentam os gastos com ácido, biocidas (usados no controle dos contaminantes),

antiespumantes e com a reposição celular das leveduras perdidas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982a e b; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994).

A floculação das leveduras pode ser causada pelo seu contato com gomas de origem bacteriana (SERRA *et al.*; 1979) ou com as próprias bactérias indutoras de floculação (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991), e ainda, pela contaminação com leveduras floculantes (STRATFORD, 1989). A floculação depende diretamente da parede celular da levedura, que é composta, principalmente, de uma complexa estrutura de glucanas com ligações do tipo β (1-3) e β (1-6) em sua camada interior e de mananas ou fosfomananas em sua camada externa, que correspondem, juntas, a cerca de 80-90% da parede (LYONS; HOUGH, 1970; FLEET, 1991). Estão presentes também proteínas e pequenas quantidades de quitina (FLEET, 1991; HUNTER; ANSEJO, 1988). As mananas estão associadas a proteínas e acredita-se que os grupos carboxila da porção protéica dessas glicoproteínas (que, nesse caso, são chamadas “lectinas”) exerçam o papel de ligação com as mananas ou o fosfato das fosfomananas das células adjacentes (ESSER; KÜES, 1983; CALLEJA, 1991).

Sendo assim, as proteínas associadas às mananas e aos sais minerais, tais como o Ca^{+2} (ESSER; KÜES, 1983; CALLEJA, 1991; YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991), parecem estar envolvidas no processo de floculação, uma vez que a ação de proteases é eficaz na desfloculação do fermento (MILL, 1964; NISHIHARA, 1977; STRATFORD; BRUNDISH, 1990; HENRIKSSON *et al.*, 1991; YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991; SANTOS; YOKOYA, 1993; LUDWIG *et al.*, 2000).

Não existe no momento uma solução definitiva para o problema da desfloculação nas destilarias, uma vez que o tratamento usado atualmente, à base de ácido sulfúrico, não é ideal, pois permite novamente a ocorrência do fenômeno na medida em que o pH sobe, quando o fermento, depois de acidificado (pH = 2,5), é misturado ao mosto (pH ao redor de 6,0). Dessa forma, um tratamento enzimático para o controle da floculação seria uma boa alternativa, pois esse método é menos afetado pelo pH do meio, sendo a desfloculação, nesse caso, irreversível (NISHIHARA, 1977; LUDWIG, 1998; LUDWIG *et al.*, 2000). No entanto, a aplicação de enzimas em escala industrial só será viável economicamente, se os custos forem comparáveis com os do tratamento ácido.

Dessa forma, uma alternativa seria a reutilização da enzima. Isso pode ser conseguido por meio de sua recuperação ainda no estado livre ou pela imobilização dessa enzima em suportes sólidos. A imobilização permite, além da reutilização da atividade catalítica, um melhor controle das reações e o projeto de biorreatores que podem ser facilmente incorporados numa linha de processo contínua (WHITAKER, 1990). A imobilização enzimática em suportes apropriados constitui uma área de interesse enquanto pode significar a melhoria de processos e redução de custos (COMERLATO, 1995).

Sendo assim, a quitina, retirada do exoesqueleto de crustáceos, e a celulose, sob a forma de bagaço de cana, foram escolhidas como suportes para as imobilizações, que foram realizadas utilizando-se papaína. A quitina é um material orgânico de custo relativamente baixo, obtido do exoesqueleto de crustáceos, um resíduo da indústria alimentícia (MARTINS, 1997), onde é usado em muitas aplicações, além da indústria farmacêutica (KNORR, 1984 e KRAJEWSKA, 1991). O processo de imobilização em quitina não é apenas barato, mas também muito fácil de realizar, fazendo com que seu potencial para a aplicação industrial seja considerável (VAILLANT *et al.*, 2000).

A celulose, por sua vez, também é um material orgânico de baixo custo e fácil acesso, uma vez que pode ser obtida do bagaço da cana-de-açúcar, um resíduo da própria indústria sucroalcooleira. Ademais, a celulose apresenta vantagens para a imobilização enzimática, por seu caráter hidrofílico e por possuir um grande número de grupos hidroxila em sua superfície, o que favorece a ocorrência das reações de imobilização (VARAVINIT *et al.*, 2002).

Para o controle da floculação na produção de etanol, é importante a obtenção de soluções práticas e viáveis economicamente, sobretudo tratando-se de um problema em escala industrial. Nesse caso, a aplicação e reutilização de enzimas capazes de provocar a desfloculação podem contribuir para o aperfeiçoamento na tecnologia de produção de etanol carburante no país.

Considerando o exposto, o trabalho visou estudar algumas técnicas de reciclo da papaína pela sua recuperação no estado livre via centrifugação ou pela sua imobilização nos suportes quitina e celulose, para sua utilização no processo de desfloculação de *Saccharomyces cerevisiae*.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Contaminação microbiana na indústria de álcool

A contaminação por microrganismos é um fato comprovado na maioria das usinas produtoras de álcool do país, nas quais o problema pode ser agravado em razão do processo utilizado, que fornece as condições ideais de desenvolvimento da população desses microrganismos (ALTERTHUM *et al.*, 1984).

Segundo AMORIM e OLIVEIRA (1982a), a contaminação nas indústrias sucroalcooleiras tem início na cana-de-açúcar ainda no campo e vai até a etapa de fermentação alcoólica nas dornas. Os contaminantes, dessa forma, podem ser trazidos às indústrias aderidos às raízes, colmos e folhas da cana, pois são habitantes naturais da planta, do solo e da matéria orgânica em decomposição, destacando-se fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas e esporuladas. BOVI e MARQUES (1983) também destacam que alguns microrganismos também podem adentrar a indústria pela água utilizada em alguns processos, como na lavagem da cana, no preparo do pé-de-cuba e na limpeza dos equipamentos.

RODINI (1985) e GALLO (1989) apontam o caldo de cana, que é o principal substrato na fermentação alcoólica, como um excelente meio de cultura para os microrganismos contaminantes, em função de sua constituição nutricional. Os autores também destacam as condições físicas do processo, como o pH e a temperatura, que são ideais para o desenvolvimento de tais microrganismos. A floculação das células de levedura, por exemplo, que é um fenômeno característico da contaminação, é bem pronunciada numa faixa próxima de pH entre 3,0 a 3,5, segundo YOKOYA e OLIVA-

NETO (1991). Já STRATFORD (1996), observou que a floculação se desenvolve bem em faixas de pH de 4,5 a 6,3. De qualquer forma, esses intervalos de pH são os mesmos com os quais se processa a fermentação nas indústrias, sobretudo nas dornas de fermentação.

O papel da temperatura do processo na contaminação também foi observado por AMORIM e OLIVEIRA (1982a). Eles mostraram que a contaminação do mosto pode variar dependendo da temperatura, e que as temperaturas de 30 a 40°C (faixa de temperatura comumente utilizada no processo) são as mais críticas, sendo que existe um aumento na multiplicação das bactérias, quando a temperatura sobe de 30 a 39°C. Os autores destacam também que o desenho do processo pode interferir na contaminação, uma vez que a condução do caldo ou mosto por longas canalizações podem provocar um aumento na intensidade do fenômeno.

De acordo com CASTRO (1995) e LIMA *et al.* (2001), existem diferentes fatores que contribuem para o aumento da população de microrganismos contaminantes e suas possíveis conseqüências: falta de assepsia da sala de fermentação, falta de limpeza das dornas e canalizações, dornas abertas e expostas ao ambiente, ausência de controle da acidez e nutrientes do mosto, variações nas formas de colheita e qualidade da cana, dentre outras. Tudo isso é aliado ao modo em que estas indústrias operam, onde as condições assépticas, como a utilização de mosto esterilizado, por exemplo, são difíceis de serem alcançadas, ou praticamente impossíveis (LUDIWIG *et al.*, 2000).

São vários os microrganismos contaminantes em usinas de álcool, dentre os quais podemos destacar as bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Aerobacter* (LIMA *et al.*, 1974; GALLO, 1989). No entanto, os contaminantes da fermentação alcoólica com capacidade infectante são restritos a poucos gêneros, porque este ambiente é altamente seletivo, permitindo apenas o desenvolvimento de microrganismos resistentes ao etanol e a pH baixo. As bactérias do gênero *Leuconostoc*, apesar de contaminarem a fermentação alcoólica (oriundas do caldo de cana) provocando o entupimento de tubulações, centrífugas e peneiras, devido à floculação pela produção da goma dextrana, raramente chegam a causar grandes infecções na fermentação, devido a sua baixa resistência ao etanol (LUDWIG, 2005). Segundo GALLO (1989) e YOKOYA e OLIVA-NETO (1991), existe um predomínio de contaminantes do grupo *Lactobacillus*, destacando-se o *L. fermentum* (62-65%),

isolado a partir de amostras de “leite de leveduras”, apresentando-se resistentes ao etanol.

As conseqüências da contaminação microbiana nas destilarias são debatidas por vários autores. AMORIM e OLIVEIRA (1982a e b) discutem que o fenômeno é prejudicial à produção de álcool por diversos motivos, tais como: o consumo de açúcar pelos microrganismos contaminantes (pois praticamente todo microrganismo consome açúcar); o consumo do álcool produzido (como no caso das bactérias acéticas); morte de células de leveduras por toxinas lançadas ao meio pelos microrganismos infestantes ou pelo excesso de ácido ou outro produto utilizado para combater a infecção; e perda de células nas centrífugas, causada pela floculação do fermento.

A degradação de sacarose por estes microrganismos pode resultar na formação de ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o ácido acético, que, juntamente com outros metabólitos, podem afetar a atividade fermentativa da levedura no processo (CASTRO, 1995; LIMA *et al.*, 2001). Isso também foi observado por OLIVEIRA-FREUGLIA e HORII (1998), que afirmaram que os produtos metabólicos do *Lactobacillus fermentum* podem causar prejuízos às leveduras do processo, devido à toxidez dos seus produtos para as mesmas. O mesmo fora atestado também por BOVI e MARQUES (1983), ESSIA-NGANG *et al.* (1989) e OLIVA-NETO e YOKOYA (1994).

YOKOYA e OLIVA-NETO (1991) apontam ainda o problema da floculação das leveduras, causada principalmente por bactérias do gênero *Lactobacillus* e também por leveduras selvagens, como sendo uma das conseqüências das contaminações e um dos mais sérios problemas na fermentação industrial do álcool.

4.2. Floculação

O fenômeno da floculação, que pode ser observado na figura 1, surge quando células individuais numa suspensão são unidas, formando flocos ou agregados que sofrem sedimentação ou flotação. As células agregadas de uma única linhagem determinam a autofloculação quando ocorre com as leveduras que já têm um crescimento floculado, enquanto que agregações entre diferentes linhagens ou entre diferentes espécies provocam a co-floculação, podendo ser entre leveduras de cepas diferentes ou até mesmo entre leveduras e bactérias (STEWART *et al.*, 1975; ESSER; KÜES, 1983). Segundo STEWART *et al.* (1976), a floculação do fermento pode ser

definida como “fenômeno no qual as células do fermento se aderem em flocos e sedimentam rapidamente no meio em que estão suspensas”.

O processo de floculação das leveduras pode ser observado em indústrias de bebidas como um fenômeno benéfico, que pode facilitar a separação do fermento da suspensão de bebida fermentada (JIN; SPEERS, 1998), enquanto que na indústria do álcool este processo é considerado desfavorável, pois ocasiona problemas durante o processo de fermentação e de separação do fermento nas centrífugas (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991).

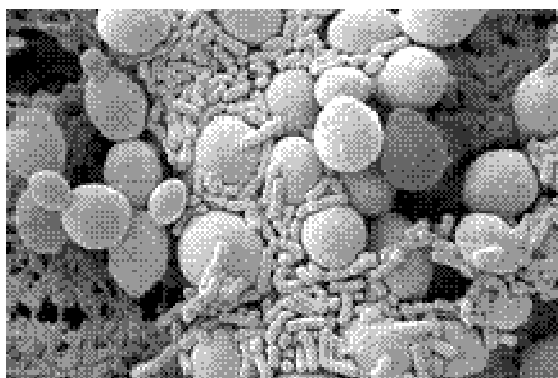


Figura 1: Fotomicrografia ilustrando a floculação de leveduras por bactérias.
Fonte: Fermentec (Piracicaba/SP).

A floculação do fermento usado nas indústrias produtoras de etanol leva ao assentamento das leveduras no fundo das dornas. Isso dificulta a conversão do açúcar a etanol e leva a uma conseqüente queda no rendimento alcoólico, pois, como já apontado por ROSE (1980), é essencial que as leveduras permaneçam suspensas no líquido de fermentação e não floculadas, para que haja uma máxima conversão de açúcar em etanol e CO₂.

Além do mais, a floculação do fermento nas usinas produtoras de etanol causa vários prejuízos ao processo fermentativo, dentre os quais podem ser destacados: dificuldades operacionais devido a obstruções (entupimentos) de tubulações e centrífugas; dificuldades no combate do contaminante do processo, já que ele é retornado ao sistema junto com o fermento, levando ao aumento do gasto com ácido sulfúrico e desinfetantes; gastos excessivos com antiespumantes; morte de células de

leveduras por toxinas lançadas no meio pelo microrganismo infectante ou pelo excesso de ácido ou outros biocidas; perdas no rendimento alcoólico devido ao consumo de açúcar pelo contaminante e reposição celular das células perdidas na fermentação (pela baixa viabilidade) ou na centrifugação, pois o floco (agregado de células), sendo mais pesado, é separado junto com o vinho (AMORIM; OLIVEIRA, 1982a e b; ALTHERTUM *et al.*, 1984; CRUZ *et al.*, 1985; JOLLY; PRAKASH, 1987; OLIVANETO, 1990; YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; OLIVEIRA-FREGUGLIA; HORII, 1998).

GUERRA (1995), estudando diferentes linhagens de bactérias indutoras da floculação, individualmente ou em associações, observou que quando estas estavam associadas a leveduras, em 15 horas de fermentação, provocavam uma diminuição da viabilidade em 13%, do brotamento em 59,4%, da viabilidade dos brotos em 37,7% e do fermento final em 55,7% em relação ao controle, que era constituído por levedura em cultura pura. OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORII (1998) observaram que a viabilidade das leveduras floculadas é fortemente reduzida, atingindo valores próximos a 0 com 12 horas após o término da fermentação alcoólica.

4.2.1. Causas da floculação

A origem da floculação das células de leveduras pode ser devida a várias causas que podem ou não estar relacionadas (LUDWIG, 2005). Especificamente para a produção do álcool carburante, destacam-se as seguintes:

1. Segundo STRATFORD (1989) e YOKOYA (1989), a presença de leveduras selvagens floculantes pode ser responsável pela floculação nas destilarias.

2. De acordo com SERRA *et al.* (1979), AMORIM e OLIVEIRA (1982a) e JOLLY e PRAKASH (1987), a produção de polissacarídeos bacterianos, como a dextrana, pode causar o bloqueio das centrífugas nas destilarias devido à floculação do fermento, pois parte dessa goma não é eliminada no processo de clarificação.

3. Para YOKOYA e OLIVA-NETO (1991), bactérias podem ser adsorvidas à parede das leveduras e causar a floculação do fermento. SERRA *et al.* (1979) observaram que bactérias esporuladas (*Bacillus*) eram capazes de flocular o fermento e não eram resistentes ao tratamento ácido. Por outro lado, *Sporolactobacillus inulinus*, além de flocular o fermento, era resistente a pHs 1,9 a 2,0. Segundo os autores, a

presença de cápsula protéica gelatinosa acarretou a fixação das bactérias às células de leveduras.

Segundo BELLAL *et al.* (1995), a floculação de leveduras, quer seja por bactérias ou por outras leveduras é um fenômeno considerado complexo que envolve as paredes celulares das leveduras e bactérias. Na verdade, este processo envolve bases bioquímicas de formação da parede e ligações moleculares para o processo se desenvolver (STEWART *et al.*, 1975).

A floculação causada por outras leveduras depende diretamente das propriedades da parede celular, que mesmo isolada apresenta um comportamento semelhante às células intactas, determinado por genes do locus FLO (MIKI, *et al.*, 1982) e fatores como tratamento com manose e presença ou ausência de cálcio. Apesar disso, sabe-se que a floculação ocorre por intermédio de interações envolvendo a parede celular de células vizinhas (EDDY; PHIL, 1955; STEWART *et al.*, 1975).

De acordo com HUNTER e ANSEJO (1988), a parede celular das leveduras é descrita como uma estrutura bastante complexa e formada por diferentes biopolímeros, incluindo glucanas, mananas, proteínas e até uma pequena porção de quitina. Os polímeros de glucanas com ligações do tipo β (1-3) e β (1-6) representam 55 a 60% da parede, enquanto que as mananas e proteínas (estas últimas conjugadas, formando as chamadas glicoproteínas ou lectinas) representam aproximadamente 40% (HOUGH; MADDOX, 1970; LYONS; HOUGH, 1970).

O mecanismo de agregação entre as células pode ser explicado de diversas formas, sendo que, muitas vezes, os autores se contradizem em busca da melhor explicação para esse fenômeno, apresentando hipóteses diversas (LUDWIG, 2005). Na verdade, para explicar o processo de agregação entre as leveduras, existem duas hipóteses básicas que devem ser levadas em consideração.

Na primeira hipótese, proposta por MASSCHELEN *et al.* (1963), MILL (1964), LYONS e HOUGH (1971) e STEWART *et al.* (1975), assume-se que as células de levedura se ligem por meio de pontes de hidrogênio e ligações iônicas formadas entre os grupos carboxílicos das proteínas da parede celular de um grupo de leveduras e os fosfatos das fosfomananas das células adjacentes. O cálcio atuaria induzindo a ligação e provocando a adesão celular.

A segunda hipótese, mais recente, sugerida por FIRON *et al.* (1983), ESSER e KÜES (1983) e SHARON e LIS (1989), propõe um modelo que recebeu o nome de “Modelo das Lectinas”. Essa teoria assume que as lectinas (glicoproteínas) da superfície celular podem mediar a interação célula-célula por combinarem-se com carboidratos complementares das células adjacentes. Assim, existem glicoproteínas (denominadas, nesse caso, de “lectinas”) responsáveis pela agregação das células. Aqui os íons cálcio (Ca^{+2}) atuam como co-fatores, ativando a capacidade de ligação de certos componentes das lectinas com os grupos OH dos carboidratos, mantendo a configuração correta das proteínas destas lectinas. Deste modo, a teoria “lectin-like” sugere que as proteínas (lectinas) presentes na parede de células floculantes se unem aos carboidratos presentes sob a forma de manana da parede celular de outras células.

De qualquer forma, o envolvimento de proteínas da superfície celular é certo em qualquer uma das duas hipóteses, uma vez que vários autores, como CALLEJA (1974), STRATFORD e BRUNDISH (1990) e BOWEN *et al.* (1992), atestaram que o tratamento das células com proteases leva à perda irreversível da capacidade de floculação. A figura 2 ilustra a clivagem de uma mananaproteína (glicoproteína) por uma protease lítica.

No caso da participação das bactérias para a formação de flocos, os fatores que mais se destacam são as gomas excretadas por bactérias que provocam uma adesão entre as células de levedura (SERRA *et al.*, 1979) e a interação direta de parede-parede entre bactéria e levedura, que também levaria à formação de flocos, o que foi comprovado por YOKOYA e OLIVA-NETO (1991), que observaram a capacidade de floculação do fermento por certas linhagens de *Lactobacillus fermentum*.

Os contaminantes produtores de goma provocam diversos problemas no processo de produção do etanol, pois elevam a viscosidade do caldo, provocando entupimento de tubulações, centrífugas e peneiras (TILBURY, 1975). De acordo com GALLO (1989), os principais microrganismos produtores de goma isolados são dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* produtores de levana, *Leuconostoc mesenteroides* que produz dextranas e *Lactobacillus confusus*, produtor de grande quantidade de goma a partir de sacarose.

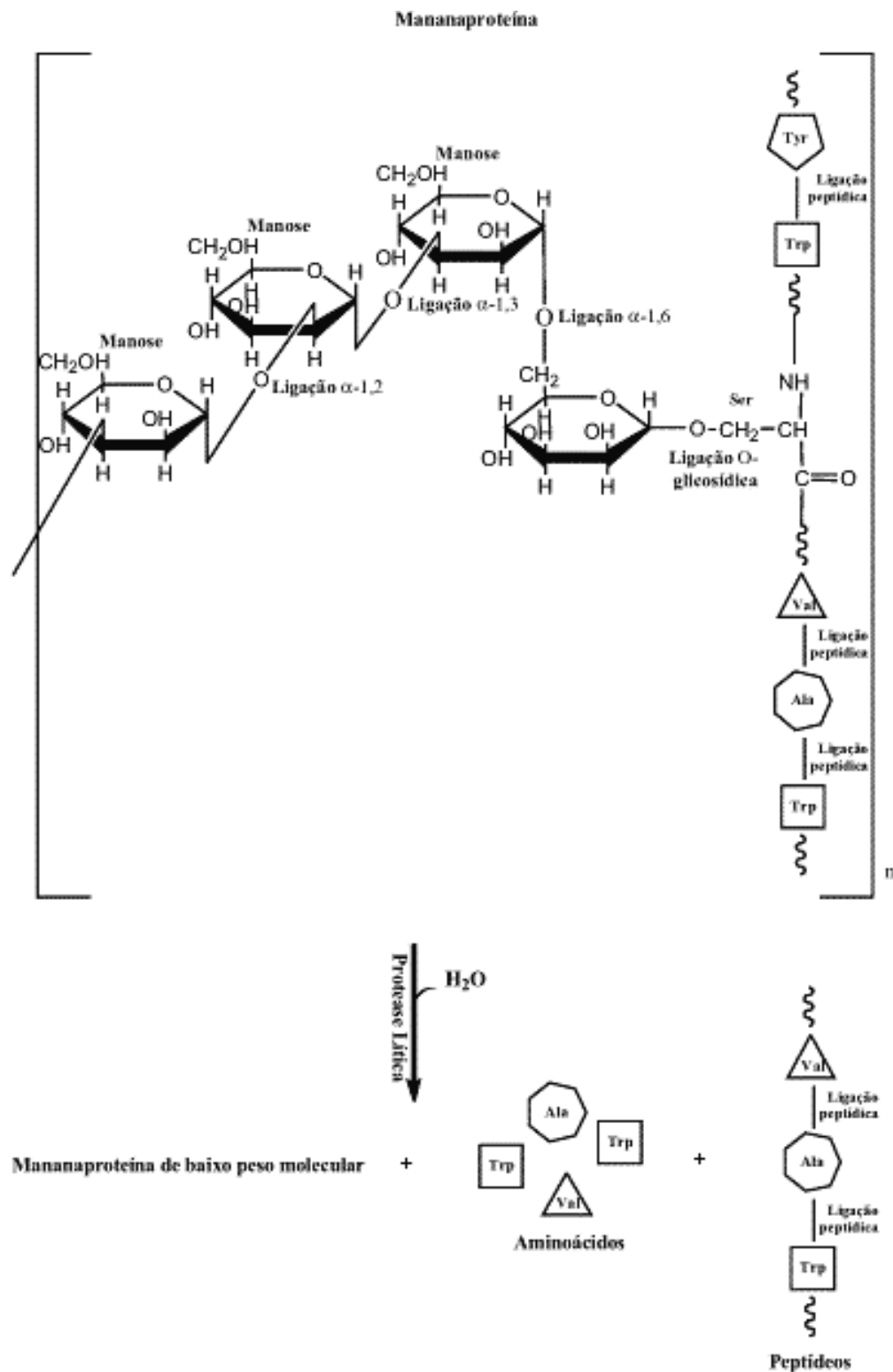


Figura 2: Esquema de hidrólise de uma mananaproteína por protease (FLEURY; SATO, 2005).

