UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Bioconversão de sacarose em ácido glicônico e frutose usando
reator com membrana**

Ester Junko Tomotani

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Dr. Michele Vitolo**

**São Paulo - SP
2006**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011624

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tomotani, Ester Junko
T661b Bioconversão de sacarose em ácido glicônico e frutose
usando reator de membrana / Ester Junko Tomotani. -- São
Paulo, 2006.
102p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Vitolo, Michele

1. Biotecnologia 2. Biorreator : Biotecnologia 3. Enzima :
Biotecnologia I. T. II. Vitolo, Michele, orientador.

620.8 CDD

Ester Junko Tomotani

Bioconversão de sacarose em ácido glicônico e frutose usando
reator com membrana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Michele Vitolo
orientador/presidente

Prof. Dr. Mauri Sergio Alves Palma
1º. examinador

Profa. Dra. Carmen Cecília Tadini
2º. examinador

Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz
3º. examinador

Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe
4º. examinador

São Paulo, 27 de março de 2006.

O SENHOR é a minha força e o meu escudo; nele
confiou o meu coração, e fui socorrido; pelo que o
meu coração salta de prazer, e com o meu canto o
louvarei.

O SENHOR é a força do seu povo; também é a
força salvadora do seu ungido.

Salva o teu povo e abençoa a tua herança; apascenta-
os e exalta-os para sempre.

Salmo 28: 7-9

*Aos meus queridos pais, Teruo e Yoshi
("in memoriam"), que com
muito carinho e dedicação têm
me encorajado e acolhido.
Obrigada, Deus, pelo privilégio de tê-los
como pais.*

*Hélio, Levi e Lucas, meus mais
profundos agradecimentos
por ter estado sempre
presente, trazendo alegria e
suporte.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Michele Vitolo, por sua orientação segura, ensinamentos técnicos, incentivo, por sua presença constante no decorrer deste trabalho e em particular pela preciosa amizade.

À Prof. Dr. Suzana Caetano da Silva Lannes, pelo valioso auxílio disponibilizando o produto, "Bioinvert", imprescindível para a concretização deste trabalho.

A todos os meus familiares e amigos que me acompanharam com incentivo e intercessões para que obtivesse o sucesso desejado.

Ao meu amigo, consultor e professor Philip Barsanti pelo encorajamento, comentários e sugestões valiosas na confecção de publicações pertinentes a este trabalho.

Aos colegas e funcionários do laboratório que fizeram com que o trabalho fosse mais produtivo e prazeroso.

Aos prestativos funcionários bibliotecários e funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Aos dedicados funcionários das secretarias: Juarez, Miriam, Elza, Jorge, Elaine e Benê, que sempre atenderam aos mais variados pedidos da melhor forma possível.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Tecnologia-Bioquímico Farmacêutica, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Bioconversão de sacarose em ácido glicônico e frutose usando reator com membrana

Ester Junko Tomotani

Resumo

A conversão enzimática da sacarose pela ação sucessiva da invertase e da glicose oxidase (GOD), permite obter produtos de maior valor agregado, a saber, frutose e o ácido glicônico, dois produtos de amplo uso na indústria farmacêutica, alimentícia e química. Foi estudada a aplicação da invertase imobilizada em resinas aniônicas do tipo Dowex[®] (um copolímero de poliestireno-divinilbenzeno) sobre a hidrólise da sacarose bem como a oxidação da glicose pela glicose oxidase solúvel ou imobilizada no mesmo suporte em separado (sistema bifásico), utilizando-se um reator de membrana acoplado à membrana de ultrafiltração (100kDa) ou de microfiltração (5µm). Posteriormente, avaliou-se o desempenho de ambas as formas de enzimas, solúveis ou imobilizadas num sistema monofásico empregando o mesmo reator. A bioconversão executada em sistema bifásico permitiu a obtenção de xarope de frutose da ordem de 70% através da separação de glicose e frutose utilizando-se a resina catiônica 50W:8-100. O rendimento de 96,6% e 67,4% para as formas solúveis e imobilizadas respectivamente foram obtidas em sistema monofásico. O não desprendimento das enzimas dos suportes viabilizou o uso da membrana de microfiltração, trazendo vantagens à operação de biorreator com membrana.

