

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/12/2018.

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

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF**

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

**Elen Tomoko Taniguchi**

Araraquara  
2017

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

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF**

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

**Elen Tomoko Taniguchi**

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

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Peixoto.

Araraquara  
2017

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

**Elen Tomoko Taniguchi**

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

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Peixoto.

Araraquara  
2017



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

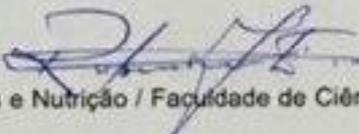
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Avaliação da invertase imobilizada em resíduo agroindustrial para aplicação em reatores enzimáticos de alta taxa

**AUTORA:** ELEN TÔMOKO TANIGUCHI

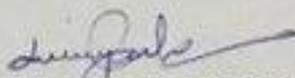
**ORIENTADOR:** RUBENS MONTI

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

Prof. Dr. RUBENS MONTI

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

Profa. Dra. ALICE YOSHIKO TANAKA

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

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

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

Araraquara, 18 de dezembro de 2017

## **Dedicatória**

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

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

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

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

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

Ao meu coorientador professor Dr. Guilherme Peixoto.

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

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

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

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

*Gratidão por ter vocês em minha vida, muito obrigada!*

## **Agradecimentos**

À CAPES, pela bolsa concedida.

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

Aos funcionários da FCFar, pela simpatia e serviços.

.

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

*Cora Coralina*

## Resumo

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

## Abstract

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

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

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG: agarose

AG-GLU: agarose glutaraldeído invertase

AR: atividade recuperada

ASP: ácido aspártico

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DNS: ácido 3,5 dinitrosalicílico

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar

EDA: etilenodiamina

ES: enzima solúvel

FE: fator de estabilização

GLU: ácido glutâmico

$K_M$ : constante de afinidade - Michaelis Menten

KI: iodeto de potássio

I: iodeto

IO<sub>4</sub>: periodato

Milli-Q: água ultrapura

NaBH<sub>4</sub>: borohidreto de sódio

NaIO<sub>4</sub>: periodato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

RI: rendimento de imobilização

RID: Índice de refração

[S]: substrato

SM: pó de sabugo de milho

SM-GLU: pó de sabugo de milho glutaraldeído invertase

TDH: tempo de detenção hidráulica

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

## LISTA DE TABELAS

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

## LISTA DE FIGURAS

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

## LISTA DE EQUAÇÕES

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

## Sumário

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

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

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

## 1. Introdução

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

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

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

## 6. Conclusão

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

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

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

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

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

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

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

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

## Referências

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

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

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

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

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

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

60. Balcão VM, Paiva AL, Malcata FX. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. Vol. 18, Enzyme and Microbial Technology. 1996. p. 392–416.
61. Wang X, Liu X, Zhao C, Ding Y, Xu P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. Bioresour Technol. 2011;102(10):6352–5.
62. Silva WC, Teixeira LF, Carvalho AKF, Mendes AA, de Castro HF. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. J Ind Eng Chem. 2014;20(3):881–6.
63. Peixoto G, Saavedra NK, Varesche MBA, Zaiat M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. Int J Hydrogen Energy. 2011;36(15):8953–66.
64. Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem [Internet]. 1951;193(1):265–75. Available from: [http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193\\_265.pdf](http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf)
65. Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 1972;48(2):422–7.
66. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426–8.
67. James Sumner BB, Noback V. THE ESTIMATION OF SUGAR IN DIABETIC URINE, USING DINITROSALICYLIC ACID. JBiolChem [Internet]. 1924; Available from: <http://www.jbc.org/>
68. Villela GG, Bacila M, Tastaldi H. Bioquímica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976. 780p.
69. Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J Biol Chem. 1934;56:658–65.
70. Hayashida S, Yoshioka H. Purification and properties of B-Glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. Agric Biol Chem. 1980;44(8):1729–35.
71. Ferreira Filho EX. Purification and characterization of a P-glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. Can J Microbiol, 1996 Jan.; 42(1):1-5.
72. Coughlan M, McHale A. Purification of B-D-glucoside glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. Methods Enzymol. 1988;160:437–43.
73. Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential

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

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

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