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de explicar o processo de formação de flocos por meio da produção de gomas (polímeros). UNZ e FARRAH (1976), por exemplo, acompanharam o processo de floculação de *Zooglae* MP6 por meio da produção de exopolímeros de mucopolissacarídeos, que agem formando agregados ou flocos. São poucos, no entanto, os trabalhos que estudam a fundo o fenômeno de floculação de células de levedura por gomas de origem bacteriana.

Na floculação causada pelo contato direto das leveduras com as bactérias, a parede celular bacteriana também é uma estrutura fundamental que, além de conferir forma à célula, participa efetivamente do processo de floculação, apesar de o mecanismo de floculação ser diferente daquele mediado por leveduras (LUDWIG, 2005). Os estudos sobre formação de flocos entre tipos celulares diferentes, como a floculação em usinas, que pode ocorrer entre a levedura do processo e contaminantes como bactérias do gênero *Lactobacillus*, já provocaram muito questionamento. Porém, já é certo que as estruturas químicas componentes das paredes celulares estão envolvidas neste mecanismo de adesão (NGONDI-EKOME *et al.*, 2003). ZARRATINI *et al.* (1993) verificaram os possíveis mecanismos envolvidos na floculação por bactérias. Eles mostraram que os componentes celulares estão envolvidos na formação de flocos e existe a necessidade da participação das mananas (leveduras) e proteínas (bactérias). O tratamento de suspensões de leveduras floculadas com proteases e carboidrases, por exemplo, indica que provavelmente as enzimas proteolíticas tenham mais ação em nível de parede bacteriana (LUDWIG, 1998; LUDWIG *et al.*, 2000).

Diferentes estudos foram desenvolvidos com o objetivo de explicar o mecanismo de floculação que ocorre entre as células de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica e as leveduras. Os resultados mostram que este fenômeno está associado ao contato físico entre a parede celular dos dois microrganismos, existindo uma relação ótima entre a quantidade de células de bactéria e levedura para causar a floculação, que segundo YOKOYA e OLIVA-NETO (1991), é de 4,8 bactérias por célula de levedura, o que explica a aparição repentina de floculação em indústrias de produção de etanol, quando ocorre um aumento da contaminação bacteriana, sobretudo por *L. fermentum*.

Os resultados do trabalho de BROMBERG e YOKOYA (1995) revelaram que resíduos de aminoácidos da superfície de *L. fermentum* e resíduos de carboidratos das

leveduras são responsáveis pelo desenvolvimento do fenômeno da floculação. As reações com vários reagentes de modificação protéica indicaram que o grupo indoil do triptofano e o grupo hidroxil fenólico da tirosina devem estar presentes na superfície celular bacteriana para a floculação ocorrer. Os resíduos de carboidratos na superfície celular de leveduras, que são responsáveis pela ligação, são provavelmente do grupo das mananas, que, por experimentos de inibição por açúcares, foram demonstradas na parede celular por SANTOS e YOKOYA (1993). A participação das mananas das células de leveduras também pode ser evidenciada nas células de *Kluyveromyces bulgaricus*, nas quais o grupo químico mais precisamente envolvido é o das fosfopeptidomananas, que estão presentes na parede celular de leveduras floculantes (MAAZOUZI *et al.*, 2004).

A necessidade de íons cálcio para o desenvolvimento de agregação entre leveduras e bactérias floculantes foi também evidenciada por YOKOYA e OLIVANETO (1991) e SANTOS e YOKOYA (1993). O cálcio pode atuar como ponte de ligação entre os grupos negativos das fosfomananas e os receptores protéicos das células bacterianas (KIHN, 1988), muitas vezes também carregados negativamente (ESSER; KÜES, 1983). O envolvimento do cálcio é claro, fato demonstrado pela lavagem com EDTA (um composto químico quelante), que retira o cálcio naturalmente presente nas células e provoca a desagregação das células (MAAZOUZI *et al.*, 2004).

4.2.2. Controle da floculação

O controle dos contaminantes na fermentação é a melhor maneira de evitar a floculação do fermento, uma vez que este fenômeno está associado ao tipo e ao grau de contaminação. Entretanto, este controle não é conduzido nas destilarias, o que torna comum o elevado nível de contaminações microbianas. Isto está diretamente associado à dificuldade que as indústrias encontram para trabalhar em condições assépticas, como a utilização de mosto esterilizado, por exemplo, além da dificuldade de adotar uma técnica de controle da floculação que seja rápida e eficiente (LUDWIG *et al.*, 2001).

De acordo com AMORIM e OLIVEIRA (1982a e b), para se combater as infecções microbianas na fermentação alcoólica, faz-se necessário o uso de produtos químicos na moenda e na fermentação (compostos quaternários de amônio, organossulfurados e formol), sendo que, durante a fermentação, também podem ser

aplicados antibióticos como o clorafenicol, a tetraciclina, a virginamicina e a penicilina, sendo estes dois últimos os mais utilizados. Segundo NISHIHARA *et al.* (1976a e b), a floculação pode ser completamente inibida por ciclohexamida, mas não por clorafenicol.

Os antibióticos e biocidas penicilina V potássica, virginamicina, nisina, sanicol, nasaquat, busan 881, busan 1001, busan 1212 e busan 1202 foram testados em diferentes bactérias indutoras de floculação e, quando aplicados isoladamente, mostraram-se ineficientes no controle dessas bactérias, sendo necessário, de acordo com GUERRA (1995), o teste de concentração mínima inibitória para cada tipo de bactéria e melhor economia na indústria.

Vários trabalhos demonstram a ineficácia de muitos dos produtos usados no controle dos contaminantes, principalmente os antibióticos, como a penicilina, cujo uso contínuo leva a uma seleção dos contaminantes mais resistentes, além do fato de tratar-se de produtos muito específicos, o que limita sua ação na fermentação alcoólica mista (LUDWIG, 2005). CRUZ *et al.* (1985) demonstrou que a adição de penicilina (500 U/L) no mosto não foi suficiente para o controle de uma das linhagens de bactérias Gram positivas testadas devido a alterações no equilíbrio natural da microflora contaminante.

O tratamento convencional com ácido sulfúrico sob agitação (BOVI; MARQUES, 1983) ainda é muito utilizado atualmente e, apesar de eficaz na desfloculação, desfaz temporariamente os flocos. A técnica não constitui, portanto, um tratamento duradouro para combater a floculação do fermento causada por contaminantes da fermentação, permitindo a volta do fenômeno em função da alteração de pH, quando o inóculo tratado retorna às dornas de fermentação (LUDWIG, 2005). A faixa de pH utilizada no tratamento do fermento (2,0 a 2,5) pode afetá-lo, tendo como consequência uma diminuição da viabilidade celular. O tempo de permanência do fermento durante o tratamento é 0,5 a 2 horas e, quanto maior for esse tempo e menor o pH, maior será o impacto prejudicial ao metabolismo da levedura (OLIVEIRA-FREGUGLIA; HORII, 1998; LUDWIG *et al.*, 2000; DORTA *et al.*, 2006).

Um tratamento alternativo, com o uso de enzimas, foi proposto por LUDWIG (1998). Foram testadas uma enzima proteolítica e uma carboidrase, que se mostraram eficazes na desfloculação do fermento, não alteraram a viabilidade das células e tiveram

um efeito irreversível sobre a desfloculação do fermento. A mesma autora (2005) elaborou vários extratos enzimáticos de origem fúngica (produzidos pelo fungo filamentososo do gênero *Trichoderma*), na tentativa de diminuir os custos com o tratamento enzimático.

A ação de enzimas proteolíticas que destituem as paredes celulares de sua capacidade de formação de flocos também foi mostrada em diversos trabalhos, como os desenvolvidos por EDDY *et al.* (1957), NISHIHARA *et al.* (1977 e 1982), STRATFORD e BRUNDISH (1990) e YOKOYA e OLIVA-NETO (1991). O efeito das enzimas proteolíticas sobre a floculação também foi evidenciada por KAMATA e MURATA (1984). Estes autores verificaram que a aglutinação das células foi diminuída com o tratamento com enzimas proteolíticas (pepsina e pronase), enquanto que as demais enzimas testadas (mananase, lisozima, zimoliase, fosfatase ácida, lípase e ribonuclease) não tiveram o mesmo efeito.

4.3. Papaína

A enzima papaína (EC 3.4.22.2) é uma proteína alcalóide extraída do látex do mamão (*Carica papaya*), a qual é caracterizada como uma cisteína endopeptidase que apresenta forte ação proteolítica (AZARKAN *et al.*, 2003; MEZHLUMYAN *et al.*, 2003), assim como a quimopapaína (EC 3.4.22.6), as quais pertencem à família das papaínas (C1) (RAWLINGS; BARRET, 1994). Inclui-se nesse grupo, também, a ficina (EC 3.4.22.3), a bromelina (EC 3.4.22.4) e a enzima microbiana *Streptococcus* protease (*Streptococcus* cisteína protease, EC 3.4.22.10). A similaridade dessas enzimas deve-se ao fato de todas serem inibidas por reagentes sulfídricos e terem a mesma seqüência de aminoácidos ao redor dos resíduos de cisteína e histidina do sítio ativo (TARDIOLI, 2003).

De acordo com WHITAKER (1994), a papaína, a ficina (obtida do figo) e a bromelina (do abacaxi) também têm em comum o fato de terem ampla faixa de pH ótimo (pH 6 a 7,5) e serem muito estáveis a temperaturas de 60 a 80°C e pH neutro. A papaína e a ficina hidrolisam com igual eficiência substratos contendo resíduos de lisina, arginina, glicina e citrulina.

As enzimas proteolíticas em geral já são amplamente aplicadas em diversas áreas, como nas indústrias farmacêuticas, no amaciamento de carnes, na clarificação de

cerveja, na preparação de alimentos infantis e dietéticos, além de serem utilizadas nas indústrias têxteis, no tratamento de distúrbios digestivos (PAQUES & MACEDO, 2006), assim como na medicina e em pesquisas científicas (HAYASHI *et al.*, 1993; OTUKA *et al.*, 1996; FUSCO *et al.*, 2002; NITSAWANG *et al.*, 2006; SANGEETHA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007). NITSAWANG *et al.* (2006) destaca que a papaína, em particular, é amplamente utilizada como amaciadora de carnes, além de muitas outras aplicações como, por exemplo, na defibrinação de ferimentos, no tratamento de edemas e no tratamento de tecidos da indústria têxtil em geral.

Além dessas aplicações, a papaína já foi utilizada por alguns autores na desfloculação de *S. cerevisiae*. ESSER e KÜES (1983) e LUDWIG (1998) conseguiram reduzir a agregação das células de levedura tratando-as com papaína, outras proteases como a tripsina e carboidrases. OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORII (1998) também observaram o papel das enzimas do grupo das peptidohidrolases, como a papaína, na desfloculação celular. Os autores utilizaram papaína, além de bromelina e ficina, e mostraram que tais enzimas têm uma boa ação sobre o componente causal da floculação de *S. cerevisiae* por *L. fermentum*.

4.4. Imobilização de enzimas

Segundo KENNEDY (1987), enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetida e continuamente. O termo enzimas imobilizadas inclui enzimas modificadas para torná-las insolúveis em água; enzimas solúveis usadas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração não-permeáveis, as quais retêm as moléculas de enzima no reator; e enzimas cujas moléculas foram ligadas à outra macromolécula, sendo o derivado resultante solúvel em água. Quanto à obtenção de enzimas insolúveis, os métodos de imobilização são classificados em: ligação cruzada intermolecular (enzima-enzima); ligação a um suporte sólido insolúvel, por adsorção; ligação iônica, covalente ou metálica; e enredamento em fibras, géis poliméricos ou microcápsulas.

O autor ainda destaca que, dentre os diversos métodos existentes, a ligação da enzima por ligação covalente a um suporte sólido é o método mais empregado na preparação de enzimas insolúveis, pois, quando a imobilização é bem sucedida, obtém-

se uma enzima imobilizada com alta estabilidade devido à forte ligação resultante. Neste caso, é difícil haver eluição da enzima aderida ao suporte, mesmo na presença de alta força iônica. De fato, GERHARTZ (1990) aponta que a imobilização de enzimas por ligação covalente apresenta as seguintes vantagens: (1) as enzimas não se desprendem do suporte durante sua utilização devido à firme ligação; (2) a enzima imobilizada pode entrar em contato facilmente com o substrato porque ela é localizada na superfície do suporte; e (3) um aumento na estabilidade à temperatura é sempre observado em função da forte interação entre a enzima e o material do suporte.

Os primeiros relatos de imobilização química de proteínas e enzimas, especificamente, surgiram na década de 1960. Desde então, enzimas imobilizadas têm sido largamente utilizadas no processamento de uma variedade de produtos, bem como na quantificação específica de moléculas (MARTINS *et al.*, 2006). Diversos autores destacam as vantagens da utilização de enzimas imobilizadas em relação à utilização de enzimas livres. Dentre elas estão: a redução dos custos com a enzima pela reutilização de sua atividade catalítica; a facilidade de aplicação da reação enzimática em processos contínuos; um maior controle da velocidade das reações; a facilidade de manipulação e de remoção da enzima do meio de reação; uma maior estabilidade estrutural da molécula de enzima e, conseqüentemente, uma maior resistência dessa molécula às variações temperatura e pH; a possibilidade de elaboração de diversos modelos de reatores; e o aumento da atividade enzimática em alguns casos (ZABORSKA, 1995; TISCHER; KASCHE, 1999; VARAVINIT *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2003; BARROS, *et al.*, 2003; KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA; VIEIRA, 2006; LI *et al.*, 2007; HARISH-PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

TARDIOLI (2003) também destaca que a imobilização em suportes sólidos insolúveis é uma das estratégias de estabilização (térmica e ao pH) de enzimas mais investigada, pois outras vantagens advêm atreladas a ela. Por exemplo, o uso contínuo e repetido da atividade catalítica, facilidade de separação do produto final, redução do volume de reação (alta concentração de enzima em menor volume de reator) e facilidade de controle do processo. Todas essas vantagens tornam a tecnologia de imobilização atrativa para fins industriais.

Vários métodos têm sido adotados para imobilizar a papaína em diversos suportes (BHARDWAJ *et al.*, 1996; HUCKEL *et al.*, 1996; KHAN; IQBAL, 2000;

GANAPATHY *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2001; LEI *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007). A ligação covalente dessa enzima também tem sido mostrada em diversos estudos conduzidos por alguns autores (ZHUANG; BUTTERFIELD, 1992; HUCKEL *et al.*, 1996). Além da papaína, diversas outras proteases, como alcalases, carboxipeptidases, tripsina, quimiotripsina e cardosina, têm sido imobilizadas em diversos suportes, como sílica, agarose, quitina, quitosana, dentre outros (FERREIRA *et al.*, 2003; PEDROCHE *et al.*, 2002; TARDIOLI, 2003; BARROS *et al.*, 2003; KRAJEWSKA, 2004).

Existe uma imensa gama de suportes sólidos insolúveis, orgânicos (por exemplo, agarose e poliacrilamida) e inorgânicos (por exemplo, alumina, sílica e vidro de porosidade controlada). Os preferidos são aqueles altamente porosos, regeneráveis, resistentes à agitação mecânica, ao ataque microbiológico e à compactação. Suportes sólidos porosos têm grande área superficial disponível à imobilização. Entretanto, há de se atentar para que o diâmetro dos poros seja suficientemente grande para facilitar a transferência de massa intrapartícula (KENNEDY, 1987).

De acordo com TARDIOLI (2003), embora haja referências que os suportes inorgânicos tenham muitas vantagens sobre os suportes orgânicos para o processamento industrial (alta resistência mecânica, estabilidade térmica, fácil regenerabilidade e resistência ao ataque microbiano e de solventes orgânicos), muitas das enzimas imobilizadas comercialmente disponíveis são obtidas com suportes orgânicos, devido a sua alta reatividade. Isto se deve à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem contactar com esse tipo de suporte. Além disso, a superfície dos suportes inorgânicos exhibe, em solução, grupos hidroxílicos que somente podem interagir com grupos amino ou carboxílicos das enzimas por meio de adsorção física ou ligação iônica. Para ligar os suportes inorgânicos covalentemente às enzimas, há a necessidade de que estes suportes sejam ativados e somente por poucas técnicas.

Segundo KENNEDY (1987), os suportes orgânicos são classificados como polímeros naturais (polissacarídeos e proteínas) ou polímeros sintéticos (poliacrilamidas, poliestireno, poliamidas, dentre outros), tendo características hidrofílicas ou hidrofóbicas. Os polissacarídeos (celulose, agarose, quitina, quitosana, dentre outros) são os polímeros mais utilizados como suportes. Os grupos hidroxílicos desses polímeros naturais podem ser ativados pela introdução de grupos eletrofílicos, que reagem posteriormente com a enzima. A maior vantagem dos derivados de

polissacarídeos para a imobilização é a presença de grupos hidroxílicos residuais, os quais protegem a enzima ligada.

Este autor ainda destaca que, na ligação covalente, dependendo dos grupos ativos (ligantes) disponíveis no suporte, este se liga quimicamente a grupos funcionais da enzima, tais como: aminos terminais ou de resíduos de lisinas; carboxílicos de ácidos aspárticos e glutâmicos; fenólicos de tirosinas; tiol de cisteínas; hidroxil de serinas, tirosinas e treoninas; imidazol de histidinas; e indol de triptofanos. Poucos suportes, no entanto, possuem grupos reativos para permitir o acoplamento direto enzima-suporte, necessitando, na maioria das vezes, de ativação. A ativação do grupo ligante é freqüentemente realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima (TARDIOLI, 2003).

4.4.1. Quitina

A quitina é um poliaminossacarídeo natural (PETER, 1995), sendo o material orgânico renovável mais abundante na natureza, depois da celulose (MONTEIRO-JUNIOR, 1999). A quitina é biossintetizada e biodegradada na biosfera terrestre, com uma estimativa anual de 100 bilhões de toneladas por ano, sem haver um excesso de acúmulo (HIRANO, 1996; KRAJEWSKA, 2004). Esse polissacarídeo é bem distribuído na natureza, sendo o maior componente estrutural do exoesqueleto dos invertebrados marinhos (cuja quantidade relativa varia de 30 a 60% nos crustáceos) e da cutícula dos insetos, como também é encontrada na parede celular de alguns fungos e leveduras (AUSTIN *et al.*, 1981).

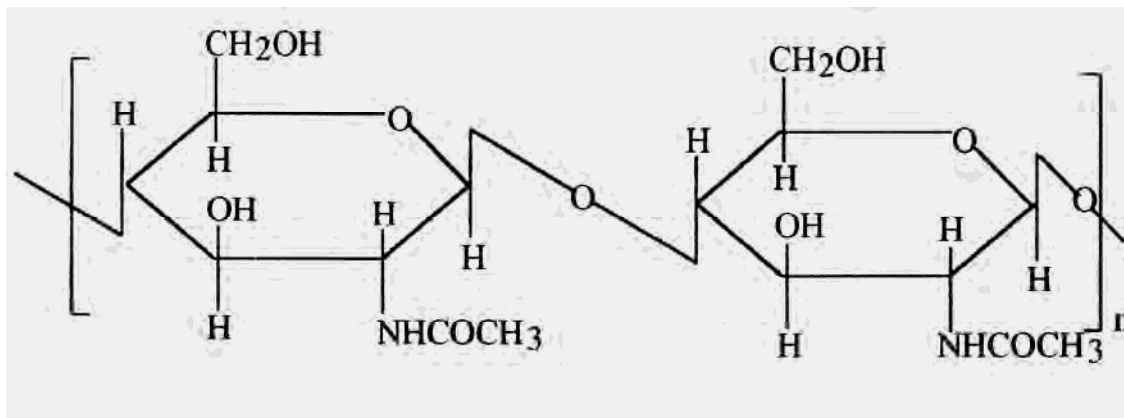
Embora esteja bastante difundida na natureza, a fonte economicamente mais viável para a obtenção de quitina, no momento, tem sido os refugos industriais do processamento de crustáceos, destacando-se, entre eles, já em larga escala, os caranguejos, camarões e lagostas (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; ABAZINGE *et al.*, 1993). O Brasil produz grande quantidade de resíduos de crustáceos que são quase completamente desperdiçados. Alguns autores, como OGAWA *et al.* (1973) e TENUTA-FILHO e ZUCAS (1985 e 1987), apontam que existe boa quantidade de quitina no cefalotórax do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *P. paulensis*), no caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) e na lagosta (*Panulirus argus*), sendo encontrado em

torno de 14% desse polissacarídeo em base úmida, demonstrando, portanto, grande potencialidade do Brasil em produzir quitina em larga escala.

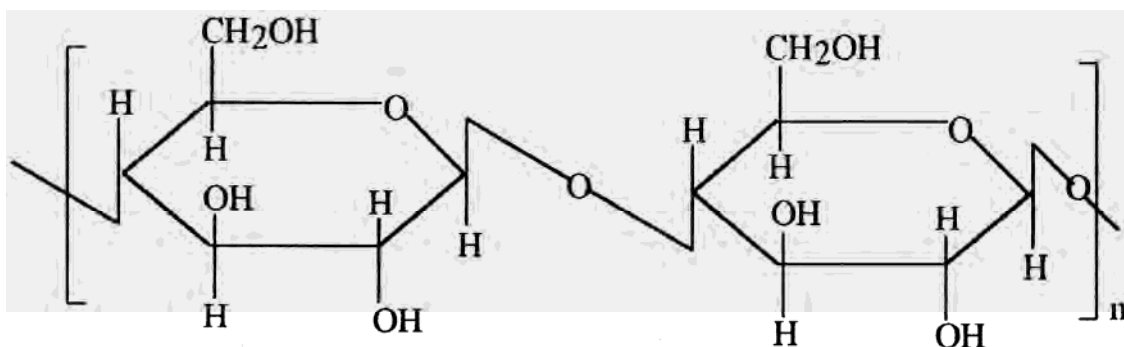
De acordo com MONTEIRO-JUNIOR (1999), quimicamente, a quitina é um polímero de cadeia linear, formado por unidades de N-acetil-2-amino-2-dioxi-D-glicopiranosose interligadas por ligações glicosídicas β (1-4) glucosamina, formando um polissacarídeo cristalino, representado pela fórmula geral $[C_8H_{13}O_5N]_n$. Normalmente é denominado poli[β (1-4)-N-acetil-D-glicosamina] ou N-acetilglicosamina. Sua massa molecular é estimada de 1 a 2×10^6 daltons. A estrutura química da quitina é muito semelhante à da celulose. A principal diferença entre elas se encontra no tipo de grupamento situado na posição axial do carbono 2 do anel de piranosose. No carbono 2 da celulose se encontra uma hidroxila, enquanto na quitina tem-se um grupamento mais volumoso, que é uma acetamida ($-NHCOCH_3$). Esta diferença pode ser mais bem visualizada na figura 3.

Ainda segundo o autor, a quitina é biodegradável, não tóxica, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. A quitina é um dos poucos polieletrólitos catiônicos presentes na natureza, diferentemente dos outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados.

Existem vários trabalhos que tratam da imobilização de diversas enzimas em quitina. Dentre elas estão a fosfatase ácida (KURITA *et al.*, 1997), protease alcalina (ABDEL-NABY *et al.*, 1998), α -amilase (REISS *et al.*, 1998; ABDEL-NABY *et al.*, 1999b), celulase (VAILLANT *et al.*, 2000), quitosanase (ZENG; ZHENG, 2002), α -quimiotripsina (GE; ZHANG, 1996), dextranase (ABDEL-NABY *et al.*, 1999a), α -galactosidase (ÖNAL; TELEFONCU, 2003), β -galactosidase (ILLANES *et al.*, 1998), glicioamilase (REISS *et al.*, 1998), glicose oxidase (OHASHI; KORIYAMA, 1992; SUGAWARA *et al.*, 2000), isoamilase (LIU *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1997), lisozima (RUCKENSTEIN; ZENG, 1997; BAYRAMOĞLU; ARICA, 2002), papaína (LIN *et al.*, 2002), pectina-liase (VAILLANT *et al.*, 2000), α -L-rhamnopiranosidase (SPAGNA *et al.*, 2001), tripsina (GE *et al.*, 1996), tirosinase (BATRA; GUPTA, 1994; CARVALHO *et al.*, 2000), endo e exopeptidase (SHI-JUN *et al.*, 1996), inulinase (GASPARI *et al.*, 1999), α -L-arabinofuranosidase (SPAGNA *et al.*, 1998) e trealase (MARTINS *et al.*, 2006).