Sucrose bioconversion into gluconic acid and fructose using a membrane reactor

Ester Junko Tomotani

Abstract

The enzymatic conversion of sucrose through a successive action of invertase and glucose oxidase (GOD) allows the obtainment of products with higher commercial value, fructose and gluconic acid, which are widely used in pharmaceutical, food and chemical industries. Invertase and GOD immobilized on Dowex[®] anionic resin (a polystyrene divinylbenzene copolymer) as well as soluble GOD were used in a membrane bioreactor (MB) for sucrose hydrolysis and glucose oxidation. The MB was coupled with a UF-membrane (100kDa) or a MF-membrane (5µm). The bioconversion was conducted in two steps (biphasic system) as well as in one step (monophasic system). The bioconversion operated in a biphasic system permitted obtaining a fructose syrup with a concentration of about 70% through a separation of glucose and fructose using a cationic resin, 50W:8-100. As for the monophasic system, the yield of 96.6% and 67.4% for soluble and immobilized forms were attained respectively. No leakage of the enzymes from the support allowed the use of a microfiltration membrane, adding advantages to the membrane bioreactor operation.

Índice de Figuras

Figura 1.	Perfil do grau de conversão [X] para os ensaios (I-1 e I-2) com a invertase solúvel [(◇) – 3,28mg de proteína; (□) – 1,64mg de proteína] Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]=100mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de 0,8h ⁻¹ e agitação entre 100-150rpm.	40
Figura 2.	Perfil do grau de conversão [X] para os ensaios com a invertase imobilizada (I-3 a I-7) [(□) – 1,64mg de proteína/25mg de resina (I-3), (×) – 1,64mg de proteína/50mg de resina (I-4) (◇) – 3,28mg de proteína /25mg de resina (I-5), (△) – 3,28mg de proteína/50mg de resina (I-6), (*) – 1,64mg de proteína/100mg de resina (I-7)]. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]=100mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de 0,8h ⁻¹ e agitação entre 100-150rpm.	40
Figura 3.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-8 [invertase imobilizada (3,28mg de proteína /100mg de resina)] onde a [sacarose]=100mM no intervalo de 0-23h e [sacarose]=50mM no intervalo de 23-46h. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de 0,4h ⁻¹ e agitação entre 100-150rpm.	43
Figura 4.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-9 a I-12 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foram variadas as concentrações de sacarose: 50mM (◇); 25mM (□); 12,5mM (△) e 6,25mM (○). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de 0,4h ⁻¹ e agitação entre 100-150rpm.	45
Figura 5.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-13 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a vazão de alimentação: 4mL.h ⁻¹ , 8 mL.h ⁻¹ e 16 mL.h ⁻¹ . Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 6,25mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.	46
Figura 6.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-14 e I-15 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a vazão de alimentação: 8 mL.h ⁻¹ para 4 mL.h ⁻¹ (◇) e 16 mL.h ⁻¹ para 8mL/h (□). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 5 mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.	47

- Figura 7. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios I-16 a I-19 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a concentração da sacarose: 50mM ($\diamond$), 25mM ($\square$), 12,5mM ($\triangle$) e 6,25mM ($\circ$). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: vazão de alimentação para as primeiras 10 horas foi 8 mL.h⁻¹ e as demais horas foi 16 mL.h⁻¹, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm. 47
- Figura 8. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-20 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a vazão de alimentação: 4 mL.h⁻¹ ($\diamond$), 8 mL.h⁻¹ ($\square$) e 16 mL.h⁻¹ ($\triangle$). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 2,5mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm. 48
- Figura 9. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-22 a I-24 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variado o pH: 5,0($\diamond$), 5,5 ($\square$) e 6,0 ($\triangle$). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 2,5mM, volume do reator=10mL, 30°C, vazão de alimentação de 16 mL.h⁻¹, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm. 50
- Figura 10. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-22 e I-25 a I-27 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variado a temperatura e o “cut off” da membrana: 30°C e 100kDa($\diamond$), 30°C e 5 μ m($\square$), 45°C e 100kDa($\triangle$) e 45°C e 5 μ m ($\circ$). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 2,5mM, volume do reator=10mL, pH=5,5, vazão de alimentação de 16 mL.h⁻¹, e agitação entre 100-150rpm. 52
- Figura 11. Efeito do pH sobre a atividade da GOD. 54
- Figura 12. Efeito do pH sobre a estabilidade da glicose oxidase [pH 4,0 ($\diamond$), pH4,5 ($\square$), pH5,0 ($\triangle$), pH 5,5($\times$), pH 6,0 (*) e pH 6,5 ($\circ$)]. 55
- Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade da GOD. 56
- Figura 14. Gráfico baseado no método de Arrhenius para calcular a Energia de ativação da reação calculada pela GOD. 57
- Figura 15. Os inversos da atividade da GOD versus os inversos das concentrações de glicose, elaborado conforme o método de Lineweaver-Burk $\{v^{-1} = 385,95[s]^{-1} + 13,29 (R^2=0,99)\}$. 59
- Figura 16. Água oxigenada formada na oxidação da glicose pela GOD, após o contato prévio de 5min da enzima com a solução de H₂O₂ na concentração de 0,030 mg.mL⁻¹ ($\times$) e 0,060 mg.mL⁻¹ ($\triangle$). 60