(A) Quitina



(B) Celulose

Figura 3: Estrutura molecular da quitina (A) e da celulose (B) (KUMAR, 2000).

4.4.2. Celulose

A celulose, uma substância fibrosa, resistente e insolúvel em água, é o material orgânico mais abundante na natureza (MONTEIRO-JUNIOR, 1999). De acordo com NELSON e COX (2002), é encontrada na parede celular dos vegetais, particularmente em troncos, galhos e em todas as partes lenhosas e constitui a maior parte da madeira. A molécula de celulose é um homopolissacarídeo linear e não-ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4), como pode ser observado na figura 3 (B).

PRZYBYT e SUGIER (1988) apontam que materiais celulósicos têm sido largamente utilizados como suportes para enzimas imobilizadas por apresentarem algumas vantagens como acessibilidade, baixo custo, caráter hidrofílico e um grande número de grupos hidroxila em sua superfície, capazes de realizar reações químicas. No entanto, apresenta algumas desvantagens enquanto suporte, como a baixa resistência mecânica e a facilidade de biodegradação.

De acordo com esses autores, as enzimas podem ser imobilizadas em celulose de diversas maneiras. Dentre elas, se inclui a adsorção em celulose de troca iônica, a ligação pela formação de anéis quelados na superfície da celulose ativada por sais de metais de transição e a ligação covalente. Pela ligação covalente, podem ser mencionados: a ligação com a celulose ativada por brometo de cianogênio (PORATH, 1967); a ligação por meio de glutaraldeído com aminometil celulose (LILLY, 1970); a ligação com o uso de triazina (KAY; CROOK, 1967); e a ligação com a carboximetil celulose pelo tratamento com azida (CROOK *et al.*, 1970).

A papaína, em específico, já foi imobilizada em celulose por alguns autores, como LI *et al.* (2007), que imobilizaram essa enzima em algodão. VARAVINIT *et al.* (2002) imobilizaram uma α -amilase termoestável em celulose de bagaço de cana, utilizando o método da ativação da celulose com ácido periódico, que promove a formação de grupos aldeído reativos na molécula (figura 4).

Segundo DEBABRATA *et al.* (1993), o bagaço da cana-de-açúcar, que é um resíduo da indústria sucroalcooleira, é composto de 50% de celulose, 24% de hemicelulose e 24% de lignina. Esse material, além de ser uma grande fonte de celulose, possui inúmeras outras aplicações, incluindo geração de energia elétrica, produção de papel, rações, aglomerados e chapas.

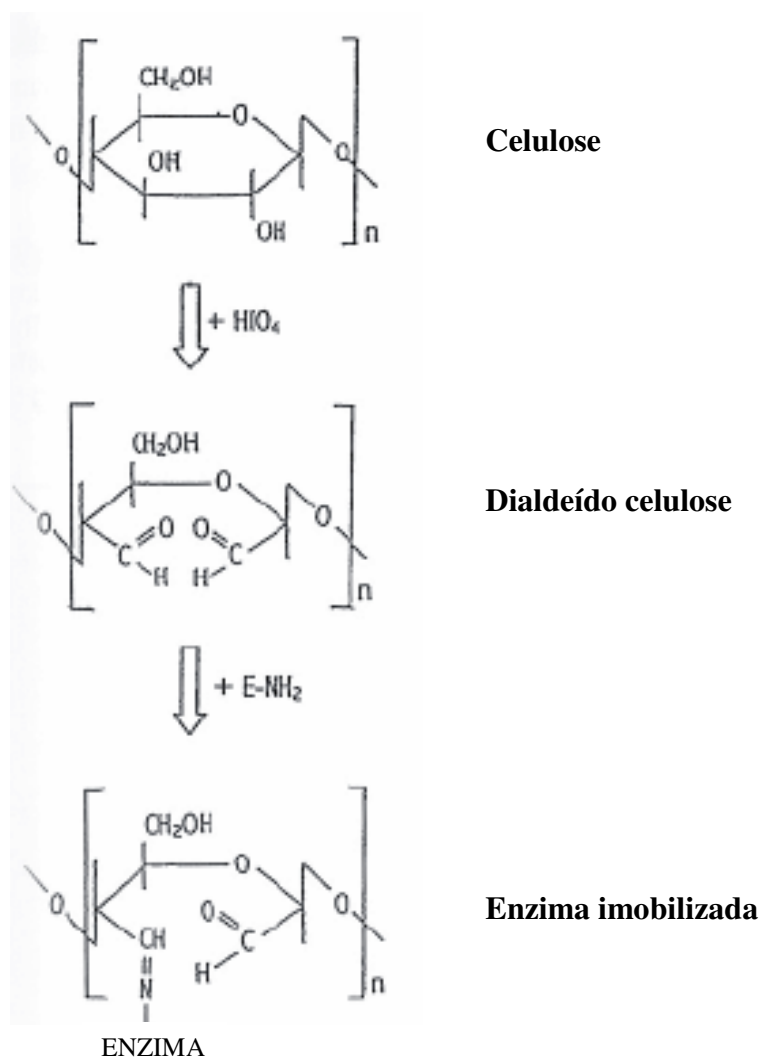


Figura 4: Esquema da imobilização enzimática em celulose, por ativação com ácido periódico (VARAVINIT *et al.*, 2002).

4.4.3. Glutaraldeído

Métodos de ativação, preferencialmente realizada no suporte, têm por objetivo introduzir grupos reativos na superfície do suporte, capazes de reagir com os grupos reativos da enzima. As ativações mais usuais são feitas com brometo de cianogênio, reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos, como o dioxirano ou aldeídos, como o glutaraldeído (TARDIOLI, 2003).

O glutaraldeído, mostrado na figura 5, é uma molécula bifuncional que interage muito fortemente com compostos que possuem grupos amino em sua estrutura e, com menor intensidade, com o grupo tiol. Inicialmente, o glutaraldeído foi muito utilizado como fixador na histoquímica e na microscopia eletrônica. Só depois ele foi utilizado como reagente bifuncional no estudo estrutural de proteínas simples e macromoléculas agregantes (HAJDU; FRIEDRICH, 1975).

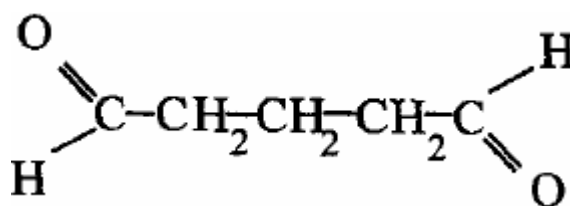


Figura 5: Estrutura molecular do glutaraldeído (MONTEIRO-JUNIOR,1999) .

O glutaraldeído normalmente age como um agente formador de ligações cruzadas (*crosslinking*). A interação ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos aminas livres dos compostos (HAJDU; FRIEDRICH, 1975). No entanto, o mecanismo de formação desta interação e as estruturas dos compostos obtidos não estão ainda bem definidos. Normalmente, afirma-se que nessa interação há a formação de uma base de Schiff, que é uma ligação covalente instável (MONTEIRO-JUNIOR, 1999).

A interação do glutaraldeído com o grupo amina livre tem sido muito explorada em diversas circunstâncias, destacando-se, entre elas, a imobilização de enzimas (WEETALL, 1976; GROSE *et al.*, 1978), sendo nesta utilizada uma gama muito grande de diferentes enzimas e suportes (ONYEZILI, 1987; MAKINO *et al.*, 1988; VASUDEVAN *et al.*, 1990; HUANG; CHEN, 1992; KUROKAWA *et al.*, 1993). Embora seja o método mais utilizado em imobilizações de enzimas, ele apresenta alguns problemas, tais como: a ligação da molécula de enzima no suporte com diversas orientações, o que pode tornar o sítio de algumas enzimas inacessível para grandes substratos (TARDIOLI *et al.*, 2003a e b); a formação de aglomerações ou múltiplas camadas de enzima no interior dos poros do suporte, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo (SOBRAL *et al.*, 2002 e 2003); a produção de derivados que são poucas

vezes mais estáveis que a enzima solúvel; a alta reatividade e instabilidade dos grupos reativos, as quais requerem rápido contato com a enzima, não permitindo a estocagem prolongada do suporte ativado (TARDIOLI, 2003); e a queda da atividade enzimática em alguns casos (CETINUS; OZTOP, 2003; FERREIRA *et al.*, 2003).

Ainda assim, muitos trabalhos têm sido realizados com a ativação dos suportes pelo glutaraldeído (GASPARI *et al.*, 1999; BARROS *et al.*, 2003; CHANG; JUANG, 2005; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; AMAYA-DELGADO *et al.*, 2006; KAWAGUTI *et al.*, 2006; OLIVEIRA; VIEIRA, 2006; MARTINS *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2007). SPAGNA *et al.* (1998), inclusive, utilizaram o glutaraldeído de diversas formas na imobilização de α -L-arabinofuranosidase em quitina e quitosana e obtiveram bons resultados. Os processos adotados em seu trabalho envolveram a ativação dos suportes com glutaraldeído antes de colocá-los em contato com a enzima (*funcionalização*) ou, alternativamente, a adsorção da enzima no suporte e sua ligação cruzada, sempre com glutaraldeído, que foi adicionado tanto na ausência (*crosslinking*) quanto na presença (*conjugação*) da solução de enzima remanescente após a adsorção.

4.4.4. Polietilenoimina

A polietilenoimina (PEI), mostrada na figura 6, é uma amina polimérica alifática polibásica (KAWAGUTI; SATO, 2008), representada pela fórmula geral $H(NHCH_2CH_2)_nNH_2$. Segundo JESSEL *et al.* (2004) é utilizada como um eletrólito multicamada em superfícies carregadas para produzir uma cobertura biocompatível sobre as superfícies. A polietilenoimina também induz a precipitação seletiva de proteínas, pois, sendo um polímero positivamente carregado, induz a precipitação de proteínas ácidas (GALVÃO, 2005).

A polietilenoimina também é empregada nas reações de imobilização. De acordo com KAWAGUTI e SATO (2008), na imobilização de células, é utilizada como um constituinte menor, dando uma característica hidrofílica e maior força mecânica às preparações de células imobilizadas. Pode também ser usada como um constituinte primário do suporte, como agente de reticulação ou ligação (BAHULEKAR *et al.*, 1991). Segundo BOFO *et al.* (2005), que imobilizaram células de leveduras em bagaço de cana, a polietilenoimina ativa os radicais amina presentes no suporte. SHIMIZU *et al.* (1982) estudaram o uso de glutaraldeído e de polietilenoimina na imobilização de

células de *Serratia plymuthica* NCIB-8285 em alginato, no processo de batelada para a conversão da sacarose em isomaltulose, no qual os autores descreveram a polietilenoimina como um agente de ligações cruzadas (*crosslinking*) nas células imobilizadas em alginato.

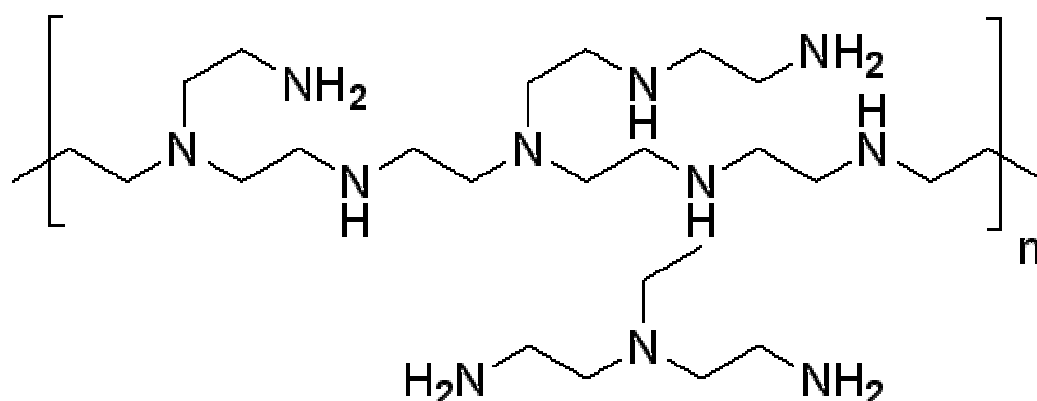


Figura 6: Estrutura molecular da polietilenoimina (PEI).

Fonte: Sigma-Aldrich Co.

Na imobilização de enzimas, alguns autores também utilizam a polietilenoimina. MAIA *et al.* (2007), trabalhando com a imobilização de urease em silicone poroso, utilizaram a polietilenoimina como um agente fixador, aplicando-a sobre o suporte. Da mesma forma, MATEO *et al.* (2000) propõem o tratamento do suporte com polietilenoimina como uma ferramenta para melhorar a adsorção de proteínas sobre suportes catiônicos, assim como LÓPEZ-GALLEGRO *et al.* (2005), que empregaram o reagente para a imobilização de D-aminoácido oxidase. POÇAS *et al.* (2004) utilizaram a polietilenoimina de diversas formas para a imobilização de invertase em bucha vegetal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material de estudo

5.1.1. Microrganismos utilizados

As amostras de *Saccharomyces cerevisiae* floculado que foram utilizadas nos ensaios de desfloculação, reciclo da atividade enzimática e viabilidade celular, foram obtidas de amostras de vinho levrado (mosto fermentado com leveduras, oriundo das dornas de fermentação) proveniente de destilaria (Nova América – Maracáí/SP). O vinho levrado, cuja concentração gira em torno de 10% a 15% de leveduras em massa úmida, foi centrifugado para separar o vinho do fermento, o qual foi ressuspendido em água destilada na concentração de 30% de fermento (em massa úmida), que é o percentual utilizado nas cubas de tratamento ácido das destilarias. O fermento, então, foi reservado em geladeira para sua imediata utilização nos ensaios de desfloculação e viabilidade celular ou preservado em freezer comum (-4 a -10°C), quando sua utilização foi necessária apenas posteriormente.

5.1.2. Papaína (EC 3.4.22.2)

Nesse trabalho, foi utilizada a enzima papaína comercial em pó (seca) da marca Vetec Química Fina LTDA, com 6000 UI/mg de atividade proteolítica. Essa enzima foi dissolvida em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 6,4 quando utilizada em sua forma livre nos ensaios de atividade proteolítica e em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 7,0 quando

imobilizada. A papaína foi ainda utilizada em pó (sem dissolução) nos ensaios de desfloculação do fermento.

5.1.3. Glutaraldeído

Foi utilizado glutaraldeído a 25% em água (P.A.) da marca Nuclear, o qual foi diluído em água até as concentrações desejadas nos ensaios.

5.1.4. Polietilenoimina (PEI)

Foi empregada no trabalho a polietilenoimina (PEI) de alto peso molecular da marca Aldrich (Sigma-Aldrich Co.), a qual foi diluída em água até as concentrações desejadas nos ensaios.

5.1.5. Suportes

5.1.5.1. Quitina

A quitina foi obtida a partir de carapaças de camarão, segundo KIMURA *et al.* (1999). Tais carapaças, após serem secas ao ar, em temperatura ambiente, e trituradas até o tamanho de cerca de 1 a 2 mm, foram imersas em uma solução de HCl a 2,0 mol/L, numa proporção de 10 mL de solução por grama de carapaça, durante 5 h à temperatura ambiente para a eliminação dos sais de cálcio. O material foi então lavado, seco e novamente imerso em HCl a 2,0 mol/L por 48 h com agitação, numa proporção de 2,5 mL de solução por grama de material. Para eliminação das proteínas, o material foi colocado em contato com uma solução de NaOH a 1,0 mol/L (2,5 mL de solução por grama de material) durante 12 h a 100°C, com agitação. A extração com álcali foi repetida por mais 2 vezes, e então o material foi lavado sequencialmente com água até meio neutro, etanol para eliminação dos pigmentos e éter etílico. Finalmente, o material foi seco a 60°C. Um resumo do processo está apresentado na figura 7.

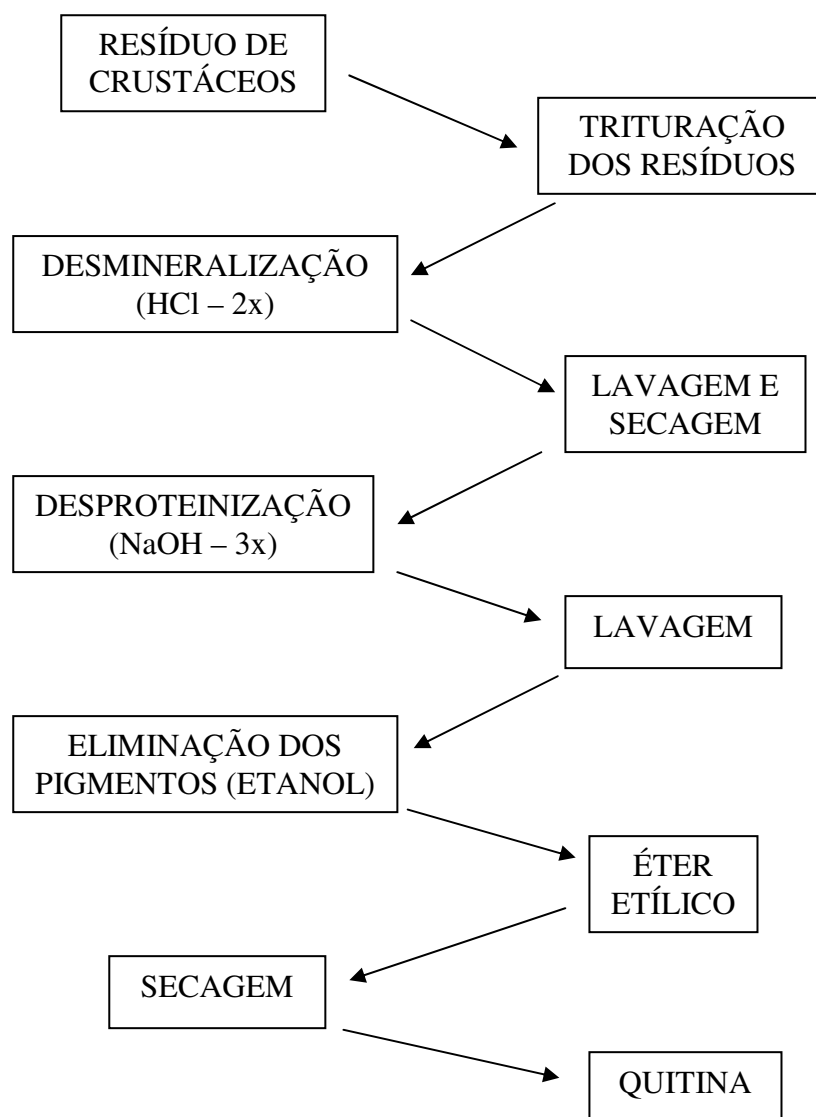


Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção de quitina.

5.1.5.2. Celulose

A obtenção de celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar foi realizada de acordo com o método proposto por VARAVINIT *et al.* (2002). Cerca de 500 g de bagaço de cana triturado em partículas de 1 a 5 mm, obtidos de usina (Nova América – Taramã/SP), foram embebidos 3 vezes em 1 L de água destilada por 1 h em cada vez e secos em estufa de ar forçado a 70°C. Posteriormente, 15 g de bagaço lavado foram purificados, mergulhando o material em 2 L de solução de H₂SO₄ a 1,25% por 1 h e depois, em 2 L de solução de NaOH a 1,25%, também por 1 h. Então, o material foi

lavado em 1 L de água destilada e 500 mL de etanol, respectivamente, para, finalmente, ser seco em estufa de ar forçado a 100°C por 2 h. O resumo do processo está apresentado na figura 8.

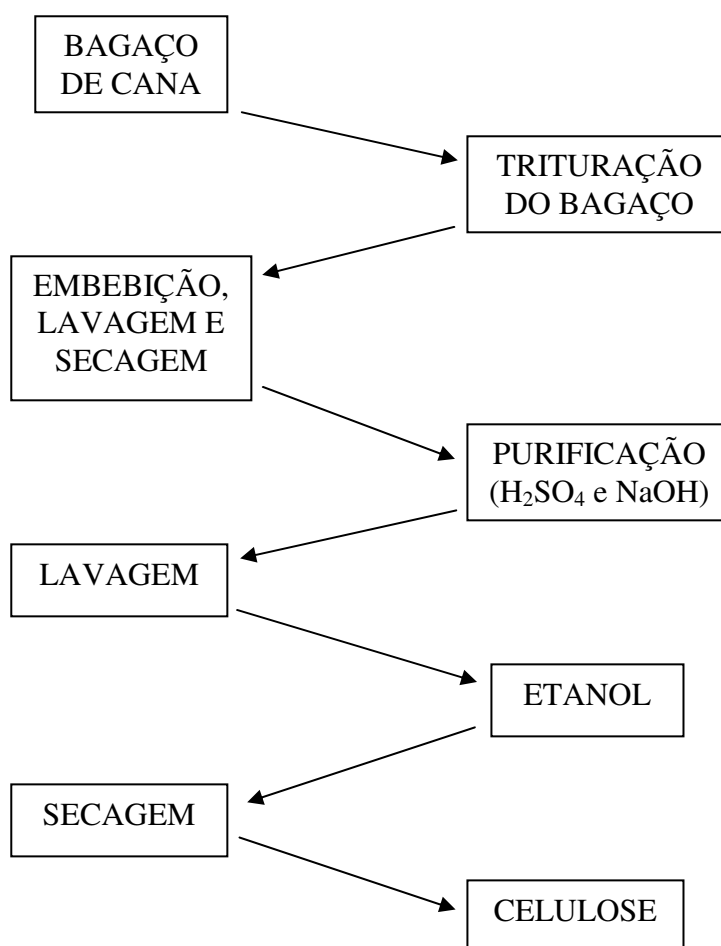


Figura 8: Fluxograma do processo de obtenção de celulose.

5.2. Imobilizações

5.2.1. Imobilização da papaína em quitina

O processo de imobilização da papaína em quitina teve como base os métodos utilizados por SYNOWIECKI *et al.* (1987), ROSA *et al.* (2004) e OLIVA-NETO (2004), com algumas modificações. A imobilização em quitina foi conduzida, basicamente, de duas formas: sem tratamento prévio do suporte e tratado com glutaraldeído. Para o tratamento, foram adicionados 10 mL de glutaraldeído a 2% (v/v) por grama de quitina em temperatura ambiente. Essa mistura permaneceu por 2 h para a ativação do suporte. Depois de transcorrido o período de ativação, a mistura foi filtrada e lavada sequencialmente com água destilada (3 x 500 mL) para remover o excesso de glutaraldeído. A partir de então, foram realizadas as imobilizações, adicionando a cada grama de quitina não-tratada, 10 mL das soluções de (a) papaína comercial a 100 mg/mL em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 7, (b) papaína comercial a 100 mg/mL em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 7 e polietilenoimina (PEI) a 0,1% (v/v) e (c) papaína comercial a 100 mg/mL (m/v) em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 7 e polietilenoimina (PEI) a 0,5% (v/v), por 2 h à temperatura de 5°C. O mesmo procedimento foi realizado com a quitina previamente tratada com glutaraldeído, totalizando, dessa forma, 6 diferentes protocolos de imobilização (tabela 1). Posteriormente, esse material foi filtrado para a separação do excesso de solução enzimática e lavado 2 vezes com água destilada (50 mL e 500 mL por grama de suporte, respectivamente) e acondicionado em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 7, em geladeira para sua utilização nos testes da atividade proteolítica e nos ensaios de desfloculação. Foi avaliado o grau de imobilização, medindo-se a atividade enzimática e a quantidade de proteínas da solução enzimática restante do processo, bem como a da água utilizada na retirada do excesso dessa solução, em relação à solução inicial.

Tabela 1: Protocolos de imobilização de papaína (EC 3.4.22.2) em quitina

Solução adicionada ao suporte	Tratamento prévio do suporte
A) papaína comercial a 100 mg/mL	-
B) papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1%	-
C) papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5%	-
D) papaína comercial a 100 mg/mL	glutaraldeído a 2%
E) papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1%	glutaraldeído a 2%
F) papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5%	glutaraldeído a 2%

5.2.2. Imobilização da papaína em celulose de bagaço de cana

A imobilização da papaína em celulose foi realizada de acordo com a técnica proposta por VARAVINIT *et al.* (2002). Para a imobilização, nesse caso, foi necessária a oxidação do bagaço purificado para a liberação de grupos aldeído da celulose. Dessa forma, 5 g de bagaço purificado foram imersos em 375 mL de solução de H_5IO_6 a 0,03 mol/L. A mistura teve seu pH ajustado para 3 e foi mantida em agitação constante de 200 rpm, a 90°C por 15 h. O material então foi filtrado, lavado 3 vezes com água destilada (3 x 1000 mL) e seco em estufa de ar forçado a 100°C.

Para a imobilização, 1 g de bagaço oxidado foi misturado a 30 mL de solução de papaína comercial a 100 mg/mL em tampão fosfato a 0,2 mol/L, pH 7. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 50°C com constante agitação por 30 minutos. Então, o material foi filtrado para remover o excesso de enzima e lavado, seqüencialmente, com 800 mL e 100 mL de água destilada. A solução enzimática remanescente do processo, bem como a água utilizada na retirada do excesso dessa solução, foram reservadas para posterior ensaio de atividade enzimática e quantificação de proteínas, para se avaliar a eficiência do processo de imobilização.

5.3. Procedimentos analíticos

5.3.1. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica da enzima foi determinada pela hidrólise de azocaseína sulfanilamida, de acordo com o método de LEIGHTON *et al.* (1973), no qual foram misturados 250 µL de solução de azocaseína (Sigma – Sigma-Aldrich Co.) a 1% com 150 µL de solução de enzima para as amostras de enzima livre e 0,5 mL de solução de azocaseína a 3,75% com 1 g de suporte para a enzima imobilizada. Essas soluções e/ou misturas foram incubadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos e a reação interrompida com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v). Esse material, então, depois de centrifugado, foi misturado a uma solução de NaOH a 1 mol/L para estabelecer a coloração, a qual foi identificada espectrofotometricamente em $\lambda = 440$ nm. A unidade de atividade volumétrica (U/mL) foi definida como a variação de absorbância por 30 minutos, por mL da solução de enzima ou por grama do suporte. A atividade total (U) foi determinada por meio do produto da atividade volumétrica pelo volume total de solução utilizada, enquanto que a atividade específica (U/mg) foi determinada por meio do quociente da atividade volumétrica pela concentração de proteínas da solução ou do material em questão.

5.3.2. Determinação de proteínas

A metodologia empregada para a determinação de proteínas totais utilizada foi aquela descrita por BRADFORD (1976). Esta metodologia baseia-se no monitoramento de um complexo formado ($\lambda = 588$ nm) entre as proteínas e o reagente Comassie Blue em meio ácido. A equação da curva padrão para este ensaio foi $[y = 0,0051x + 0,071]$, enquanto que o coeficiente de regressão linear (R^2) foi de 0,9928. As quantificações de proteínas foram realizadas antes e após o procedimento de imobilização no suporte.

5.3.3. Efeito do glutaraldeído e da polietilenoimina sobre a atividade enzimática

Uma vez que altas concentrações de glutaraldeído, o qual foi utilizado em algumas reações de imobilização com quitina, podem afetar a atividade catalítica de algumas enzimas (SYNOWIECKI *et al.*, 1987; FERREIRA *et al.*, 2003), foi necessária

a realização de um ensaio para a determinação da sensibilidade da papaína a esse reagente. Dessa forma, foi realizada a determinação da atividade proteolítica da papaína, mantida em contato com diferentes concentrações de glutaraldeído por 120 minutos (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2,5 e 10%, em v/v). As concentrações de 0,05 e 0,1% (v/v) de glutaraldeído também foram mantidas em contato com a papaína por 30, 60 e 90 minutos.

O mesmo procedimento foi feito utilizando-se polietilenoimina ao em vez do glutaraldeído (com exceção da concentração de 0,05%), mantendo o material em contato por 120 minutos, visto que tal reagente também foi utilizado em algumas reações de imobilização em quitina.

5.3.4. Determinação da viabilidade celular do fermento submetido ao tratamento enzimático

A porcentagem de células vivas (viabilidade) do fermento submetido ao tratamento com papaína livre foi determinada por meio de microscopia óptica em câmara de Neubauer, na qual as células foram contadas escolhendo-se cinco quadrados médios (quatro nas extremidades e um no centro da lâmina), ajustando a diluição das amostras para uma nítida mensuração (entre 20 a 40 células por quadrado médio) (JOHNSTONE; THORPE, 1987). Para tanto, as células de leveduras tratadas e não-tratadas com papaína foram coradas com solução de eritrosina (SHARF, 1972). A amostra de leveduras não-tratada com papaína foi tratada com H₂SO₄, em quantidade suficiente para provocar a desfloculação celular, necessária para uma visualização adequada ao microscópio. Os resultados foram dados em porcentagem de células vivas (não-coradas) em função do número total de células contadas.

5.4. Determinação do rendimento da atividade enzimática

O rendimento da atividade enzimática foi definido pelo rendimento da enzima imobilizada em quitina ou celulose e expressada na seguinte equação segundo VARAVINIT *et al.* (2002).

$$[1] \text{ Rendimento da Atividade (\%)} = 100 \times \frac{\text{Atividade total da enzima imobilizada}}{A - B}$$

A é a atividade total da enzima livre adicionada ao suporte, e B é a atividade total da enzima que não foi imobilizada durante o processo (enzima restante na solução excedente e enzima não imobilizada, presente na água utilizada na retirada do excesso de solução do suporte).

Além da equação acima exposta, foi também proposto nesse trabalho um cálculo de rendimento simplificado, que não leva em consideração a perda de atividade nas soluções remanescentes, mas apenas a atividade total da enzima imobilizada em relação à atividade total da enzima livre adicionada ao suporte, a saber:

$$[2] \text{ Rendimento Simplificado (\%)} = 100 \times \frac{\text{Atividade total da enzima imobilizada}}{A}$$

5.5. Desfloculação celular

5.5.1. Utilização da enzima imobilizada na desfloculação celular

Além dos experimentos de atividade proteolítica com a enzima imobilizada em quitina ou celulose, foram conduzidos ensaios para a determinação da estabilidade dessa atividade ao longo de sua reutilização, por meio de ciclos de testes de desfloculação de fermento. Tais testes foram executados de acordo com o método de LUDWIG *et al.* (2000), com certas adaptações. Para os testes foram utilizadas amostras de 50 mL do fermento floculado, proveniente de destilaria, já centrifugado e ressuspensionado em água destilada, numa concentração de 30% (m/v). A essas suspensões foi adicionada a papaína já no seu estado imobilizado, para a reação de desfloculação. Essas misturas, além dos controles negativo (mistura sem adição de enzima, completamente floculado) e positivo (mistura com a adição de papaína comercial livre, na concentração de 4 mg/mL, determinada em ensaios preliminares – item 6.1), foram incubadas a uma temperatura de 28°C e agitação de 70 rpm em Erlenmeyers de 250 mL. As soluções agitadas eram transferidas para frascos cônicos (taças) permanecendo em repouso por 15 minutos, e, em seguida, uma alíquota do sobrenadante de cada taça era retirada e determinada sua turbidez espectrofotometricamente em $\lambda = 600$ nm, a qual é inversamente proporcional ao percentual de floculação. As misturas de cada taça eram, então, devolvidas aos seus

respectivos Erlenmeyers para nova agitação, e o procedimento de descanso das misturas nas taças e retirada das amostras de seus sobrenadantes foi realizado nos intervalos de 15, 40, 70 e 120 minutos de reação, concluindo, dessa forma, um ciclo. No entanto, o ciclo podia ser interrompido nos intervalos iniciais, se observada a completa desfloculação. Concluído o ciclo, a enzima imobilizada era separada, lavada com água destilada e reutilizada no próximo ciclo, e assim, subseqüentemente, até que se observasse expirada a atividade desfloculante.

A separação de fases obtida nas taças (sobrenadante/*S. cerevisiae* floculado) foi caracterizada visualmente e também fotografada. A quantificação da desfloculação foi determinada, utilizando-se a tabela de porcentagens de desfloculação (tabela 2), adaptada de LUDWIG *et al.* (2000).

Tabela 2: Porcentagem de desfloculação de *Saccharomyces cerevisiae* floculado, proveniente de destilaria, em suspensão a 30% (m/v) em água destilada.

Turbidez	% Desfloculação	Separação de fases
≤ 12,0	0	s ²
27,0	25	ns ³
40,5	37,5	ns
54,0	50	ns
67,5	62,5	ns
81,0	75	ns
94,5	87,5	ns
≥ 120,0 ¹	100	ns

¹ máxima desfloculação obtida com ácido

² s = separadas;

³ ns = não-separadas

5.5.2. Utilização da enzima solúvel na suspensão de fermento para a desfloculação celular

Além do reciclo da enzima imobilizada, também foi testado o reciclo da enzima em sua forma livre. O reciclo da papaína livre sobre o fermento foi realizado de maneira semelhante ao método descrito no item 5.5.1. No entanto, foi adicionado ao fermento floculado papaína comercial livre, na concentração de 4 mg/mL (concentração ótima, determinada em ensaios prévios de desfloculação, item 6.1), bem como uma

mistura de papaína e dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 µg/mL, que, por ser um agente surfactante, poderia potencializar a desfloculação do fermento. O emprego dessa concentração reduzida de SDS se justifica pela toxicidade desse agente para as células de levedura, observada por OLIVA-NETO e YOKOYA (1998), a partir de 30 µg/mL.

Dessa forma, observada a desfloculação do fermento pela enzima e/ou pela mistura enzima + SDS, o ciclo era interrompido por meio da centrifugação do fermento, já desfloculado. Desse modo, separava-se o fermento de grande parte da enzima que ainda estava em solução. Essa solução era utilizada em um novo ciclo, adicionando-a a uma nova amostra de fermento não-tratado. Caso a solução sobrenadante obtida da centrifugação não fosse suficiente para ressuspender o fermento a uma concentração de 30% (m/v) de células, era adicionada uma solução de enzima ou enzima + SDS, nas concentrações iniciais do ensaio, porém, em volumes bem inferiores, apenas para a compensação das perdas com a centrifugação.

5.6. Tratamento Estatístico

Os testes de análise da desfloculação e de atividade enzimática foram conduzidos em triplicata, e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), enquanto que as médias foram comparadas por testes de Student ou Tukey e Kramer, através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University). Os tratamentos analisados estatisticamente foram considerados significativos para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Faculdade de Ciências e Letras – Campus de Assis da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

6.1. Concentração mínima de papaína livre necessária para a desfloculação do fermento

Para servir de parâmetro para os outros ensaios, foi determinada a concentração mínima de papaína necessária para desflocular completamente o fermento. A tabela 3 e a figura 9 mostram o efeito do tratamento da papaína comercial a 3 mg de papaína/mL de suspensão e 4 mg de papaína/mL de suspensão sobre o fermento floculado.

Pode-se observar que houve desfloculação efetiva do fermento pelas duas concentrações de enzima após 15 minutos de reação (ANOVA $F=162,32$ e Tukey $p<0,001$). No entanto, houve uma diferença significativa entre as duas concentrações de enzima analisadas, na qual a concentração de 4 mg/mL de papaína comercial obteve melhores resultados (ANOVA $F=162,32$ e Tukey $p<0,05$), sendo escolhida como concentração ótima para os ensaios de desfloculação do fermento.

Tabela 3: Efeito da papaína comercial nas concentrações de 3 mg de papaína/mL de suspensão e 4 mg de papaína/mL de suspensão, na desfloculação celular de *S. cerevisiae* flocculado, com 15 minutos de reação.

Tratamento	Turbidez (600nm)			Média ± SD
	1	2	3	
Controle (sem tratamento)	42,42	45,81	36,45	41,56 ± 4,74
papaína comercial a 3 mg/mL	106,02	96,71	111,53	104,75 ± 7,49
papaína comercial a 4 mg/mL	122,85	125,58	116,76	121,73 ± 4,51

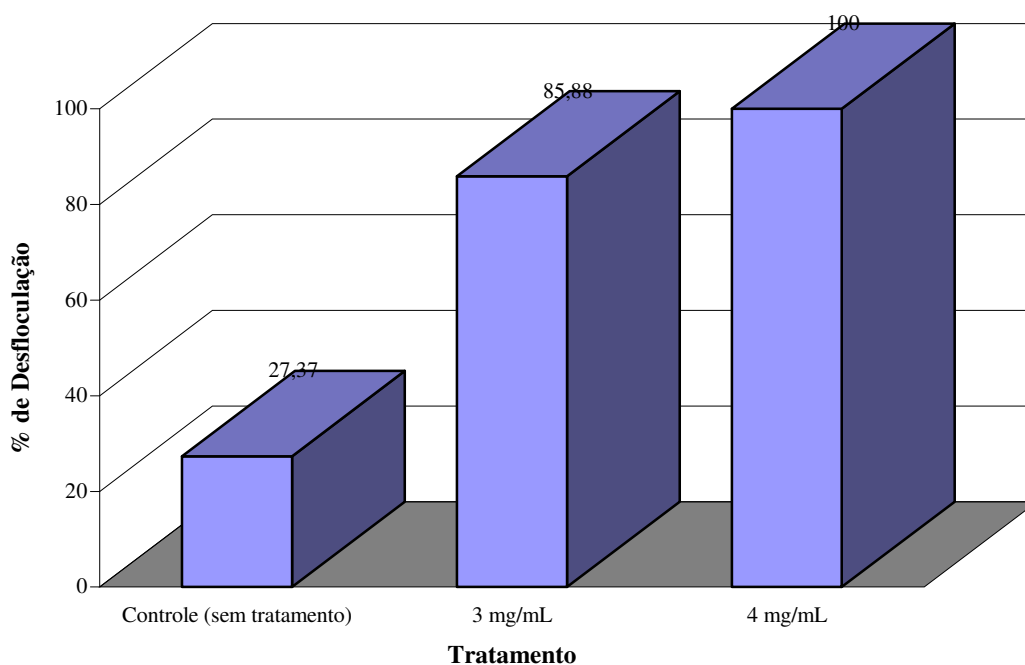


Figura 9: Porcentagem de desfloculação da suspensão de fermento flocculado de destilaria a 30% (m/v), tratada com 3 mg de papaína/mL de suspensão e 4 mg de papaína/mL de suspensão de fermento, em 15 minutos de reação.

6.2. Viabilidade celular do fermento submetido à alta concentração de papaína

Por meio da quantificação da viabilidade celular, foi verificada a sensibilidade das células de levedura à papaína, uma vez que esta enzima, sendo uma protease, poderia degradar componentes celulares de natureza protéica. Dessa forma, o fermento floculado foi tratado com papaína comercial a 5 mg de papaína/mL de suspensão de fermento por 2 h. Outra amostra de fermento foi tratada com 2% (v/v) de H₂SO₄, apenas para que ocorresse a desfloculação, necessária para uma visualização adequada das células ao microscópio.

A viabilidade celular do fermento tratado com H₂SO₄ e com papaína foi de 67,19% e de 72,40%, respectivamente. O percentual de células viáveis do mesmo lote de fermento, informado pelo laboratório da destilaria (Nova América – Maracá/SP), foi de 67,70%. Isso evidencia que o tratamento enzimático não afeta a viabilidade celular, o que já foi demonstrado por OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORII (1998), além de se mostrar mais adequado que o tratamento ácido, uma vez que baixos valores de pH podem afetar a viabilidade das células de levedura, como foi observado por DORTA *et al.* (2006). O mesmo foi determinado por LUDWIG *et al.* (2000), que, no entanto, utilizaram uma quantidade 2,5 vezes menor de enzima proteolítica sobre as leveduras.

6.3. Efeito do glutaraldeído de da polietilenoimina sobre a atividade enzimática

Visto que o glutaraldeído seria utilizado em algumas reações de imobilização, foi realizado um ensaio de atividade proteolítica com papaína comercial a 10 mg/mL, na qual a referida enzima foi mantida em contato com glutaraldeído em diversas concentrações (0,1% a 10%) por 120 minutos em baixas temperaturas (4°C a 10°C), simulando as condições a que a enzima seria exposta nas imobilizações. Como se pode observar na tabela 4 e na figura 10, verificou-se que o glutaraldeído, em qualquer uma das concentrações testadas, afeta a atividade enzimática, quando comparado com a atividade da enzima sem tratamento com o referido reagente, sobretudo nas concentrações de 5% e 10%, para as quais a atividade enzimática tende a 0 (ANOVA F=1564,3 e Tukey p<0,001).

Tabela 4: Efeito do glutaraldeído em diferentes concentrações, sobre a atividade volumétrica (U/mL) da papaína comercial a 10 mg/mL, com 120 minutos de reação.

Concentração de glutaraldeído (v/v) (%)	Atividade enzimática (U/mL)			Média ± SD
	Repetições			
	1	2	3	
0 (controle)	2,02	2,09	2,01	2,04 ± 0,04
0,1	0,26	0,15	0,15	0,19 ± 0,06
0,5	0,13	0,14	0,12	0,13 ± 0,01
1	0,13	0,12	0,13	0,13 ± 0,01
1,5	0,12	0,11	0,15	0,13 ± 0,02
2	0,09	0,13	0,13	0,12 ± 0,02
5	0,01	0	0,03	0,01 ± 0,02
10	0	0	0	0,00 ± 0,00

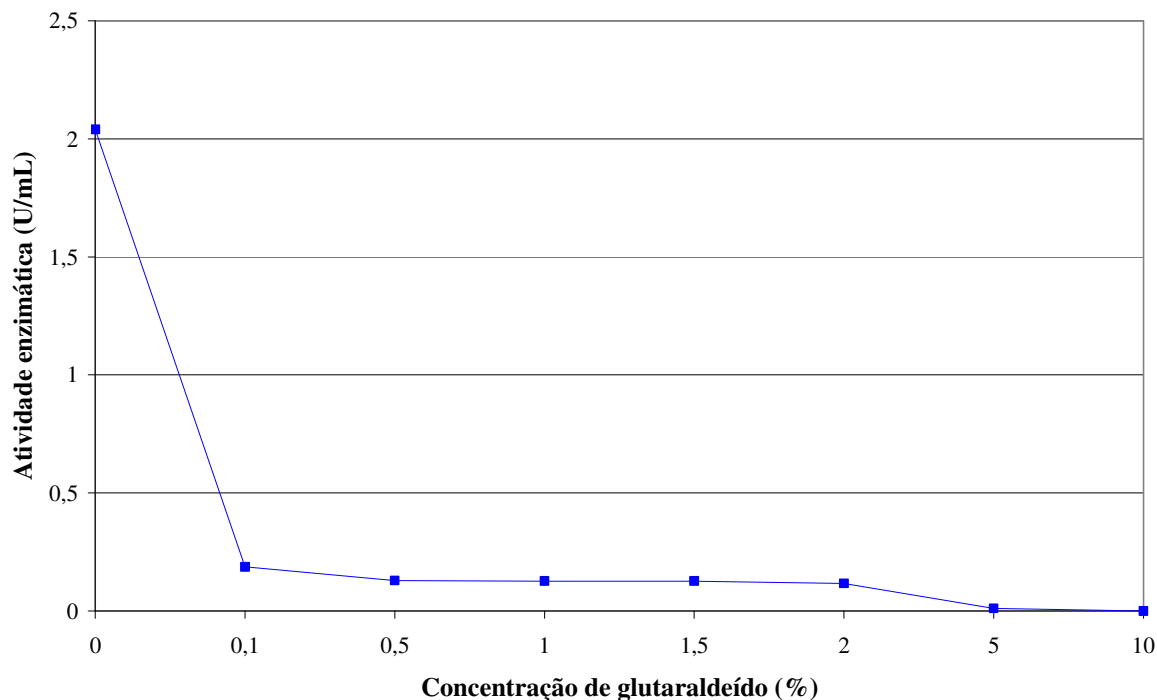


Figura 10: Atividade enzimática volumétrica da papaína comercial a 10 mg/mL, em função da concentração de glutaraldeído empregada, em 120 minutos de reação.

Dessa forma, optou-se por testar novamente a menor concentração de glutaraldeído experimentada (0,1%) em contato com a enzima em menores intervalos de tempo (30, 60 e 90 minutos), bem como a concentração de 0,05%, submetida aos mesmos tempos de reação, além do tempo de 120 minutos (tabela 5 e figura 11). Constatou-se, da mesma forma, que tais concentrações de glutaraldeído, mesmo com menores tempos de contato com a papaína, interferem na atividade proteolítica da papaína, inviabilizando seu uso concomitante nas reações de imobilização. SPAGNA *et al.* (1998), trabalhando com α -L-arabinofuranosidase de *Aspergillus niger*, obtiveram resultados diversos. Em seu trabalho, a enzima livre, em contato com glutaraldeído a 2% por 2 a 3 h de reação a 25°C, sofreu apenas uma pequena queda na atividade (cerca de 20% a 30%). Os autores sugerem que isso se deve à possibilidade de haver proteínas estranhas na solução tratada, que reagiriam com o glutaraldeído ao invés da enzima em questão, o que não ocorreu no caso da papaína. Além do mais, é possível que cada enzima responda de uma forma distinta ao contato com o glutaraldeído. Assim, optou-se por utilizar o glutaraldeído apenas para tratar a quitina previamente, a qual foi lavada depois do tratamento para remover todo o glutaraldeído livre, antes da adição da enzima no procedimento de imobilização. Dessa maneira, evitou-se o contato direto da enzima com glutaraldeído livre no processo.

Tabela 5: Efeito do glutaraldeído, nas concentrações de 0,05% e 0,1% (v/v), sobre a atividade volumétrica (U/mL) da papaína comercial a 10 mg/mL, com 30, 60, 90 e 120 minutos de reação.