Figura 17.	Água oxigenada formada na oxidação da glicose pela GOD, após o contato prévio de 5min da enzima com a solução de H_2O_2 na concentração de $0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($\diamond$) e $0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($\square$).	61
Figura 18.	Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação das constantes cinéticas da GOD na presença ($\square$) e na ausência de inibidor ($\diamond$).	62
Figura 19.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GOD-8 a GOD-11. Variou-se a vazão de alimentação: 10 mL.h^{-1} ($\diamond$), 15 mL.h^{-1} ($\square$), 30 mL.h^{-1} ($\triangle$) e 60 mL.h^{-1} ($\circ$). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 30°C , $[\text{GOD}]=1 \text{ mg.mL}^{-1}$, $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$ e agitação entre 100-150 rpm.	64
Figura 20.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GOD-11 e GOD-12. Variou-se a temperatura da reação: 30°C ($\circ$) e 45°C ($\triangle$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação de 60 mL.h^{-1} , pH 5,5, $[\text{GOD}]=1 \text{ mg.mL}^{-1}$, $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$ e agitação entre 100-150 rpm.	65
Figura 21.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GOD-11, GOD-13 e GOD-14. Variou-se o pH da reação: 5,0 ($\square$), 5,5 ($\circ$) e 6,0 ($\triangle$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação de 60 mL.h^{-1} , 30°C , $[\text{GOD}]=1 \text{ mg.mL}^{-1}$, $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$ e agitação entre 100-150 rpm.	65
Figura 22.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-1 ($\triangle$), GODi-2 ($\square$) e GODi-3 ($\diamond$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h^{-1} , pH 5,5, 30°C , $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kdDa.	68
Figura 23.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-4 ($\circ$), GODi-5 ($\triangle$), GODi-6 ($\square$) e GODi-7 ($\diamond$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h^{-1} , pH 5,5, 30°C , $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kdDa.	69
Figura 24.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-8 ($\circ$), GODi-9 ($\triangle$), GODi-10 ($\square$) e GODi-11 ($\diamond$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h^{-1} , pH 5,5, 30°C , $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kdDa.	69
Figura 25.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-12,13 e 14: pH 5,0 ($\triangle$), pH 5,5 ($\square$), pH 6,0 ($\diamond$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h^{-1} , 30°C , $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kdDa.	70
Figura 26.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-13 e 15: 30°C ($\diamond$) e 45°C ($\triangle$). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h^{-1} , pH 5,5, $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kdDa.	71

Figura 27.	Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-16 e 17: 30°C (◇) e 45°C (△). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h ⁻¹ , pH 5,5, [glicose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 5µm.	71
Figura 28.	Curvas de eluição de glicose (○) e frutose (□) no leito de 1,5cm de resina: Ensaio B-1.	75
Figura 29.	Curvas de eluição de glicose (□) e frutose (○) no leito de 3,5 cm de altura: Ensaio B-2.	76
Figura 30.	Separação da mistura de glicose e frutose no leito de 3,5 cm de altura [mistura glicose e frutose (◇), glicose (□) e frutose (△)]: Ensaio B-4.	76
Figura 31.	Separação individual de glicose (◇) e frutose (□) utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:8-100: Ensaio B-3.	79
Figura 32.	Separação individual de glicose (◇) e frutose (□) utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:4-100: Ensaio A-1.	79
Figura 33.	Separação da mistura de glicose e frutose utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:8-100 [ART (□), glicose (○) e frutose (△)]: Ensaio B-5.	80
Figura 34.	Separação da mistura de de glicose e frutose utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:4-100 [ART (□), glicose (○) e frutose (△)]: Ensaio A-2.	80
Figura 35.	Reciclo (1) - Separação da mistura de açúcares utilizando solução tamponada de acetato de cálcio como eluente – resina 50W:8-100 [ART (□), glicose (○) e frutose (△)]: Ensaio B-6.	81
Figura 36.	Reciclo (2) - Separação da mistura de açúcares utilizando solução tamponada de acetato de cálcio como eluente – resina 50W:8-100 [ART (□), glicose (○) e frutose (△)]: Ensaio B-6.	81
Figura 37.	Reciclo (3) - Separação da mistura de açúcares utilizando solução tamponada de acetato de cálcio como eluente – resina 50W:8-100 [ART (□), glicose (○) e frutose (△)]: Ensaio B-6.	82
Figura 38.	Perfil da separação da glicose da frutose ao longo dos 3 reciclos [G ₀ -1ª. Separação (◇), G ₁ -1º.reciclo (□), G ₂ -2º.reciclo (△), G ₃ -3º.reciclo(×)]: Ensaio B-6.	82
Figura 39.	Perfil da separação da frutose da glicose ao longo dos 3 reciclos [F ₀ -1ª. Separação (◇), F ₁ -1º.reciclo (□), F ₂ -2º.reciclo (△), F ₃ -3º.reciclo (×)]: Ensaio B-6.	83