Concentração de glutaraldeído (v/v) (%)	Tempo (min.)	Atividade enzimática (U/mL)			Média ± SD
		1	Repetições 2	3	
0 (controle)	30	1,96	1,57	1,83	1,79 ± 0,20
	60	1,72	1,59	1,57	1,63 ± 0,08
	90	1,53	1,44	1,40	1,46 ± 0,07
	120	3,37	3,11	3,05	3,18 ± 0,17
0,05	30	0,53	0,48	0,47	0,49 ± 0,03
	60	0,44	0,43	0,47	0,45 ± 0,02
	90	0,45	0,46	0,49	0,47 ± 0,02
	120	0,43	0,38	0,45	0,42 ± 0,04
0,1%	30	0,26	0,21	0,23	0,23 ± 0,02
	60	0,28	0,31	0,29	0,26 ± 0,01
	90	0,20	0,19	0,25	0,21 ± 0,03

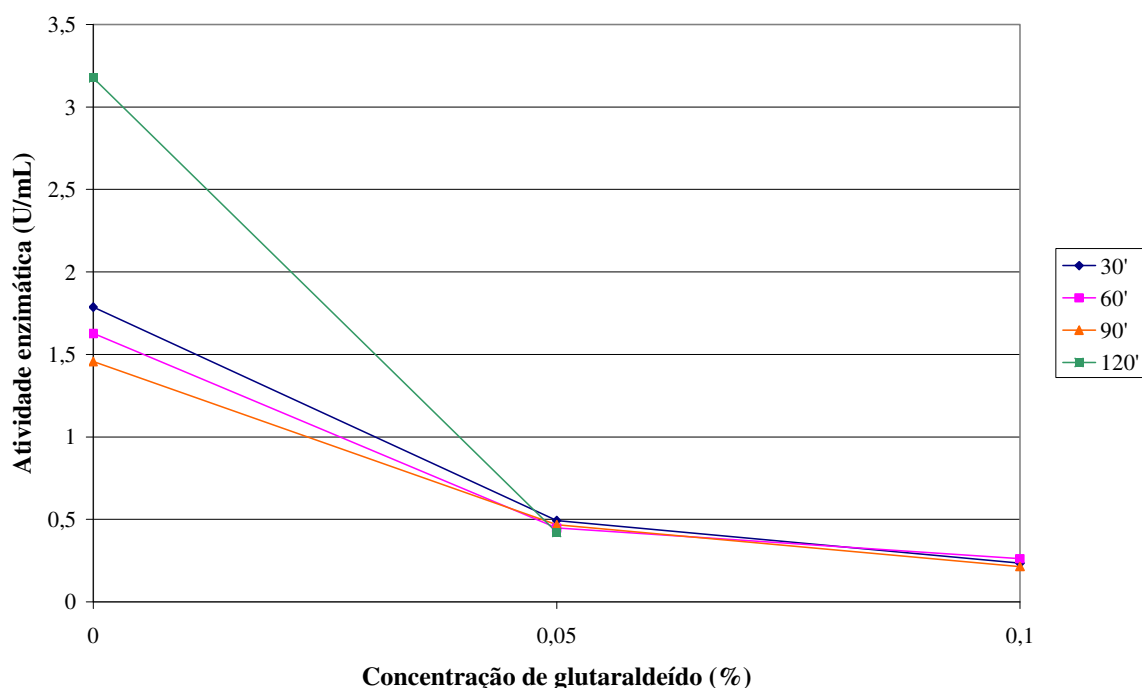


Figura 11: Atividade enzimática volumétrica da papaína comercial a 10 mg/mL, em função da concentração de glutaraldeído empregada, em 30, 60, 90 e 120 minutos de reação.

Da mesma forma, foi conduzido um ensaio de atividade proteolítica, tratando a papaína com diversas concentrações de polietilenoimina (0,1% a 10%) por 120 minutos, uma vez que tal reagente também seria empregado em conjunto com a enzima nas reações de imobilização (tabela 6 e figura 12). Pôde-se observar que, em relação ao controle (papaína não-tratada), apenas a concentração de 0,1% de polietilenoimina não afetou a atividade enzimática. Quando tratada com 0,5% de polietilenoimina, a enzima perdeu parte de sua atividade proteolítica. Tal queda de atividade, apesar de pequena, foi significativa para $p < 0,05$ (ANOVA $F=151,68$). As demais concentrações de polietilenoimina testadas afetaram excessivamente a atividade da papaína (ANOVA $F=151,68$ e Tukey $p < 0,001$). Dessa forma, foram selecionadas, para a utilização concomitante com a enzima nos processos de imobilização, apenas as concentrações de 0,1% e 0,5% de polietilenoimina.

Tabela 6: Efeito da polietilenoimina em diferentes concentrações, sobre a atividade volumétrica (U/mL) da papaína comercial a 10 mg/mL, com 120 minutos de reação.

Concentração de polietilenoimina (v/v) (%)	Atividade enzimática (U/mL)			Média ± SD
	Repetições			
	1	2	3	
0 (controle)	2,59	2,76	2,71	2,69 ± 0,09
0,1	2,96	3,05	3,01	3,01 ± 0,04
0,5	2,50	2,02	2,25	2,26 ± 0,24
1	0,63	0,49	0,58	0,57 ± 0,07
1,5	0,89	0,81	0,73	0,81 ± 0,08
2	0,65	0,57	0,53	0,58 ± 0,06
5	0,59	0,80	0,85	0,75 ± 0,14
10	0,45	0,91	0,43	0,60 ± 0,27

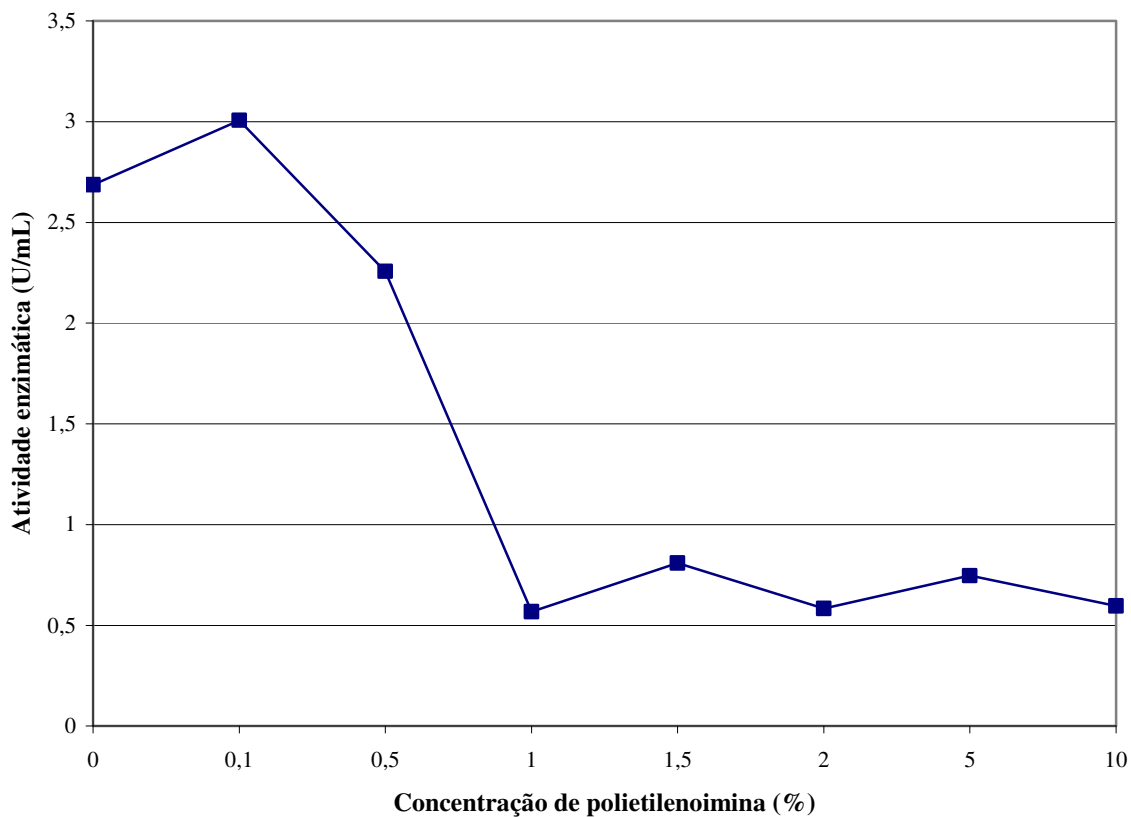


Figura 12: Atividade enzimática volumétrica da papaína comercial a 10 mg/mL, em função da concentração de polietilenoimina empregada, em 120 minutos de reação.

6.4. Imobilização da papaína em quitina

As diversas imobilizações em quitina (tabela 1) foram propostas com base nas observações feitas nos ensaios de atividade proteolítica, nos quais a papaína foi tratada previamente com diversas concentrações de glutaraldeído ou de polietilenoimina (item 6.3). Dessa forma, foram realizados seis protocolos de imobilização em quitina, variando-se o tratamento prévio do suporte, bem como as concentrações de polietilenoimina aplicada à papaína.

A concentração de proteínas totais das soluções originais adicionadas ao suporte, bem como das soluções residuais do processo (incluindo a água utilizada na retirada do excesso dessas soluções), foi quantificada e, por diferença, determinou-se a quantidade de proteínas imobilizadas por grama de suporte (tabela 7).

Tabela 7: Quantidade de proteína imobilizada por grama de quitina, definida pela diferença de concentração das soluções adicionadas e retiradas do suporte, em função da técnica de imobilização utilizada.

	Solução adicionada ao suporte	Tratamento prévio do suporte	Quantidade de papaína imobilizada (mg de proteína/grama de quitina seca)	Quantidade de enzima imobilizada em relação à massa de suporte (%)
A)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a	-	0,12	0,01
B)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,1%	-	0,15	0,01
C)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,5%	-	0,15	0,01
D)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a	glutaraldeído a 2%	6,73	0,67
E)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,1%	glutaraldeído a 2%	21,63	2,16
F)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,5%	glutaraldeído a 2%	33,46	3,35

^a Concentração real de proteínas da solução = 5 mg/mL

Nas técnicas que não utilizaram quitina previamente tratada com glutaraldeído, a quantidade de proteína imobilizada por grama de suporte foi extremamente baixa, não perfazendo, em qualquer um dos casos, nem 0,02% da massa total do suporte. Alguns autores conseguiram taxas de retenção maiores, como SPAGNA *et al.* (2001), que obtiveram uma percentagem que variava entre 1 a 3% de α -L-rhamnospiranosidase de *Aspergillus niger*, em relação à massa total de quitina.

As metodologias que utilizaram quitina previamente tratada com glutaraldeído, por sua vez, alcançaram uma maior adsorção de proteína ao suporte. Isso pode ser explicado pelo fato de que o glutaraldeído confere um melhor desempenho ao processo

de imobilização (GASPARI *et al.*, 1999) ao promover a formação de bases de Schiff entre seus grupos aldeído e os grupos amina do suporte e da enzima (SPAGNA *et al.*, 1998). Por outro lado, MARTINS *et al.* (2006), ao trabalhar com trealase de *Escherichia coli*, atingiram um valor máximo de 0,026% de enzima imobilizada em quitina, em relação à massa de suporte, mesmo com o tratamento com glutaraldeído.

Um importante dado deve ser observado com relação à pureza do material utilizado. Nos ensaios de determinação de proteínas totais da solução original aplicada ao suporte, foi constatado que a pureza da papaína comercial utilizada era muito baixa. Verificou-se, nesse caso, que em uma solução que teria, teoricamente, 100 mg/mL de enzima, havia apenas 4,7 mg de proteína por mL, ou seja, cerca de 5% daquilo que deveria existir. Em outras palavras, foi adicionada uma solução de apenas cerca de 5 mg/mL de proteína ao suporte, em cada imobilização. Logo, a oferta de proteínas disponíveis ao suporte foi bem mais baixa que a esperada inicialmente, o que pode ter comprometido a eficácia do processo de adsorção da enzima.

A tabela 8 mostra os dados referentes à atividade enzimática das diversas etapas de cada imobilização. Fazendo uso dos dados contidos na tabela, foi possível calcular o rendimento da atividade enzimática e o rendimento simplificado de cada imobilização, por meio das equações [1] e [2], respectivamente, apresentadas no item 5.4.

Tabela 8: Atividade total da papaína em várias etapas, de acordo com cada protocolo de imobilização.

Protocolo de imobilização ^a	Atividade total da papaína (U) ^b				
	Etapas				
	Solução de papaína comercial a 100 mg/mL antes da imobilização (20mL)	Solução enzimática remanescente e removida após o processo de imersão ^c	Enzima não-imobilizada na água utilizada p/ retirada de excesso de solução – 1 ^a vez (100mL)	Enzima não-imobilizada na água utilizada p/ retirada de excesso de solução – 2 ^a vez (1000mL)	Enzima imobilizada ^d
A	355,14	215,88 (14)	74	0	1,53 (6,5)
B	481,34	333,48 (14)	136	0	0,72 (6,5)
C	416,86	122,46 (13)	148	66,7	0,43 (6,5)
D	316	132,66 (18)	48	0	0 (7,5)
E	360,94	240,79 (18)	70,3	31	0 (7,5)
F	424,46	225,54 (18)	87	0	0,1 (7,5)

^a Protocolos de acordo com os descritos na tabela 1.

^b Os valores representados são as médias de três determinações.

^c Os volumes (mL) das respectivas soluções remanescentes obtidas de cada imobilização estão indicados, entre parênteses, ao lado de cada valor na tabela.

^d Foram empregados 2 g de quitina seca em cada imobilização. As massas (g) das respectivas amostras de quitina úmida obtida de cada imobilização estão indicadas, entre parênteses, ao lado de cada valor na tabela.

Foi verificado, dessa maneira, que tanto o rendimento da atividade enzimática quanto o rendimento simplificado da papaína imobilizada foi muito baixo em qualquer uma das técnicas, como se pode observar na tabela 9. O melhor rendimento da atividade enzimática (6,04%) foi obtido pela imobilização da papaína tratada com polietilenoimina a 0,1%, seguido pela imobilização simples apenas da papaína (2,35%), ambos em suporte não tratado previamente com glutaraldeído. Já o rendimento simplificado, por sua vez, apresentou o maior valor (0,43%) com a imobilização da papaína sem polietilenoimina em quitina não-tratada. As imobilizações realizadas com o suporte previamente tratado com glutaraldeído a 2% não apresentaram rendimento algum, pois a enzima imobilizada, nesses casos, sequer apresentou alguma atividade nos ensaios de atividade proteolítica. Exceção feita ao processo no qual foi empregada solução de enzima com polietilenoimina a 0,5% sobre o suporte previamente tratado com glutaraldeído a 2%, cujo rendimento da atividade e o rendimento simplificado

foram de 0,085 e 0,022%, respectivamente, que, ainda assim, são considerados valores praticamente insignificantes. A figura 13 mostra um comparativo entre o percentual de proteína imobilizada no suporte, o rendimento da atividade enzimática e o rendimento simplificado das imobilizações. Pode se observar claramente que as técnicas que utilizaram quitina tratada com glutaraldeído tiveram uma maior adsorção de proteínas, ao passo que os melhores rendimentos foram conseguidos com o suporte não-tratado.

Tabela 9: Rendimento da atividade enzimática e rendimento simplificado da papaína imobilizada em quitina, definidos, respectivamente, pelas equações [1] e [2], apresentadas no item 5.4, em função da técnica de imobilização utilizada.

	Solução adicionada ao suporte	Tratamento prévio do suporte	Rendimento da atividade enzimática [1] da enzima imobilizada (%)	Rendimento simplificado [2] da enzima imobilizada (%)
A)	papaína comercial a 100 mg/mL	-	2,35	0,43
B)	papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1%	-	6,04	0,15
C)	papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5%	-	0,54	0,1
D)	papaína comercial a 100 mg/mL	glutaraldeído a 2%	0	0
E)	papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1%	glutaraldeído a 2%	0	0
F)	papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5%	glutaraldeído a 2%	0,08	0,02

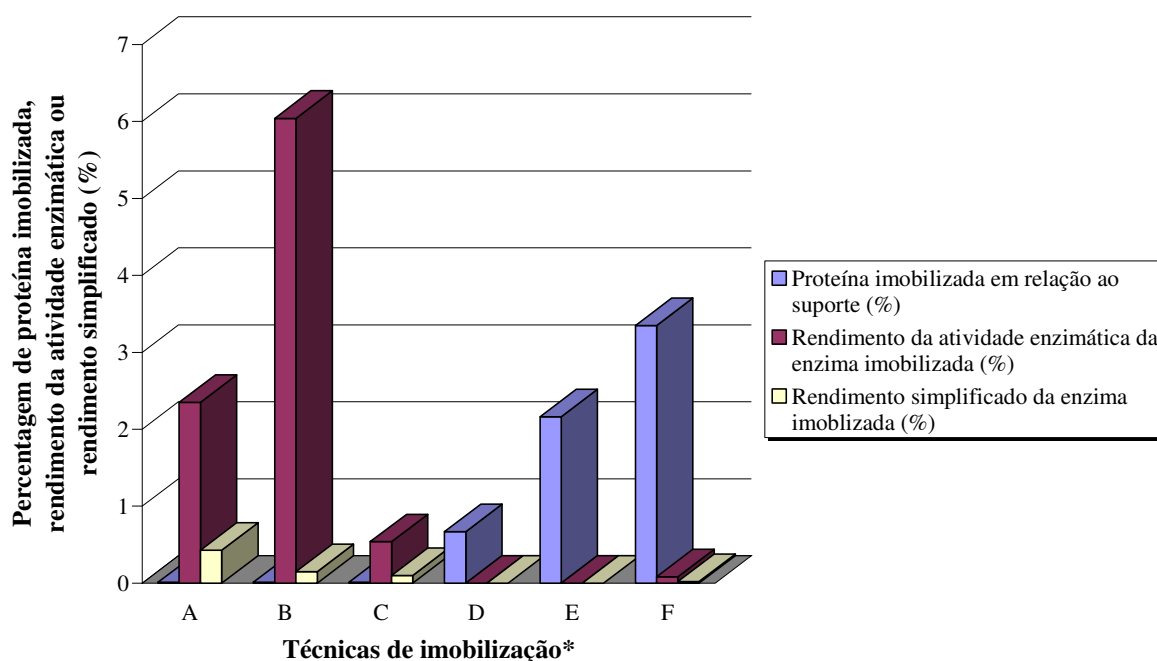


Figura 13: Percentual de proteína imobilizada em relação ao suporte, do rendimento da atividade enzimática e do rendimento simplificado das imobilizações em quitina.

*Técnicas de imobilização:

A – papaína comercial a 100 mg/mL em quitina não-tratada

B – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1% em quitina não-tratada

C – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5% em quitina não-tratada

D – papaína comercial a 100 mg/mL em quitina tratada com glutaraldeído a 2%

E – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1% em quitina tratada com glutaraldeído a 2%

F – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5% em quitina tratada com glutaraldeído a 2%

Se for considerado o cálculo de rendimento simplificado [2], a imobilização que teve o melhor desempenho foi aquela que usou apenas papaína sem polietilenoimina em quitina não-tratada. No entanto, esse cálculo apenas leva em consideração a atividade total da enzima imobilizada em relação à atividade total da enzima livre utilizada na imobilização. Essa equação não contempla, portanto, a perda de atividade nas soluções residuais do processo, que seria importante, caso se desejasse reutilizar essas soluções excedentes em novas reações de imobilização. Para tanto, utiliza-se o cálculo de rendimento da atividade enzimática [1], que computa a eficiência do processo de imobilização, considerando a atividade perdida das soluções residuais do

processo. Nesse caso, a imobilização que obteve maior rendimento de atividade enzimática foi aquela que utilizou papaína com polietilenoimina a 0,1% em quitina não-tratada.

Contudo, esses valores ainda são baixos. Por definição, pelo cálculo [1] (item 5.4), um baixo rendimento de atividade indica que houve perda dessa atividade enzimática durante o processo de imobilização, uma vez que tal cálculo nada mais é que o quociente de toda a atividade presente no suporte pela atividade teórica máxima possível (diferença entre a atividade total da enzima adicionada ao suporte e a atividade total de tudo o que foi retirado do suporte, após o processo de imobilização). Portanto, expressa a percentagem de atividade que ainda está realmente presente no suporte em relação à atividade que deveria haver. Desse modo, teoricamente, o rendimento da atividade enzimática da imobilização deveria ser de 100%, em condições ideais, não importando a quantidade de proteína presente no suporte (o cálculo não leva em consideração a quantidade de proteína que foi imobilizada, e sim, sua atividade). Assim, os baixos rendimentos de atividade em todas as metodologias de imobilização em quitina, aferidos pelo cálculo [1], apontam que houve perda de atividade enzimática no processo.

Essa perda de atividade pode ter sido causada por várias razões, mas é bastante presumível que tenha ocorrido algum dano na estrutura da enzima durante o processo de imobilização. Por outro lado, a enzima pode-se ligar de várias formas ao suporte e assim, sua atividade pode ser afetada, caso essa ligação comprometa o sítio catalítico da molécula ou dificulte a sua disponibilidade para o substrato. Sabe-se também que a polietilenoimina pode afetar a atividade da papaína, dependendo de sua concentração (tabela 6 e figura 12). Isso pode explicar o fato de a papaína imobilizada com 0,5% de polietilenoimina ter apresentado um rendimento muito inferior àquela que utilizou 0,1% do referido reagente, ou mesmo em relação a que não o utilizou (tabela 9), nas imobilizações que empregaram quitina não previamente tratada.

Os rendimentos extremamente baixos apresentados pelas técnicas que utilizaram quitina previamente tratada com glutaraldeído, em particular, mostram que o glutaraldeído, apesar de não estar presente livre na solução, mas apenas aderido à quitina, afetou significativamente a atividade da papaína de alguma forma. GASPARI *et al.* (1999), trabalhando com inulinase de *Kluyveromyces marxianus*, também se

depararam com um baixo rendimento de imobilização dessa enzima em quitina. Seus melhores resultados com tal suporte, no entanto, se deram quando este foi tratado previamente com glutaraldeído, contrastando com os resultados acima mostrados. Isso demonstra que cada enzima, em particular, pode apresentar diferentes sensibilidades ao glutaraldeído. Por outro lado, CETINUS e OZTOP (2003) perceberam que o glutaraldeído, utilizado no tratamento da quitosana para a imobilização de catalase, reduz a atividade enzimática e pode dificultar o contato da enzima com o substrato. A mudança na afinidade da enzima por seu substrato é provavelmente causada por mudanças estruturais na enzima, introduzidas pelo processo de imobilização, ou pela baixa acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada (CHANG; HUANG, 2005).

Da mesma forma, FERREIRA *et al.* (2003), trabalhando com imobilização de alcalase em sílica, constataram que, apesar de haver mais proteína ligada ao suporte, a atividade específica da enzima diminuía conforme era aumentada a concentração de glutaraldeído no processo, ou quando se aumentava o tempo de exposição da enzima ao glutaraldeído durante a reação de imobilização. O mesmo fora atestado por SYNOWIECKI *et al.* (1987), trabalhando com quitina. Isso se dá, provavelmente, pelo fato de que as moléculas de enzima podem ser imobilizadas neste tipo de suporte com diferentes orientações, tornando o sítio ativo de algumas delas inacessível para grandes substratos (TARDIOLI *et al.*, 2003 a e b). Também, nesse caso, podem ser formadas múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações excessivas das moléculas no interior dos poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (SOBRAL *et al.*, 2002 e 2003).

Por outro lado, ao observar a atividade específica da enzima (atividade da enzima por miligrama de proteína na amostra – U/mg), verifica-se que o desempenho da enzima imobilizada foi satisfatório em relação ao da enzima livre nas técnicas que não empregaram tratamento prévio da quitina com glutaraldeído (tabela 10 e figura 14). Na imobilização em quitina não-tratada, na qual não houve adição de polietilenoimina à enzima, a atividade específica da enzima imobilizada foi ainda maior que a da enzima livre. Isso pode ter ocorrido pelo fato de haver muitas impurezas na amostra original de papaína, e a imobilização, nesse caso, pode ter efetuado uma purificação parcial da amostra, ao selecionar preferencialmente a proteína enzimática em questão para a adesão ao suporte. Como já supracitado, cabe reforçar que a concentração de proteínas

da amostra original de papaína utilizada era de cerca de 5% da massa da amostra, isto é, uma solução que, teoricamente, teria 100 mg/mL de enzima, tinha, na verdade, apenas cerca de 5 mg/mL de proteínas, indicando a baixa pureza da amostra de papaína utilizada (Vetec Química Fina LTDA - 6000 U.E./mg). Outro possível motivo que relaciona a baixa pureza da amostra e a maior atividade específica da enzima imobilizada seria a inibição da enzima por substâncias presentes na amostra que funcionariam como inibidores ou competidores da atividade enzimática. Ao se imobilizar apenas as moléculas de interesse (enzimas, no caso), elimina-se a presença desses possíveis inibidores, aumentando, dessa forma, a atividade da enzima. Um terceiro motivo para a maior atividade específica da enzima imobilizada, nesse caso, é o fato de a imobilização em si promover uma maior estabilidade à estrutura da molécula de enzima. A presença de ligações covalentes inter e intramoleculares na enzima e entre a enzima e o suporte confere rigidez à estrutura protéica secundária e terciária das enzimas, reduzindo sua taxa de desnaturação, o que as torna menos sujeitas à perda de atividade por variação de temperatura, pH, presença de inibidores ou outros fatores (MOZHAEV; MARTINEK, 1990; MOZHAEV, 1993; ZABORSKA, 1995).