- Figura 40. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios Gls-1 a Gls-4. Variou-se a vazão de alimentação: 5 mL.h^{-1} (x), 8 mL.h^{-1} ($\diamond$), 16 mL.h^{-1} ($\square$) e 30 mL.h^{-1} ($\triangle$). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 30°C , 0,219mg de proteína (GOD) e 1,64mg de proteína (invertase), [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa (reator da Bioengineering). 86
- Figura 41. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios Gli-1 a Gli-4. Variou-se a vazão de alimentação: 5 mL.h^{-1} (x), 8 mL.h^{-1} ($\diamond$), 16 mL.h^{-1} ($\square$) e 30 mL.h^{-1} ($\triangle$). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 30°C , sistema imobilizado constituído por Dowex[®] 1x4:200/ GOD e invertase, [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de $5\mu\text{m}$ (reator da Bioengineering). 86
- Figura 42. Perfil da velocidade de reação $[r]$ em função do tempo para os ensaios Gls-5 e Gli-5 a Gli-8. Variou-se a vazão específica (D), o tipo de membrana e o volume interna do reator: Gls-5/100kDa/ $0,6\text{h}^{-1}$ /150mL ($\triangle$), Gli-5/100kDa/ $0,6\text{h}^{-1}$ /150mL ($\diamond$), Gli-6/ $5\mu\text{m}$ / $1,2\text{h}^{-1}$ /150mL ($\square$), Gli-7/ $5\mu\text{m}$ / $1,2\text{h}^{-1}$ /300mL (+) e Gli-8/ $5\mu\text{m}$ / $1,2\text{h}^{-1}$ /açúcar mascavo (x). Foram mantidos constantes: pH 5,5, $23\text{-}26^\circ\text{C}$, quantidade das enzimas solúveis e do sistema imobilizado constituído por Dowex[®] 1x4:200/ GOD e invertase, [sacarose]=2,5mM ou [açúcar mascavo] = 2,5mM de sacarose, agitação de 100-150 rpm (célula de filtração da Millipore). 88

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Esquema montado para a dosagem de glicose pelo método enzimático.	29
Tabela 2.	Condições empregadas nos ensaios usados para o estabelecimento da relação massa da invertase/massa da resina. As condições operacionais mantidas constantes foram: [sacarose]=100mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão de alimentação=8mL.h ⁻¹ e agitação entre 100-150rpm.	35
Tabela 3.	Condições operacionais variadas nos ensaios I-7 a I-18. Foram mantidos constantes: pH 5,5, T=30°C, agitação entre 100-150rpm e membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100 kDa). No ensaio I-7 o sistema imobilizado foi constituído por 3,28mg de proteína e 100mg de resina (IA=98%) e nos demais ensaios (I-8 à I-18) empregou-se a relação 1,64mg de proteína para 100mg de resina (IA médio de 94%).	35
Tabela 4.	Condições operacionais variadas nos ensaios I-19 a I-27. Foram mantidos constantes:[sacarose]=2,5mM, agitação entre 100 e 150rpm, razão invertase/resina (1,64mg de proteína/100mg de resina tendo IA médio de 96%). Nos ensaios I-19 a I-25 empregou-se a membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100 kDa) e para I-26 e I-27 a de microfiltração de 5µm.	36
Tabela 5.	Ensaio utilizando a GOD efetuados em batelada e os respectivos parâmetros variados.	36
Tabela 6.	Condições operacionais variadas nos ensaios GOD 8 a 14 feitos em biorreator com membrana da "Bioengineering". Foram mantidos constantes: [glicose]=2,5mM, agitação entre 100 e 150rpm e membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100 kDa).	36
Tabela 7.	Resinas aniônicas (Dowex® 1x2, 4 e 8) empregadas como suporte para a imobilização de glicoseoxidase (razão da glicoseoxidase/resina: 0,219mg de proteína/100mg de resina seca) [32°C, pH5,5, 100 rpm durante 4horas].	37
Tabela 8.	Estudo do comportamento do sistema imobilizado, Dowex®1x4:200/glicoseoxidase (IA~76%), no biorreator da "Bioengineering®" variando os valores de pH, T e tipo de membrana com exceção da concentração do substrato (2,5mM de glicose), da vazão específica de alimentação (6h ⁻¹) e agitação entre 100 e 150rpm.	37
Tabela 9.	Ensaio dos sistemas constituídos por invertase e glicoseoxidase solúveis (Gls) e imobilizadas (Gli) em Dowex®1x4:200 e vazão específica (h ⁻¹) empregada no reator de membrana da Bioengineering [2,5mM de sacarose, pH 5,5, 30°C] utilizando a membrana de ultrafiltração (100kDa) ou de microfiltração (5µ).	38