Pode-se observar também, nas imobilizações que não utilizaram quitina tratada, que a atividade específica da enzima imobilizada diminui conforme se aumenta a concentração de polietilenoimina aplicada à papaína, destacando mais uma vez seu papel na redução da atividade dessa enzima. Da mesma forma, observa-se a redução drástica da atividade específica da enzima imobilizada em suporte tratado com glutaraldeído, confirmando sua ação inibitória sobre a atividade da papaína, como já fora demonstrado por FERREIRA *et al.*, (2003).

Tabela 10: Atividade específica (U/mg) da papaína comercial livre adicionada ao suporte e imobilizada em quitina, nas diversas técnicas de imobilização utilizadas.

	Solução adicionada ao suporte	Tratamento prévio do suporte	Atividade específica da enzima livre adicionada ao suporte (U/mg)	Atividade específica da enzima imobilizada (U/mg)
A)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a	-	3,55	6,38
B)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,1%	-	4,81	2,42
C)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,5%	-	4,17	1,41
D)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a	glutaraldeído a 2%	3,16	0
E)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,1%	glutaraldeído a 2%	3,61	0
F)	papaína comercial a 100 mg/mL ^a + polietilenoimina a 0,5%	glutaraldeído a 2%	4,24	0

^a Concentração real de proteínas da solução = 5 mg/mL

Dessa forma, as atividades específicas referentes a algumas imobilizações mostram que a técnica é promissora, caso seja aperfeiçoada. As atividades totais e os rendimentos das imobilizações apresentadas, no entanto, não permitem ainda que as técnicas sejam aplicadas em escala industrial. O problema, nesse caso, seria a grande quantidade de suporte necessária para desflocular o fermento, uma vez que a quantidade de enzima aderida à quitina (0,0148% da massa de suporte), bem como a atividade volumétrica da papaína imobilizada (0,11 U/g de suporte), foram muito baixas. Isso faz com que sejam necessários por volta de 7,5 g de quitina para cada mL de fermento a ser tratado, o que é inviável para os processos de tratamento do fermento utilizados atualmente. Caso a técnica seja aperfeiçoada e um sistema de reator em coluna puder ser desenvolvido, por onde o fermento passaria com um fluxo constante

em leito fixo de suporte (SHI-JUN *et al.*, 1996), com tempo de retenção suficiente para a completa desfloculação, ter-se-á, assim, uma alternativa viável ao tratamento ácido atualmente praticado.

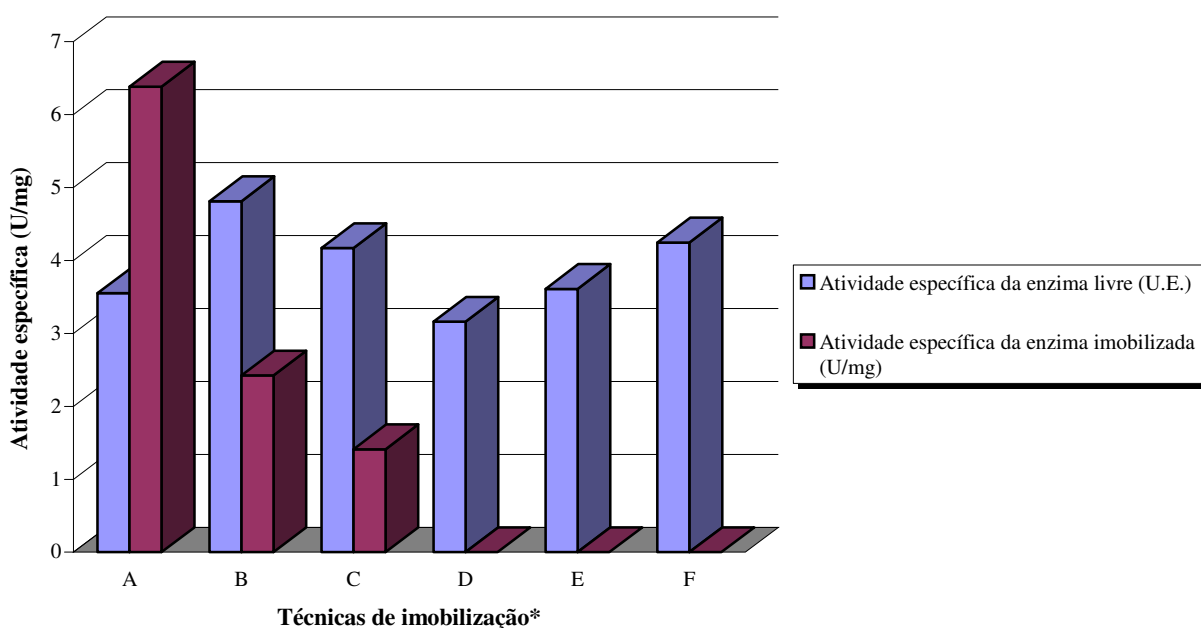


Figura 14: Atividade específica da enzima livre adicionada ao suporte e da enzima imobilizada, nas diversas imobilizações em quitina.

*Técnicas de imobilização:

A – papaína comercial a 100 mg/mL em quitina não-tratada

B – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1% em quitina não-tratada

C – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5% em quitina não-tratada

D – papaína comercial a 100 mg/mL em quitina tratada com glutaraldeído a 2%

E – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,1% em quitina tratada com glutaraldeído a 2%

F – papaína comercial a 100 mg/mL + polietilenoimina a 0,5% em quitina tratada com glutaraldeído a 2%

Ademais, a metodologia que obteve o melhor desempenho (6,04% de rendimento) deveria ter sua atividade catalítica reutilizada apenas 16 vezes para, ao menos, abater os custos com a enzima, caso se assumisse que a mesma não pudesse ser reaproveitada do sobrenadante e da água utilizada para a retirada do seu excesso do suporte, o que não é verdade. No entanto, como não foi feita a reutilização da enzima imobilizada em suportes sólidos, não é possível afirmar que as perdas com o processo poderiam ser compensadas pela eficiência da técnica por meio dos métodos de reutilização.

Essa pesquisa sugere que novos estudos devem ser feitos para se reaproveitar a enzima não imobilizada no suporte, tornando a tecnologia mais viável economicamente. Além do mais, torna-se indispensável a elaboração de soluções que contemplem um aumento na eficiência ou rendimento da imobilização, minimizando a perda de atividade enzimática durante ou após o processo.

O emprego de quitosana como suporte para a imobilização seria uma opção na tentativa de se aumentar a quantidade de enzima adsorvida ao suporte. A quitosana, que é um polímero policatiônico derivado da própria quitina, tem maior afinidade por proteínas que sua precursora, por apresentar um maior número de grupos amina livres reativos em sua molécula (HIRANO, 1996; MONTEIRO-JUNIOR; AIROLDI, 1999). SPAGNA *et al.* (1998), que realizaram imobilizações em quitosana, conseguiram um rendimento médio de adsorção da enzima de 25% a 30%, por exemplo. No entanto, essa maior quantidade de grupos amina livres reativos e, sobretudo, o menor teor de grupos N-acetil (< 40%), também confere maior solubilidade à quitosana em soluções com pH abaixo de 6,5 (KNORR, 1983; ANTHONSEN *et al.*, 1993; YAZDANI-PEDRAM; LAGOS, 1995). Essa propriedade não é desejável, uma vez que o meio de tratamento do fermento possui pHs baixos, que gira em torno de 2,0 no tratamento ácido e cerca de 4,5 a 5,0 nas dornas (BOVI; MARQUES, 1983), e a insolubilidade do suporte é uma condição imprescindível para o sucesso da aplicação da enzima imobilizada. Nesse caso, realiza-se um tratamento da quitosana com glutaraldeído ou tripolifosfato para promover a formação de ligações inter cruzadas entre as moléculas e, conseqüentemente, a redução da solubilização em meios ácidos (COCHRANE *et al.*, 1996; OSWALD *et al.*, 1998; KRAJEWSKA, 2004).

Mesmo assim, foi conduzido um ensaio de desfloculação, empregando-se 2 g de suporte por taça de fermento (50 mL), cujos resultados estão na tabela 11 e na figura 15. Nesse caso, utilizou-se quitina não-tratada com glutaraldeído, a qual permaneceu em contato com papaína comercial a 100 mg/mL por 2 h. Esse foi o protocolo de imobilização escolhido por ter apresentado a maior atividade no suporte, após a imobilização. Pela pequena quantidade de suporte utilizado no ensaio, o fermento tratado com a enzima imobilizada não apresentou diferenças significativas para $p < 0,05$, em relação ao controle (sem tratamento). Com 120 minutos de reação, tanto o fermento tratado com a enzima imobilizada quanto o controle, apresentaram cerca de 5% de desfloculação, enquanto que o fermento tratado com papaína comercial livre a 4mg/mL apresentava mais de 60% de desfloculação. Esses resultados já eram esperados, pois, nas condições determinadas pela imobilização, seriam necessários cerca de 7,5 g de suporte para cada mL de fermento para uma satisfatória desfloculação, o que é inviável, como já supracitado.

Tabela 11: Efeito da papaína comercial livre a 4 mg/mL e imobilizada em quitina não-tratada (protocolo “A” – tabela 1), na desfloculação celular de *S. cerevisiae* flocculado.

Tratamento	Tempo (min.)	Turbidez (600nm) Repetições			Média ± SD
		1	2	3	
controle (sem tratamento)	15	13,70	14,60	14,05	14,12 ± 0,45
	40	16,00	16,50	16,75	16,42 ± 0,38
	70	16,50	15,85	16,25	16,20 ± 0,33
	120	17,50	17,30	16,90	17,23 ± 0,30
papaína comercial livre (4 mg/mL)	15	12,25	12,85	11,40	12,16 ± 0,73
	40	26,90	21,55	25,57	24,67 ± 2,78
	70	69,30	70,35	73,95	71,20 ± 2,44
	120	75,80	82,05	76,70	78,18 ± 3,38
papaína imobilizada em quitina ¹ (protocolo “A”)	15	11,50	14,10	14,50	13,37 ± 1,63
	40	17,45	16,80	16,75	17,00 ± 0,39
	70	17,25	15,90	16,25	16,47 ± 0,70
	120	18,45	17,90	18,20	18,18 ± 0,27

¹ Utilizados 2 g de suporte por taça (50 mL)

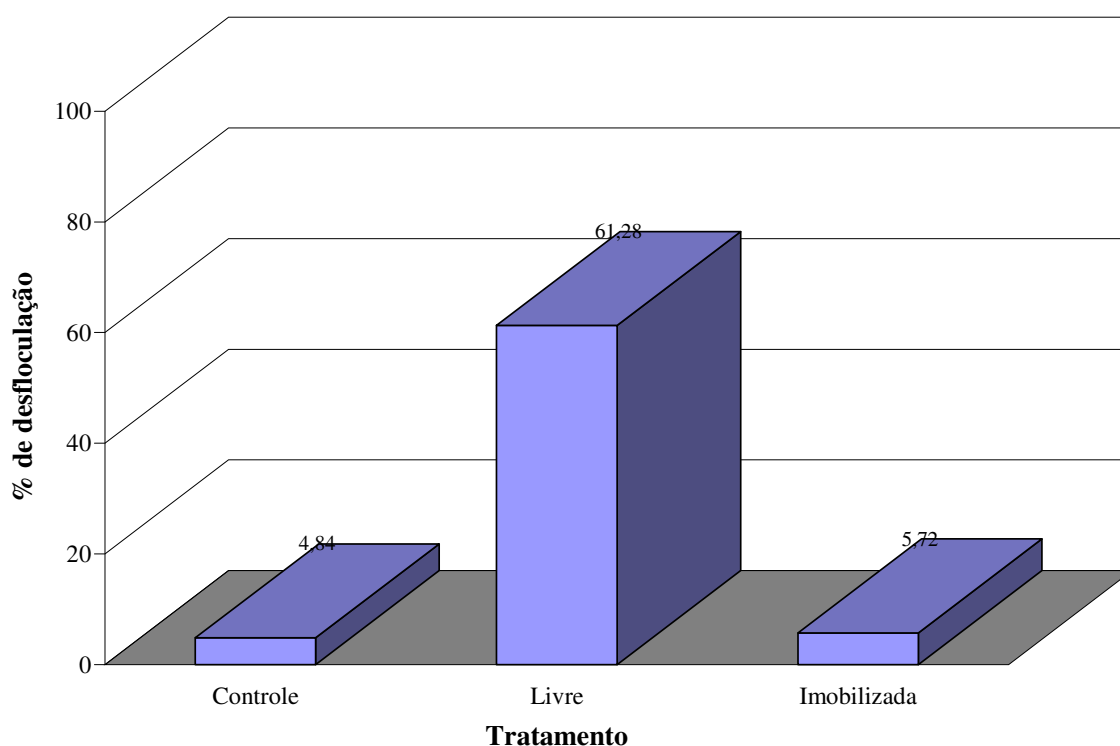


Figura 15: Porcentagem de desfloculação celular do fermento de destilaria em função do tratamento com papaína comercial livre (4 mg/mL) e papaína imobilizada (sem polietilenoimina) em quitina não tratada com glutaraldeído (2 g de suporte), com 120 minutos de reação.

6.5. Imobilização da papaína em celulose de bagaço de cana

Os dados referentes às atividades totais de cada etapa da imobilização enzimática em celulose estão apresentados na tabela 12. A quantidade total de proteínas da solução aplicada ao suporte e das soluções remanescentes (incluindo a água utilizada para a retirada do excesso de solução) também foi quantificada, e, por diferença, determinou-se a concentração de proteínas adsorvidas ao suporte, que foi de 0,435 mg de proteína por grama de celulose, o equivalente a 0,0435% da massa do suporte, que é um valor extremamente baixo se considerarmos alguns dados da literatura, tais como os de LI *et al.* (2007), que conseguiram reter cerca de 2,3% (em relação à massa de suporte) de papaína em celulose sob a forma de algodão industrializado. A baixa quantidade de proteínas aderidas ao suporte pode ter sido consequência de um possível insucesso na etapa de oxidação do bagaço, que é realizada para a formação dos grupos

aldeído reativos na molécula de celulose (item 4.4.2), os quais não foram quantificados nesse trabalho.

Tabela 12: Atividade total da papaína em várias etapas durante o processo de imobilização em celulose.

Etapa	Atividade total da papaína (U)^a
Solução de enzima antes da imobilização (30mL)	440,01
Solução enzimática remanescente removida após o processo de imersão (17mL)	199,41
Enzima não-imobilizada na água utilizada p/ retirada de excesso de solução (100mL)	5
Enzima imobilizada (10g de suporte) ^b	1,5

^a Os valores representados são as médias de três determinações

^b Foi utilizado 1 g de celulose em massa seca. O valor indicado na tabela refere-se à massa de suporte em base úmida.

Ademais, o rendimento da atividade enzimática e o rendimento simplificado, calculados com os dados da tabela 12 pelas equações [1] e [2], respectivamente, apresentadas no item 5.4, foram de 0,64 e 0,34%. Esses valores contrastam com o rendimento da atividade conseguido por VARAVINIT *et al.* (2002), que foi de 44%, trabalhando com α -amilase termoestável. Isso indica que houve perda da atividade total da enzima imobilizada, durante ou após o processo de imobilização. Por outro lado, levando-se em conta a diminuta quantidade de proteína aderida ao suporte, a atividade específica da enzima imobilizada (3,45 U/mg) foi maior que a da enzima livre adicionada ao suporte (2,93 U/mg). Isso também ocorreu em uma das imobilizações em quitina (item 6.4) e, da mesma forma, pode ser justificado pelo fato da técnica ter, possivelmente, eliminado algumas impurezas da solução enzimática selecionando, preferencialmente, mais moléculas de enzima para a imobilização, como um processo de purificação. Isso eliminaria também o problema de uma possível inibição da enzima por moléculas presentes na amostra original que, como determinado neste trabalho, apresentou um grau de pureza muito baixo. Além disso, sabe-se que a imobilização promove uma maior estabilidade à molécula de enzima, minimizando a perda de sua

atividade catalítica por fatores externos (MOZHAEV; MARTINEK, 1990; MOZHAEV, 1993; ZABORSKA, 1995).

No entanto, apesar de as atividades específicas apresentadas apontarem para um possível resultado positivo, caso a técnica seja aperfeiçoada, o baixo rendimento apresentado, assim como nas imobilizações em quitina, não é suficiente para justificar a utilização da metodologia em escala industrial atualmente. Além do mais, nessas condições, seriam necessários mais de 5 g de suporte com enzima imobilizada para cada mL de suspensão de fermento floculado a ser tratado, quantidade inviável nas condições do ensaio de desfloculação proposto nesse trabalho. Nesse caso, a otimização da técnica de imobilização, visando, sobretudo, uma maior adesão de moléculas de enzima ao suporte, é imprescindível para sua aplicação na indústria.

Ainda assim, foi conduzido um ensaio de desfloculação, utilizando-se 2 g de suporte por taça de fermento (50 mL), cujos resultados estão na tabela 13 e na figura 16. Como era esperado, não houve desfloculação do fermento por parte da enzima imobilizada, a qual não apresentou resultados significativos em relação ao controle para $p < 0,05$, mesmo no tempo máximo da reação (120 minutos), quando a enzima imobilizada alcançou apenas 1,14% de desfloculação. O inverso ocorreu com a papaína comercial livre a 4 mg/mL, que atingiu praticamente a total desfloculação (98,64%) em 120 minutos de reação.

Tabela 13: Efeito da papaína comercial livre a 4 mg/mL e imobilizada em celulose (bagaço de cana), na desfloculação celular de *S. cerevisiae* floculado.

Tratamento	Tempo (min.)	Turbidez (600nm)			Média ± SD
		Repetições			
		1	2	3	
controle (sem tratamento)	15	11,50	11,55	11,85	11,63 ± 0,19
	40	12,20	12,45	12,30	12,32 ± 0,13
	70	12,05	12,25	12,50	12,27 ± 0,22
	120	12,05	11,70	12,70	12,15 ± 0,51
papaína comercial livre (4 mg/mL)	15	10,50	10,30	10,55	10,45 ± 0,13
	40	74,52	70,65	67,05	70,74 ± 12,45
	70	92,70	119,4	105,2	105,8 ± 13,36
	120	115,2	120,6	119,8	118,5 ± 2,91
papaína imobilizada em celulose ¹ (bagaço de cana)	15	11,55	11,65	12,00	11,73 ± 0,24
	40	11,75	12,25	12,35	12,12 ± 0,32
	70	11,90	12,15	12,20	12,08 ± 0,16
	120	13,50	12,95	13,25	13,23 ± 0,27

¹ Utilizados 2 g de suporte, em base úmida, por taça (50 mL)

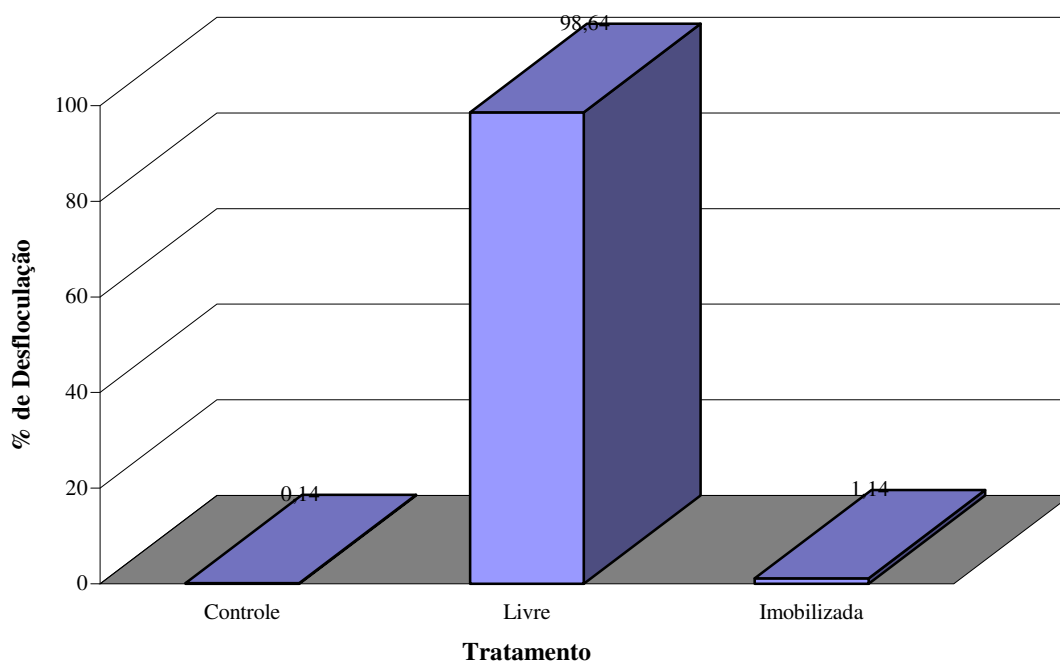


Figura 16: Porcentagem de desfloculação celular do fermento de destilaria em função do tratamento com papaína comercial livre (4 mg/mL) e papaína imobilizada em celulose (2 g de suporte – base úmida), com 120 minutos de reação.

6.6. Reciclo da enzima solúvel na suspensão de leveduras para desfloculação celular

A estabilidade da papaína livre, bem como a estabilidade dessa enzima associada ao dodecil sulfato de sódio (SDS), foi testada considerando-se o número de vezes que essas soluções enzimáticas conseguiram desflocular completamente vários lotes de fermento floculado. Dessa forma, o fermento floculado foi tratado com uma solução de papaína comercial a 4 mg/mL (tratamento 2) e com solução de papaína comercial a 4 mg/mL com SDS a 10 µg/mL (tratamento 3), com os quais foram alcançados 14 ciclos de reutilização da atividade desfloculante da papaína, como mostrado resumidamente nas tabelas 14a e 14b e na figura 17.

Os ciclos foram conduzidos até que se observasse a completa desfloculação do fermento ou que se chegasse próximo disso, o que, de uma forma geral, ocorreu em apenas 15 minutos de reação até o oitavo ciclo. Exceção feita no terceiro ciclo, quando o experimento teve de ser conduzido até 40 minutos, uma vez que, com 15 minutos de reação, obteve-se apenas 56,7 e 60% de desfloculação com os tratamentos 2 e 3, respectivamente, embora a diferença destes em relação ao controle já se mostrasse bastante significativa (ANOVA $F=22,062$ e Tukey $p<0,01$). Situações semelhantes ocorreram a partir do nono ciclo, mostrando que, a partir desse ponto, a estabilidade da atividade enzimática começa a diminuir, mesmo com a reposição do volume de solução enzimática perdido a cada ciclo. Tal reposição foi de 4,95 e 4,13% por ciclo, em média, para os tratamentos 2 e 3, respectivamente, em relação ao volume final original da suspensão.

No décimo segundo ciclo, a reação teve de ser conduzida até 70 minutos para se obter uma completa desfloculação do fermento, enquanto que, nos ciclos subseqüentes, a reação foi conduzida até 120 minutos, tempo máximo em que o fermento permanece no pé-de-cuba para o tratamento ácido nas destilarias (BOVI; MARQUES, 1983). Dessa forma, o ensaio finalizou-se no décimo quarto ciclo, quando as soluções enzimáticas referentes aos dois tratamentos não foram mais capazes de desflocular completamente o fermento no tempo máximo de 2 h de reação, alcançando apenas 61,45 e 68,18% de desfloculação para os tratamentos 2 e 3, respectivamente. Além do mais, a diferença da turbidez dos sobrenadantes dos fermentos tratados em relação ao controle não foi significativa para $p < 0,05$ (ANOVA $F=2,774$), mostrando que as

soluções enzimáticas de ambos os tratamentos perderam a atividade no décimo quarto ciclo de desfloculação do fermento.

Ademais, pôde-se observar que o tratamento 3, o qual empregava 10 µg/mL de SDS, teve um desempenho ligeiramente maior que o tratamento 2, na maioria das vezes. No entanto, nenhuma diferença de turbidez entre os dois tratamentos foi significativa estatisticamente para $p < 0,05$, não justificando, portanto, a utilização do SDS no processo. As figuras 18, 19, 20 e 21 mostram o grau de floculação do fermento em alguns dos ciclos, em função do tratamento utilizado.

Tabela 14a: Efeito das soluções de papaína comercial a 4 mg/mL (tratamento 2) e de papaína comercial a 4 mg/mL com SDS a 10 µg/mL (tratamento 3), na desfloculação celular de *S. cerevisiae* floculado, em função do número de ciclos de reutilização das soluções (ciclos 0 a 9).

Número de ciclos	Tempo de reação (min.)	Turbidez (600nm) ^a		
		Tratamento ^b		
		1	2	3
0	15	23,80 ± 0,87	126,4 ± 4,98	122,6 ± 1,22
1	15	30,54 ± 1,72	122,7 ± 14,22	109,4 ± 10,85
2	15	20,47 ± 3,14	110,8 ± 6,87	125,8 ± 10,82
3	15	35,70 ± 1,23	73,26 ± 14,35	83,34 ± 7,04
	40	58,37 ± 1,44	119,9 ± 12,12	140,1 ± 19,66
4	15	31,06 ± 4,93	117,2 ± 23,38	127,1 ± 15,86
5	15	24,31 ± 1,57	109,1 ± 3,63	122,2 ± 5,38
6	15	23,37 ± 1,22	106,4 ± 7,17	116,3 ± 9,00
7	15	18,06 ± 1,01	136,7 ± 7,90	141,9 ± 5,21
8	15	29,40 ± 5,93	162,4 ± 5,30	163,3 ± 5,21
	40	19,00 ± 0,76	113,6 ± 2,19	127,8 ± 17,23

^a Os valores representados são a média de três determinações (± SD)

^b Tratamento: 1. Controle (sem tratamento)

2. Solução de papaína comercial a 4 mg/mL

3. Solução de papaína comercial a 4 mg/mL + SDS a 10 µg/mL

Tabela 14b: Efeito das soluções de papaína comercial a 4 mg/mL (tratamento 2) e de papaína comercial a 4 mg/mL com SDS a 10 µg/mL (tratamento 3), na desfloculação celular de *S. cerevisiae* flocculado, em função do número de ciclos de reutilização das soluções (ciclos 10 a 14).

Número de ciclos	Tempo de reação (min.)	Turbidez (600nm) ^a		
		Tratamento ^b		
		1	2	3
10	15	27,70 ± 2,40	68,65 ± 7,70	71,91 ± 10,86
	40	42,15 ± 3,13	112,7 ± 12,19	122,0 ± 4,77
11	15	26,67 ± 1,53	22,69 ± 3,50	20,64 ± 3,76
	40	28,28 ± 6,76	112,1 ± 8,59	116,2 ± 13,35
12	15	49,21 ± 15,63	66,09 ± 3,86	79,00 ± 16,25
	40	47,81 ± 0,52	87,82 ± 8,30	78,10 ± 8,08
	70	27,19 ± 3,21	121,8 ± 6,25	113,4 ± 0,99
13	15	43,90 ± 1,64	41,91 ± 3,91	44,01 ± 5,08
	40	54,83 ± 6,48	65,05 ± 5,77	71,49 ± 6,39
	70	53,80 ± 4,01	76,51 ± 6,91	105,2 ± 6,72
	120	78,09 ± 3,00	113,7 ± 7,02	123,8 ± 14,88
14	15	61,17 ± 7,54	38,28 ± 21,54	18,20 ± 6,65
	40	37,54 ± 2,10	32,27 ± 3,76	28,09 ± 5,42
	70	25,36 ± 9,19	41,43 ± 16,90	28,67 ± 1,23
	120	36,73 ± 5,61	78,37 ± 30,22	85,64 ± 36,26

^a Os valores representados são a média de três determinações (± SD)

^b Tratamento: 1. Controle (sem tratamento)

2. Solução de papaína comercial a 4 mg/mL

3. Solução de papaína comercial a 4 mg/mL + SDS a 10 µg/mL

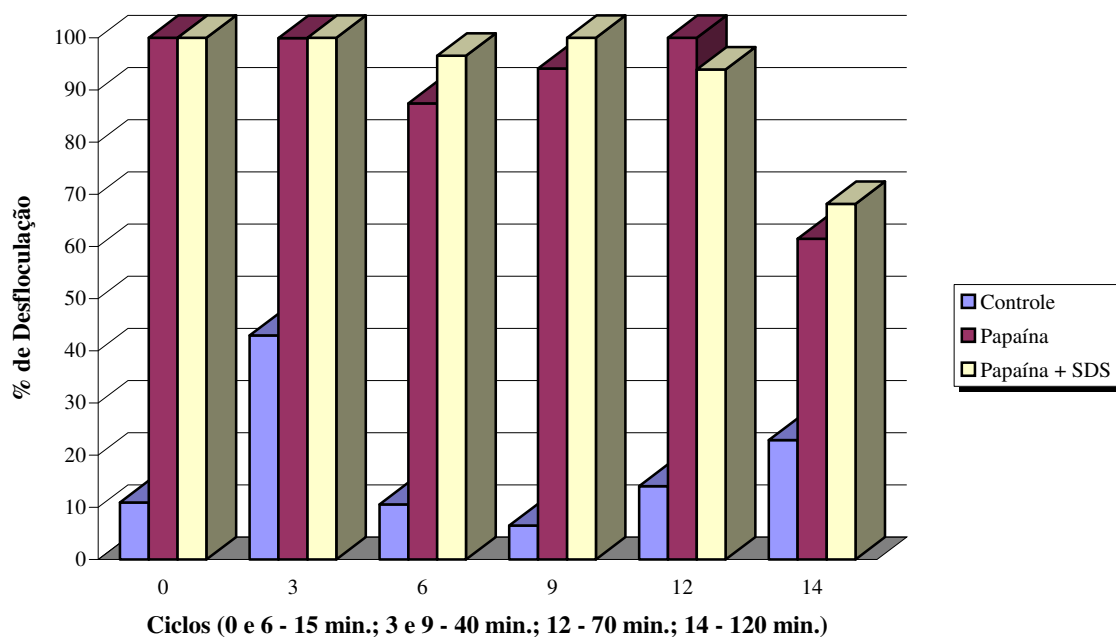


Figura 17: Porcentagem de desflocação da suspensão de fermento flocculado de destilaria a 30% (m/v), tratada com soluções de papaína comercial a 4 mg/mL e de papaína comercial a 4 mg/mL com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 µg/mL, em vários ciclos de reutilização da atividade catalítica da enzima.



Figura 18: Fotografia do fermento tratado com papaína comercial a 4 mg/mL (B) e papaína comercial a 4 mg/mL + SDS a 10 μ g/mL (C) em 15 minutos de reação, no ciclo 0. A = controle.



Figura 19: Fotografia do fermento tratado com papaína comercial a 4 mg/mL (B) e papaína comercial a 4 mg/mL + SDS a 10 μ g/mL (C) em 15 minutos de reação, no ciclo 4. A = controle.



Figura 20: Fotografia do fermento tratado com papaína comercial a 4 mg/mL (B) e papaína comercial a 4 mg/mL + SDS a 10 µg/mL (C) em 40 minutos de reação, no ciclo 10. A = controle.



Figura 21: Fotografia do fermento tratado com papaína comercial a 4 mg/mL (B) e papaína comercial a 4 mg/mL + SDS a 10 µg/mL (C) em 120 minutos de reação, no ciclo 14. A = controle.

Tal método pode ser aproveitado na indústria, guardando-se as devidas proporções e ajustes. É possível se realizar um tratamento enzimático da mesma forma que se faz o tratamento ácido (nas dornas de tratamento do fermento ou “pé-de-cuba”) e efetuar a recuperação dessa enzima por meio de uma centrifugação, na qual se separaria o fermento do líquido de suspensão, onde está dissolvida a enzima, para seu reaproveitamento em outro lote de fermento floculado. Todavia, as centrífugas industriais não conseguem separar toda a massa úmida de fermento do líquido de suspensão, o que implicaria em uma perda maior de enzima em cada centrifugação.

A suspensão de fermento que chega à cuba de tratamento (chamada, na indústria, de “creme de fermento”), proveniente da centrifugação do vinho levedado (mosto fermentado com leveduras, oriundo das dornas de fermentação), tem uma concentração aproximada de 14% de sólidos (fermento em massa seca). Ao chegar à cuba de tratamento, é adicionada a essa suspensão uma solução que, no tratamento atual, se constitui basicamente de água e H_2SO_4 . Pela técnica proposta neste trabalho, essa solução seria substituída por uma solução enzimática tamponada. Visto que a adição dessa solução se faz numa proporção de 2:1 (solução:suspensão de fermento), a concentração de sólidos na suspensão cai para aproximadamente 4,7% na cuba onde se processa o tratamento. Terminado o tratamento com a completa desfloculação das leveduras, essa suspensão seria novamente centrifugada para separar a solução enzimática (que seria reutilizada em um novo lote de fermento floculado) da suspensão de células. Contudo, as centrífugas industriais utilizadas nesse processo não são capazes de separar totalmente o fermento do líquido de suspensão. Nesse caso, separam do líquido (fase leve) uma suspensão com, no máximo, 14% de sólidos (fase pesada). Sendo assim, do volume total de suspensão retirada da etapa de tratamento, apenas cerca de 66% do volume total (ou 70% do volume total de líquido, sem contar os sólidos) seria recuperado, sob a forma de solução enzimática, para a sua imediata reutilização na cuba. O restante desse volume (aproximadamente 33% do volume total, ou 30% do volume de líquido) iria para as dornas de fermentação como suspensão de fermento (a qual ainda conteria parte da enzima).

No entanto, essa solução enzimática que sai junto com o fermento para as dornas de fermentação não seria totalmente perdida, uma vez que ela ainda permaneceria no processo. Posteriormente, parte dessa solução retornaria para a cuba

de tratamento juntamente com o fermento, que é centrifugado ao término da fermentação. Dessa forma, as perdas com a solução enzimática se resumiriam à alíquota que sai do processo juntamente com o vinho delevurado (sobrenadante da fermentação), o qual vai para a destilação. Esse valor pode ser calculado por meio da seguinte equação:

$$[3] \text{ Perda final de solução por ciclo (\%)} = 100 \times A \times (1 - B)$$

Na qual A é a taxa de líquido perdida para a dorna após a centrifugação da suspensão oriunda da cuba de tratamento e B é a taxa líquido recuperada com o fermento, após a centrifugação, no final do processo de fermentação.

O vinho levurado que vai para as centrífugas, após a fermentação, tem uma concentração aproximada de 3,7% de sólidos. Como já discutido, considerando que a centrífuga utilizada nesse processo permite a separação da fase pesada (que contém o fermento) com uma concentração máxima de 14% de sólidos, cerca de 73,6% do volume total (ou 76,4% do volume de líquido) do vinho levurado sai como fase leve e vai para a destilaria. Aproximadamente 26,4% do volume total de vinho levurado (considerando o volume de sólidos), ou 23,6% do volume de líquido retornam para a cuba de tratamento. Assim, a perda final do volume de solução de enzima aplicada a cada ciclo, de acordo com a equação [3], seria de aproximadamente 23%. A representação esquemática desse processo pode ser observada na figura 22.

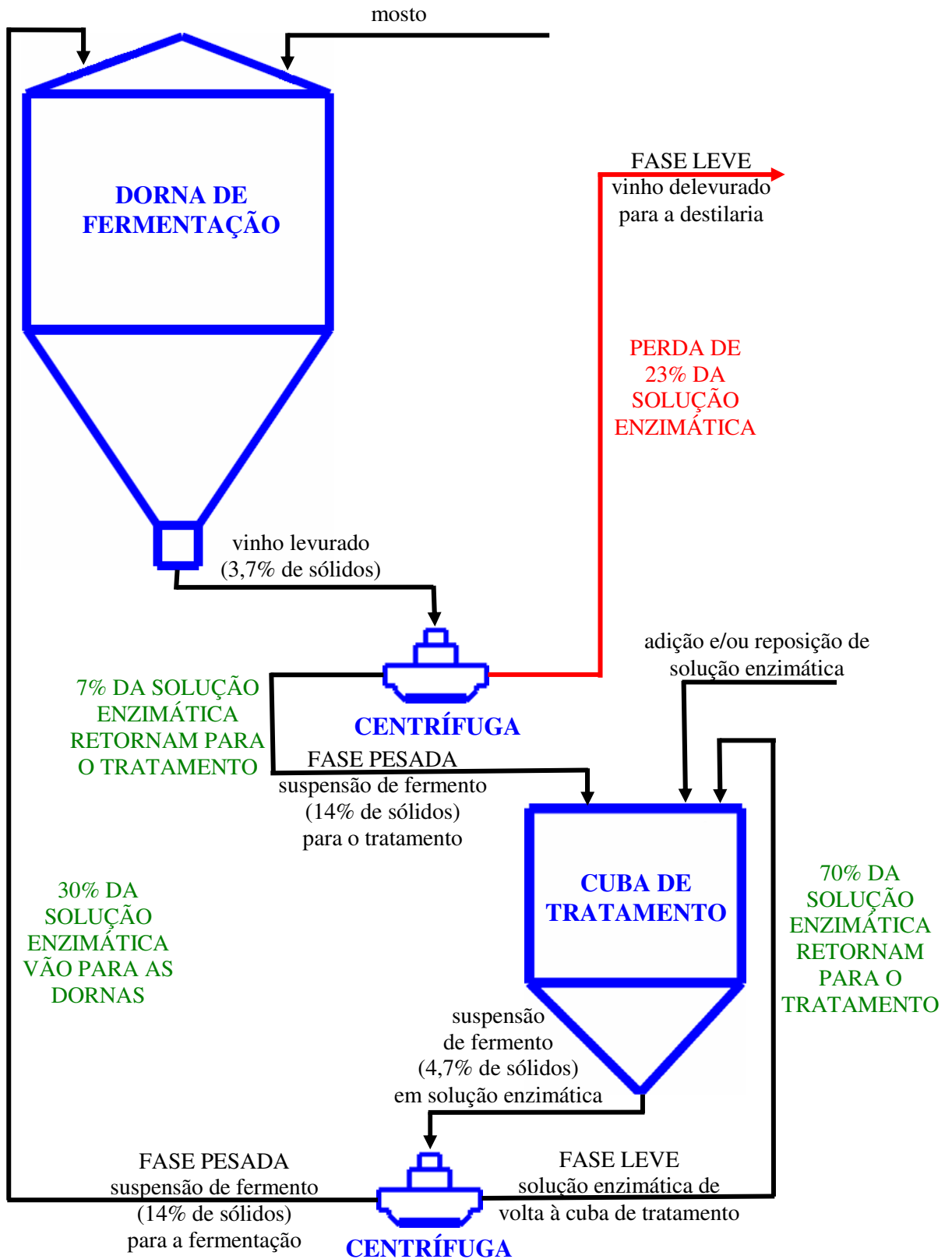


Figura 22: Fluxograma simplificado do reciclo de enzima solúvel para o tratamento de leveduras na indústria de álcool.

É evidente que o tratamento enzimático tem um custo maior que o tratamento ácido, que é bastante econômico (menos de R\$1,00 o quilo de ácido concentrado). Essa técnica, no entanto, seria utilizada em casos nos quais o tratamento ácido não é suficiente ou ineficiente. Isso ocorre quando as leveduras apresentam uma floculação superior a 80%. Nesses casos, um tratamento enzimático seria fundamental, pois o tratamento ácido nessas condições não é eficaz, já que um aumento da acidez, com conseqüente diminuição do pH até valores de 1,9 a 2,0, além de não remover os flocos, prejudica a viabilidade do fermento, a qual já está comprometida. Além das vantagens do uso de enzimas nessas condições quanto à sensibilidade do fermento à acidez, há também o fato de que cada célula que foi desfloculada enzimaticamente se manterá livre na suspensão, independente do pH. Em outras palavras, o fermento desfloculado pela ação enzimática não voltará a flocular (NISHIHARA, 1977), o que contribui para a reversão do problema a curto prazo.

7. CONCLUSÕES

7.1. Concentrações de papaína necessárias para a desfloculação completa do fermento não afetam a viabilidade das leveduras.

7.2. O glutaraldeído afeta a atividade proteolítica da papaína em qualquer concentração maior ou igual a 0,05%, mesmo com pouco tempo de contato. Da mesma forma, concentrações maiores ou iguais a 1% de polietilenoimina interferem na atividade proteolítica da papaína.

7.3. As técnicas de imobilização de papaína em quitina testadas apresentaram uma reduzida concentração de proteínas aderidas ao suporte (com exceção daquelas que utilizaram quitina tratada com glutaraldeído), bem como um rendimento muito baixo, dificultando a aplicação da técnica em escala industrial. Esses resultados, no entanto, sugerem a utilização de outros suportes que podem apresentar maior eficácia no processo.

7.4. O maior rendimento de atividade da enzima imobilizada se deu com a quitina tratada apenas com solução de papaína e polietilenoimina a 0,1%. A maior atividade total no suporte, bem como a maior atividade específica, ocorreu com a imobilização da papaína em quitina não-tratada.

7.5. O glutaraldeído aderido ao suporte, mesmo depois de lavado, leva à inativação da atividade da papaína.

7.6. A imobilização em celulose tratada com ácido periódico, nas condições avaliadas também apresenta um baixo rendimento de atividade proteolítica no suporte, o que inviabiliza sua utilização em escala industrial.

7.7. A utilização papaína solúvel na suspensão de leveduras e recuperada por centrifugação provoca a total desfloculação do fermento de usina por 14 vezes. Essa técnica deve ser avaliada em estudos futuros para possível aplicação industrial.

7.8. O SDS não potencializou a desfloculação do fermento de destilaria quando associado ao tratamento com papaína.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAZINGE, M. D. A.; FONTENOT, J. P.; ALLEN, V. G.; FLICK, G. J. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 657 – 661, 1993.

ABDEL-NABY, M. A.; ISMAIL, A.-M. S.; AHMED, S. A.; ABDEL-FATTAH, A. F. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresour. Tech.*, v. 64, p. 205 – 210, 1998.

ABDEL-NABY, M. A.; ISMAIL, A.-M. S.; AHMED, S. A.; ABDEL-FATTAH, A. M. ABDEL-FATTAH, A. F. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process. Biochem.*, v. 34, p. 391 – 398, 1999a.

ABDEL-NABY, M. A.; HASHEM, A. M.; ESAWY, M. A.; ABDEL-FATTAH, A. F. Immobilization of *Bacillus subtilis* α -amylase and characterization of its enzymatic properties. *Microbiol. Res.*, v. 153, p. 319 – 325, 1999b.

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, P. M. Efeito dos microrganismos da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB – Açúcar e Álcool*, v. 3, n. 1, p. 42 – 49, 1984.

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, p. 299 – 304, 2006.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Rev. Álcool e Açúcar*, v. 5, p. 12 – 18, 1982a.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção, problema sério na produção. *Anais do 2º Congresso Nacional da Sociedade de técnicos Açucareiros do Brasil*, v. 4, p. 158 – 162, 1982b.

ANTHONSEN, M. W.; WÅRUM, K. M.; SMIDSROD, O. *Carbohydr. Polym.*, v. 22, p. 193 – 201, 1993.

AUSTIN, P. R.; BRINE, C. J.; CASTLE, J. E.; ZIKAKIS, J. P. *Science*, v. 212, p. 749 – 753, 1981.

AZARKAN, M.; MOUSSAOUI, A. E.; VAN-WUYTSWINKEL, D.; DEHON, G.; LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B.*, v. 790, p. 229 – 238, 2003.

BAHULEKAR, R.; AYYANGAR, N. R.; PONRATHNAM, S. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 13, p. 858, 1991.

BARBELETTI, G. Enzyme Immobilization on Polyethyleneimine-Coated Magnetite Particles. In: BICKERSTAFF, F. G. (Editor) *Immobilization of enzymes and cells*, Ed. Humana Press Inc., cap. 17, v. 1, p. 133 – 141, Totowa, NJ, 1997.

BARROS, R. M.; EXTREMINA, C. I.; GONÇALVES, I. C.; BRAGA, B. O.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 908 – 916, 2003.

BATRA, R.; GUPTA, M. N. Non-covalent immobilization of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase on chitin. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 19, p. 209 – 15, 1994.

BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Procion Green H-4G immobilized on a new IPN hydrogel membrane composed of poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/chitosan: preparation and its application to the adsorption of lysozyme. *Colloids Surf. A: Phys. Eng. Asp.*, v. 202, p. 41 – 52, 2002.

BELLAL, M. BOUDRANT, J.; ELFOUL, L.; BONALY, R. Flocculation Dispersion in *Kluyveromyces lactis*. *Proc. Biochem.*, v. 30, n. 7, p. 641 – 648, 1995.

BHARDWAJ, A.; LEE, J.; GLAUNER, K.; GANAPATHI, S.; BHATTACHARYA, D.; BUTTERFIELD, D. A. Biofunctional membranes: an EPR study of active site structure and stability of papain non-covalently immobilized on the surface of modified poly (ether) sulfone membranes through the avidin-biotin linkage. *J. Memb. Sci.*, v. 119, p. 241 – 252, 1996.

BOFO, D. C. S.; CASTRO, H. F.; MEDEIROS, M. D. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5º SIPAL, P. 121 – 124, mar., 2005.

BOVI, R.; MARQUES, M. O. O tratamento ácido da fermentação alcoólica. *Álcool e Açúcar*, v. 3, n. 9, p. 10 – 13, 1983.

BOWEN, W. R.; SABUNI, H. A. M.; VENTHAN, T. J. Studies of the cell-wall properties of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Biotech. Bioeng.*, v. 40, n. 11, p. 1309 – 1318, 1992.

BRADFORD, M. M. Determination of total proteins. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248 – , 1976.

BROMBERGH, R.; YOKOYA, F. Chemical modifications of the cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 and their effect on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *W.J. of Microbiol. Biotechnol.*, v. 11, p. 508 – 511, 1995.

CALLEJA, G. B. On the nature of the forces involved in the sex-directed flocculation on a fission yeast. *Can. J. of Microbiol.*, v. 20, n. 6, p. 797 – 803, 1974.

_____. Cell Aggregation. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. *The Yeasts – Yeasts and the Environment*. 2.ed, v. 2. London: Academic Press, 1991, cap. 7, p. 165 – 238.

CARVALHO, G. M. J.; ALVES, T. L. M.; FREIRE, D. M. G. l-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 84 – 86, p. 791 – 800, 2000.

CASTRO, M. M. S. *Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica*. 1995. 124 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

CETINUS, S. A.; OZTOP, H. N. Immobilization of catalase into chemically cross-linked chitosan, beads. *Enzyme Microbial Technol.* v. 32, p. 889 – 894, 2003.

CHANG, M. Y.; JUANG, R. S. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 75 – 82, 2005.

CHEN, J.-P.; LEE, J.-J.; LIU H.-S. Comparison of isoamylase immobilization to insoluble and temperature-sensitive reversibly soluble carriers. *Biotechnol. Lett.*, v. 11, p. 109 – 112, 1997.