Tabela 10.	Ensaio na célula de ultrafiltração da Millipore® empregando glicoseoxidase e invertase ambas solúveis (Gls) ou imobilizadas (Gli) variando o volume reacional, o tipo de membrana e substrato. Os demais parâmetros foram mantidos (pH 5,5; 23-26°C e agitação entre 100 e 150rpm).	38
Tabela 11.	Ensaio para a separação cromatográfica da glicose e da frutose.	39
Tabela 12.	Valores médios da conversão (X) e da velocidade da reação (r).	41
Tabela 13.	Atividade hidrolítica de diferentes sistemas Dowex® 4-200/invertase determinados nos ensaios em batelada (TOMOTANI, 2002).	42
Tabela 14.	Eficiência dos sistemas imobilizados(I-3 a I-7). A eficiência é a razão entre a velocidade de reação da enzima imobilizada e a solúvel. A velocidade de reação da enzima solúvel para 1,64mg e 3,28mg de proteína foram respectivamente 0,23 e 0,52 mmol de ART.h ⁻¹ .mg ⁻¹ de proteína.	42
Tabela 15.	Valores médios obtidos no ensaio I-8.	44
Tabela 16.	Valores médios obtidos nos estudos do efeito do substrato empregando-se D=0,4h ⁻¹ (1,64mg de proteína/100mg de resina) – ensaios I-9 a I-12.	44
Tabela 17.	Valores médios de r e X obtidos no ensaio I-13 [estudo do efeito da vazão específica D=0,4h ⁻¹ , 0,8 h ⁻¹ e 1,6 h ⁻¹ usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina, [S]=6,25mM)].	45
Tabela 18.	Valores médios de r e X obtidos nos ensaios I-14 e I-15 [estudo do efeito da vazão específica D=0,4h ⁻¹ , 0,8 h ⁻¹ e 1,6 h ⁻¹ usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina, [S]=5mM)].	46
Tabela 19.	Valores médios obtidos nos ensaios I-16 a I-19 [estudos do efeito da vazão em função do substrato usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina)].	48
Tabela 20.	Valores médios obtidos nos estudos do efeito da vazão em função do substrato usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina): 2,5mM e 5mM de sacarose.	49
Tabela 21.	Valores médios obtidos de “r” e “X” nos ensaios I-22 a I-24 usando a invertase imobilizada: estudos do efeito do pH na hidrólise da sacarose].	49
Tabela 22.	Valores médios obtidos de “r” e “X” nos ensaios I-22 e I-25 a I-27 usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina): estudos do efeito da temperatura na hidrólise da sacarose empregando membrana com “cut off” de 100kDa ou de 5µm.	50
Tabela 23.	Parâmetros termodinâmicos calculados para a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina) a 318K empregando-se membrana com “cut off” de 100kDa ou de 5µm.	51