COCHRANE, F. C.; PETACH, H. H.; HENDERSON, W. Application of tris(hydroxymethyl)phosphine as a coupling agent for alcohol dehydrogenase immobilization. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 18, p. 373 – 378, 1996.

COMERLATO, M. H. *Imobilização de enzimas no suporte crisotila*. 1995. 90 p. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

CROOK, E. M. et al. Cellulose-Insolubilized Enzymes. In: PERLMANN, G. E.; LOVAND, L. (Ed) *Methods in Enzymology*. 19 ed. New York: Academic Press, 1970, p. 963.

CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L.; GAMBASSI, D. M.; ALTERTHUM, F. Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. *Ver. Microbiol.*, v. 16, n. 2, p. 138 – 142, 1985.

DEBABRATA, D.; GAIDHANI, N. R.; MURARI, K.; GUPTA, P. S. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, p. 132 – 137, 1993.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 22, p. 177 – 182, 2006.

EDDY, A. A.; PHIL, M. A. D. Flocculation characteristics of yeast – I. Comparative survey of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, v. 61, p. 307 – 312, 1955.

EDDY, A. A.; PHIL, M. A. D.; RUDIN, A. D. Part of the yeast surface apparently involved in flocculation. *J. Inst. Brew.*, v. 64, p. 19 – 21, 1957.

ESSER, K.; KÜES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. *Proc. Biochem.*, v. 18, p. 21 – 23, 1983.

ESSIA-NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses : effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microb. Biotechnol.* v. 31, p. 128 – 128, 1989.

FERREIRA, L.; RAMOS, M. A.; DORDICK, J. S.; GIL, M. H. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 21, p. 189 – 199, 2003.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Kleisbella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Research*, v. 120, p. 235 – 249, 1983.

FLEET, G. H. Cell Walls. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. *The Yeasts – Yeast Organelles*. 2.ed, v. 4. London: Academic Press, 1991, cap. 5, p. 199 – 277.

FLEURY, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação e clonagem de enzimas líticas. *Quim. Nova*, v. 28, n. 5, p. 871 – 879, 2005.

FUSCO, L. B.; PÊGO-FERNANDES, P. M.; XAVIER, A. M.; PAZETTI, R.; RIVERO, D. H. R. F.; CAPELOZZI, V. L.; JATENE, F. B. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J. Pneumol.*, v. 28, n. 1, jan./fev., 2002.

GALLO, C. R. Contaminantes bacterianos em mosto e dornas de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S. Y. *et al. Pontos Críticos Microbiológicos em Usina de Açúcar e Álcool*, Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, p.1 – 8, 1989.

GALVÃO, C. W. *Caracterização bioquímica das proteínas RecA e RecX de Herbaspirillum seropedicae*. 2005. 163 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GANAPATHY, R.; MANDACHE, S.; SARMADI, M.; DENES, F. Immobilization of papain on cold-plasma functionalized polyethylene and glass surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, v. 12, n. 9, p.1027 – 1049, 2001.

GASPARI, J. W.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Heliantus tuberosus* L. *Scientia Agrícola*, v. 56, n. 4, p. 1135 – 1140, out./dez. 1999.

GE, S. J.; ZHANG, L.-X. The immobilized porcine pancreatic exopeptidase and its application in casein hydrolysates debittering. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 59, p. 159 – 165, 1996.

GE, S.-J.; BAI, H.; ZHANG, L.-X. Trypsin immobilization on shrimp chitin with formaldehyde and its application to continuous hydrolysis of casein. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 24, p. 1 – 5, 1996.

GERHARTZ, W. General Production Methods. In: _____. *Enzymes in Industry*. New York: VCH Publishers, 1990. p. 67.

GROSE, A. F.; BLAKEBROUGH, N.; FIECHTER, A. *Advance in Biochemical Engineering*. v. 10. Berlin: Springer-Verlag, 1978.

GUERRA, E. J. *Isolamento de bactérias contaminantes da fermentação etanólica que induzem à floculação de Saccharomyces cerevisiae e sua sensibilidade a agentes antimicrobianos*. 1995. 150 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

HAJDU, J.; FRIEDRICH, P. *Anal. Biochem.*, v. 65, p. 273 – 280, 1975.

HARISH-PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 117 – 131, 2007.

HAYASHI, T.; HYON, S. H.; CHA, W. I.; IKADA, Y. Immobilization of thiol proteases onto porous poly (vinyl alcohol) beads. *Polym. J.*, v. 25, p. 489 – 497, 1993.

HENRIKSSON, A.; SZEWSYK, R.; CONWAY, P.L. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. and Environm. Microbiol.*, v.57, n.2, p.499-502, 1991.

HIRANO, S. Chitin biotechnology applications. *Biotechnology Annual Review*, v. 2, p. 237 – 258, 1996.

HOUGH, J. S.; MADDOX, I. S. Yeasts autolysis. *Proc. Biochem.*, may, p. 50 – 52, 1970.

HUANG T.-C.; CHEN, D.-H. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 40, p. 1203 – 1209, 1992.

HUCKEL, M.; WIRTH, H. J.; HEARN, M. T. Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, v. 31, p. 165 – 179, 1996.

HUNTER, J. B.; ANSEJO, J. A. A structured and mechanistic model of kinetics of enzymatic lyses and disruption of yeast cells. *Biotech. And Bioeng.*; v. 31, p. 929 – 943, 1988.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C.; AILLAPÁN, A.; TOMASELLO, G.; ZUÑIGA, M. E. Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 23, p. 3 – 9, 1998.

JESSEL, N. et al. *Polym. mater. Sci. Eng.* v. 90, p. 755, 2004.

JOHNSTONE, A.; THORPE, R. Immunochemistry in practice. *Blackwell Scientific Publicat.* Oxford. London, 1987. 299p.

JOLLY, S. L.; PRAKASH. Removal dextran form cane juice. *Intern.. Sugar. J.*, v. 89, p. 184 – 186, 1987.

JIN, Y. L.; SPEERS, R. A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research. Intern.*, v. 31, n. 6 – 7, p. 421 – 440, 1998.

KAMATA, K.; MURATA, M. On the mechanism of brewer's yeast flocculation. *Agric. boil. Chem.*, v. 48, n. 10, p. 2423 – 2433, 1984.

KAWAGUTI, H. Y.; BUZZATO, M. F.; ORSI, D. C.; SUZUKI, G. T.; SATO, H. H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2035 – 2040, 2006.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. *Quim. Nova*, v. 31, n. 1, p. 134 – 143, 2008.

KAY, G.; CROOK, E. M. Coupling of enzymes to cellulose using chloro- δ -triazines. *Nature*, v. 216, p. 514, 1967.

KENNEDY, J. F. Enzyme Technology. In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). *Biotechnology*. v. 7a. Weinheim: VCH, 1987.

KHAN, S. A.; IQBAL, J. Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 32 (pt. 2), p. 89 – 94, 2000.

KIHN, J. C.; MASY, C. L.; MESDAGH, M. M. Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. *Can. J. Microbiol.*, v. 34, p. 773 – 778, 1988.

KIMURA, I. Y.; GONÇALVES Jr., A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, p. 51 – 57, jul./set., 1999.

KLING, S. H.; ARAUJO-NETO, J. S.; PERRONE, J. C. Proteases from products of agave fiber production: its quantitative evaluation, concentration and purification. *Proc. Biochem.*, p. 29-31, jan./feb., 1982.

KNORR, D. J. *Food Science*, v. 48, p. 36 – 38, 1983.

_____. Use of chitinous polymers in food: a challenge for food research and development. *Food Technol.*, v. 38, p. 85 – 97, 1984.

KRAJEWSKA, B. Chitin and its derivatives as supports for immobilization of enzymes. *Acta Biotechnol.*, v. 11, p. 269 – 77, 1991.

_____. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126 – 139, 2004.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1 – 27, 2000.

KURITA, K.; YOSHINO, H.; NISHIMURA, S.-I.; ISHII, S.; MORI, T.; NISHIYAMA, Y. Mercapto-chitins: a new type of supports for effective immobilization of acid phosphatase. *Carbohydr. Polym.*, v. 32, p. 171 – 175, 1997.

KUROKAWA, Y.; SANO, T.; OHTA, H.; NAKAGAWA, Y. *Biotechnol. Bioeng.* v. 42, p. 394 – 397, 1993.

LEI, H.; WANG, W.; CHEN, L.-L.; LI, X.-C.; YI, B.; DENG, L. The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 15 – 21, 2004.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, v. 76, p. 103 – 122, 1973.

LI, F.-Y.; JIA, Y.-F.; LI, R.-J.; LIU, G.; LI, Z.-Y. Papain immobilization on a nitrilon fibre carrier containing primary amine groups. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 33 (pt. 1), p. 29 – 34, 2001.

LI, F.-Y.; XING, Y.-J.; DING, X. Immobilization of papain on cotton fabric by sol–gel method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1692 – 1697, 2007.

LILLY, M. D. Immobilized Enzymes. In: MOSBACH, K. (Ed) *Method in Enzymology*. 44 ed. New York: Academic Press, 1970. p. 46.

LIMA, U. A.; GOLDINI, J. S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de cana. *Brasil Açucareiro*, v. 4, p. 337 – 343, 1974.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 3, 593 p.

LIN, H.; WANG, H.; XUE, C.; YE, M. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 31, p. 588 – 592, 2002.

LIU, H.-S.; CHEN, W.-H.; LAI, J.-T. Immobilization of isoamylase on carboxymethyl-cellulose and chitin. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 66, p. 57 – 67, 1997.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeds supports using the glutaraldehyde crosslinking method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 750 – 756, 2005.

LUDWIG, K. M. *Floculação de Saccharomyces cerevisiae – caracterização e ação de enzimas desfloculantes*. 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

_____. *Produção de carboidrase fúngica visando a desfloculação de células de Saccharomyces cerevisiae floculadas por Lactobacillus fermentum*. 2005. 138 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Avaliação da fermentação alcoólica de leveduras na presença de enzimas proteolíticas. *Revista Científica Plural*, n. 1, p. 21 – 28, 2000.

_____. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 63 – 68, 2001.

LYONS, T. P.; HOUGH, J. S. Flocculation of Brewer's Yeast. *J. Inst. Brew.*, v. 76, p. 564-571, 1970.

_____. Further evidence for the cross-bridging hypothesis for flocculation of brewer's yeast. *J. Inst. Brew.* v. 77, p. 300 – 305, 1971.

MAAZOUZI, N.; BAHMED, K.; CHAKIR, S.; QUILÈS, F.; BONALY, R.; COULON, J. Chemical modification and stability of the cell wall phosphopeptidomannans of flocculent and weakly flocculent *Kluyveromyces bulgaricus* cell. *Process Biochemistry*, 2004. Article in press.

MAIA, M. M. D.; VASCONCELOS, E. A.; MAIA, P. F. C. M. D.; MACIEL, J. C.; CAJUEIRO, K. R. R.; SILVA, M. P. C.; SILVA-JUNIOR, E. F.; DUTRA, R. A. F.; FREIRE, V. N.; FILHO, J. L. L. Immobilization of urease on vapour phase stain etched porous silicon. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 429 – 433, 2007.

MAKINO, K.; NARUO, S.-I.; MORITA, Y.; TAKEUCHI, T.; *Biotechnol. Bioeng.*, v. 31, p. 617 – 619, 1988.

MARTINS, A. S. *Imobilização de trealose de Escherichia coli em partículas de quitina*. 1997. 150 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

MARTINS, A. S.; PEIXOTO, D. N.; PAIVA, L. M. C.; PANEK, A. D.; PAIVA, C. L. A. A simple method for obtaining reusable reactors containing immobilized trehalase: Characterization of a crude trehalase preparation immobilized on chitin particles. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 186 – 492, 2006.

MASSCHELEN, C. A.; JEUNEHOMME-RAMOS, C.; CAUSTIAU, C. ; DEVREUX, A. Mechanism of phenotypic variations in the flocculence character of yeast. *J. Inst. Brew.*, v. 69, p. 332 – 338, 1963.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 68, p. 98 – 105, 2000.

MEHLTRETTER, C. L. Production and use of dialdehyde starch. In: WHISTLER, R. L.; PASCHALL, E. F. *Starch: Chemistry and Technology*. 1 ed. New York: Academic Press, 1967, cap. 18.

MIKI, B. L. A.; POON, N. H.; JAMES, A. P.; SELIGY, V. L. Possible mechanisms for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriol.*, v. 150, n. 2, p. 878 – 889, 1982.

MEZHLUMYAN, L. G.; KASYMOVA, T. D.; YULDASHEV, P. K. Proteinases from *Carica papaya* latex. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 39, n. 3, p. 223 – 228, 2003.

MILL, P. J. The nature of interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 35, p. 61 – 68, 1964.

MONTEIRO-JUNIR, O. A. C. *Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana*. 1999. 113 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MONTEIRO-JUNIOR., O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 119 – 128, 1999.

MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, K. Structure stability relationship in protein: a guide to approaches to stabilizing enzymes. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 4, p. 387 – 419, 1990.

MOZHAEV, V. V. Mechanism based strategies for protein thermostabilization. *Trends in Biotechnology*, v. 11, p. 88 – 95, 1993.

MUZZARELLI, R. A. A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Enzym. Microb. Technol.*, v. 2, p. 177 – 84, 1980.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitin and its derivates: new trends of applied research. *Carboyd Polym*, v. 3, p. 53 – 75, 1982.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

NGONDI-EKOME, J.; THIEBAULT, F.; STRUB, M.; VAN-DORSSEALAER, A.; BONALY, R.; CONTINO-PEPIN, C.; WATHIER, M.; PUCCI, B. COULON, J. Study on agglutinating factors from flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biochimie*, v. 85, p. 133 – 143, 2003.

NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Factors affecting flocculation of brewer's yeast. *J. Ferment. Technol.* v. 54, n. 6, p. 351 – 355, 1976a.

_____. Induction of floc-forming ability in brewer's yeast. *J. Ferment. Technol.*, v. 54, n. 6, p. 356 – 360, 1976b.

_____. Effect of chemical modification of cell surface components of a brewer's yeast on the floc-forming ability. *Arch. of Microbiol.*, v.115, p.19-23, 1977.

_____. Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effects of metal ions, protein-denaturants and enzyme treatments. *Arch. Microbiol.* v. 131, p. 112 – 115, 1982.

NITSAWANG, S.; HATTI-KAUL, R.; KANASAWUD, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1103 – 1107, 2006.

OGAWA, M.; ALVES, T. T.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES, A. S.; MAIA, E. L. *Arq. Ciên. Mar.*, v. 13, p. 83 – 89, 1973.

OHASHI, E.; KORIYAMA, T. Simple and mild preparation of an enzyme-immobilized membrane for a biosensor using β -type crystalline chitin. *Anal. Chim. Acta.*, v. 262, p. 19 – 25, 1992.

OLIVA-NETO, P. *Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada*. 1990. 207 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

_____. *Aspectos tecnológicos da produção de isomaltulose por Protaminobacter rubrum*. 2004. 104 f. Tese (Livre-Docência em Microbiologia) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2004.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 10, p. 697 – 699, 1994.

_____. Effect of 3,4,4'-trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, v. 63, p. 17 – 21, 1998.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase vegetal em matriz de quitosana. *Quim. Nova*, v. 29, n. 5, p. 932 – 939, 2006.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. *Scientia Agrícola*, v. 55, n. 3, 1998.

ÖNAL, S.; TELEFONCU, A. Comparison of chitin and Amberlite IRA-938 for α -galactosidase immobilization. *Artif. Cells Blood Subst. Biotechnol.*, v. 31, p. 19 – 33, 2003.

ONYEZILI, F. N. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 29, p. 399 – 402, 1987.

OSWALD, P. R.; EVANS, R. A.; HENDERSON, W.; DANIEL, R. M.; FEE, C. J. Properties of a thermostable β -glucosidase immobilized using tris(hydroxymethyl)phosphine as a highly effective coupling agent. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 23, p. 14 – 19, 1998.

OTUKA, E. S.; PEDRAZZANI, E. S.; PIOTO, M. P. Uso da papaína na úlcera plantar. *Rev. Bras. Enfermagem*, v. 49, n. 2, p. 207 – 214, abr./jun., 1996.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93 – 99, 2006.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 711 – 718, 2002.

PETER, M. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, v. A32, p. 629 – 640, 1995.

POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; CAMILIOS-NETO, D. Aplicação de Bucha Vegetal (*Luffa Cylindrica*) como Suporte para Produção de Xarope de Açúcar Invertido. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 25, n. 1, p. 53 – 58, jan./jun., 2004.

PORATH, J. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides. *Nature*, v. 214, p. 1302, 1967.

PRZYBYT, M.; SUGIER, H. Immobilization of glucoamylase. *Starch/Staerke*, v. 40, p. 275 – 279, 1988.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, v. 244, p. 461 – 486, 1994.

REISS, M.; HEIBGES, A.; METZGER, J.; HARTMEIER, W.; Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, v. 13, p. 1083 – 1090, 1998.

RODINI, M. A. *Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol*. 1985. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

ROSA, H.; OLIVA-NETO, P.; LEITE, O. D. Imobilização do extrato enzimático de *Trichoderma reesei* em quitina visando a desfloculação celular de *Saccharomyces cerevisiae*. In: 12.º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 2004, Ribeirão Preto. *Anais do 12º SIICUSP*. Ribeirão Preto: USP, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pró-Reitoria de Graduação, Pró-Reitoria de Cultura e Extensão Universitária, 2004.

ROSE, A. H. Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F. A. *et al. Biology and Actives of Yeast*, Academic Press, 1980.

RUCKENSTEIN, E., ZENG, X. Macroporous chitin affinity membranes for lysozyme separation. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 56, p. 610 – 617, 1997.

SANGEETHA, K.; ABRAHAM, T. E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 38, p. 171 – 177, 2006.

SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 75, n. 2, p. 151 – 154, 1993.

SERRA, G. E.; GEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação Alcoólica: floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, v. XCIII, n. 6, p. 336 – 341, 1979.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. *J. Agric. Food Chem.*, v. 39, p. 1527 – 1532, 1991.

SHARF, J. M. *Exame microbiológico de Alimentos – Apêndice B*. Trad. Miguel Falcone, São Paulo, Ed. Polígono, 1972, p. 239.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, v. 246, p. 227 – 246, 1989.

SHI-JUN, G.; YUAN, H.; LONG-XIANG, Z. Continuous production of high degree casein hydrolysate by immobilized protease in a column reactor. *J. Biotechnol.*, v. 50, p. 161 – 170, 1996.

SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Method of producing an immobilized alpha-glycosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. UK Patent 2,082,591. 1982.

SOBRAL, K. C. A.; RODRIGUEZ, R. M. O.; OLIVEIRA, R. D.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Immobilization of cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in commercial chitosan. *Journal of Inclusion Phenomena and Microcyclic Chemistry*, v. 44, p. 383 – 386, 2002.

SOBRAL, K. C. A.; RODRIGUEZ, R. M. O.; OLIVEIRA, R. D.; OLIVO, J. E.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105 – 108, p. 809 – 819, 2003.

SPAGNA, G.; ANDREANI, F.; SALATELLI, E.; ROMAGNOLI, D.; PIFFERI, P. G. Immobilization of α -L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan. *Process. Biochemistry*, v. 33, n. 1, p. 57 – 62, 1998.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; CASARINI, D.; PIFFERI, P. G. A novel chitosan derivate to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, ed. 4 – 5, p. 427 – 438, 2001.

STEWART, G. G.; RUSSEL, I.; GARRISSON, I. F. Some considerations of the flocculation characteristics of ale and large yeast strains. *J. Inst. Brew.* v. 81, p. 248 – 257, 1975.

STEWART, G. G.; GARRISON, I. F.; GORING, T. E.; MELEG, M.; PIPAST, P.; RUSSEL, I. Biochemical and genetic studies on yeast flocculation. *Kemia-Kemi*, v. 3, p. 465 – 479, 1976.

STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 5, p. 441 – 445, 1989.

_____. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 136, p. 13 – 18, 1996.

STRATFORD, M.; BRUNDISH, H. M. Yeast flocculation: cationic inhibition. *Yeast*, v. 6, p. 77 – 86, 1990.

SUGAWARA, K.; TAKANO, T.; FUKUSHI, H.; HOSHI, S.; AKATSUKA, K.; KURAMITZ, H., et al. Glucose sensing by a carbon-paste electrode containing chitin modified with glucose oxidase. *J. Electroanal. Chem.* v. 482, p. 81 – 86, 2000.

SYNOWIECKI, J.; SIKORSKA-SIONDALSKA, A.; EL-BEDAWEY, A. E. Adsorption of enzymes on krill chitin modified with carbon disulfide. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 29, p. 352 – 354, 1987.

TARDIOLI, P. W. *Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro de Queijo usando Carboxipeptidase A e Alcalase® Imobilizadas Multipontualmente em Agarose*. 2003. 173 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TARDIOLI, P. W.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Design of new immobilized-stabilized carboxipeptidase A derivate for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 565 – 574, 2003a.

TARDIOLI, P. W. PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. GUIÁN, J. M. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnology Progress*. v. 19, p. 352 – 360, 2003b.

TENUTA-FILHO, A.; ZUCAS, S. M. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 5, p. 78 – 85, 1985.

_____. *SBTA*, v. 21, p. 163 – 169, 1987.

TILBURY, R. H. Occurrence and effect of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CARR et al. *Latic Acid Bacteria in Beverages and Food*. New York: Academic Press, 1975. p.177 – 191.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.*, v. 17, n. 8, p. 326 – 335, 1999.

UNZ, R. F.; FARRAH, S. R. Exopolymer production and flocculation by *Zooglea* MP6. *Appl. and Envirom. Microbiol.*, v. 31, n. 4, p. 623 – 626, 1976.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; MILLAN, P.; DORNIER, M.; DECLoux M.; REYNES, M. Co-immobilized pectinylase and endocellulase on chitin and Nylon supports. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 989 – 96, 2000.

VARAVINIT, S.; CHAOKASEM, N.; SHOBSNGOB, S. Immobilization of a thermostable alpha-amylase. *ScienceAsia*, v. 28, p. 247 – 251, 2002.

VASUDEVAN, P. T.; RUGGIANO, L.; WEILAND, H.; *Biotechnol. Bioeng.*, v. 35, p. 1145 – 1149, 1990.

WEETALL, H. H. *Cereal Food World*, v. 21, p. 581 – 587, 1976.

WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: FOGARTY, W. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Dublin: Applied Science Publisher, 1990. p. 133 – 37.

WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2. ed. New York: Marcel Dekker Ink., 1994.

YAZDANI-PEDRAM, M.; LAGOS, A. *J.M.S.-Pure Appl. Chem.*, v. A32, p. 1037 – 1047, 1995.

YOKOYA, F. Microbiologia de Processo. In: EGUCHI, S. Y. et al. *Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, 1989. p. 1 -22.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na Fermentação Alcoólica. *STAB – Alcool e Açúcar*, julho/agosto, 1991.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista Microbiol.*, v. 22, n. 1, p. 12 – 16, 1991.

ZABORSKA, W. Competitive inhibitors of free and chitosan immobilized urease. *Acta Biochimica Polonica*, v. 42, p. 115 – 118, 1995.

ZARRATINI, R. A.; WILLIAMS, J. W.; ERNANDES, J; R.; STEWART, G. G. bacterial-induced flocculation in selected brewing strain of *Saccharomyces. Cerevis. and Biotechnol.*, v.18, p. 65 – 70, 1993.

ZENG, J.; ZHENG, L.-Y. Studies on *Penicillium* sp. ZDZ1 chitosanase immobilized on chitin by cross-linking reaction. *Process. Biochem.*, v. 38, p. 531 – 535, 2002.

ZHUANG, P.; BUTTERFIELD, D. A. Spin labeling and kinetic studies of a membrane immobilized proteolytic enzyme. *Biotechnol. Progr.*, v. 8, p. 204 – 210, 1992.