Tabela 24.	Efeito do pH sobre a atividade da GOD (Ensaio GOD-1)	53
Tabela 25.	Efeito do pH sobre a estabilidade da glicose oxidase. Os valores constantes do corpo da tabela representam a atividade residual da GOD (U.mL^{-1}) $\times 10^3$.	54
Tabela 26.	Efeito da temperatura sobre a atividade da glicose oxidase.	56
Tabela 27.	O logaritmo da atividade da GOD em função do inverso da temperatura do meio reacional.	57
Tabela 28.	Estabilidade da GOD frente à temperatura. Os valores foram expressos como (U.mL^{-1}) $\times 10^3$, sendo o logaritmo decimal da atividade mostrado entre parêntesis.	58
Tabela 29.	Variação da atividade da GOD frente à concentração da glicose.	59
Tabela 30.	Acúmulo de água oxigenada no meio reacional resultante da oxidação da glicose pela GOD, deixada previamente em contato por 5min com diferentes quantidades do referido produto (*0,030mg.mL ⁻¹ , **0,060 mg.mL ⁻¹ , ***0,30 mg.mL ⁻¹ e ****0,60 mg.mL ⁻¹).	60
Tabela 31.	Atividade da GOD frente a diferentes concentrações de glicose na ausência e na presença de H ₂ O ₂ (concentração inicial de 0,036 mg.mL ⁻¹).	62
Tabela 32.	Valores médios obtidos no estudo do efeito da vazão específica (D).	63
Tabela 33.	Valores médios obtidos nos estudos do efeito da temperatura e do pH.	64
Tabela 34.	Parâmetros termodinâmicos da glicose oxidase estimados para 318K.	65
Tabela 35.	Resinas aniônicas (Dowex® 1x2, 4 e 8) empregadas como suporte para a imobilização de glicoseoxidase (razão da glicoseoxidase/resina: 0,219mg de proteína/100mg de resina seca) [32°C, pH5,5, 100 rpm durante 4horas]., valores de índices de adsorção (IA, %) e as respectivas velocidades de reação média obtidas quando empregadas no biorreator da "Bioengineering®" [condição do ensaio: agitação entre 100 e 150rpm, 2,5mM de glicose, pH 5,5, 30°C, D= 6h ⁻¹ e membrana de 100kDa].	67
Tabela 36.	Valores da velocidade de reação da glicoseoxidase imobilizada referentes ao estudo do efeito do pH, temperatura e empregando membranas de ultrafiltração ou de microfiltração.	72
Tabela 37.	Parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica da glicoseoxidase imobilizada (0,219mg de proteína/100mg de resina) calculados para 318K empregando-se membrana de 100kDa ou de 5µm.	72
Tabela 38.	Resultados experimentais referentes à separação da mistura de açúcares (altura do leito: 3,5cm: Ensaio B-4).	75

Tabela 39.	Coeficientes de distribuição dos açúcares.	77
Tabela 40.	Fator de separação (α) dos açúcares.	77
Tabela 41.	Valores de K_d e do α obtidos para os açúcares tanto individualmente quanto na separação da mistura das oses em ambos os tipos de resina catiônica.	78
Tabela 42.	Concentração de frutose estimada após a coleta da terceira amostra da separação cromatográfica e dos ciclos efetuados.	83
Tabela 43.	Valores médios da velocidade de reação e da conversão obtidos empregando ambas as enzimas imobilizadas no reator da "Bioengineering".	85
Tabela 44.	Valores médios da velocidade de reação e da conversão obtidos empregando ambas as enzimas imobilizadas na célula de filtração da Millipore®.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ou Abs- absorvância
 [AG]- concentração de ácido glicônico (mmol)
 [ART]- concentração de açúcares redutores totais (mmol)
 BM- biorreator com membrana
 CI- coeficiente de imobilização (%)
 CMC- carboxi -metil-celulose
 CMS- "carbon molecular sieves"
 CSTR- "continuous stirred tank reactor" (reator de tanque continuamente agitado)
 CSTR-TRAD - reator de tanque continuamente agitado do tipo tradicional
 D- vazão específica de alimentação (h^{-1})
 Da- Dalton
 DEAE-dietil-amino-etil-celulose
 DNA- ácido desoxirribonucleico
 DVB- divinil benzeno
 Ea- energia de ativação (kJ.mol^{-1})
 E'a- energia de inativação térmica (kJ.mol^{-1})
 EMRB- Enzyme membrane reactor of Bioengineering
 f- função
 [F]- concentração de frutose (mmol)
 FAD- flavina adenina dinucleotídeo
 FADH_2 - flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
 FOS- frutoligossacarídeos
 G- energia livre (kJ.mol^{-1})
 [G]- concentração de glicose (mmol)
 GOD- glicoseoxidase
 GODli- glicose oxidase e invertase (forma imobilizada)
 GODIs- glicoseoxidase e invertase (forma solúvel)
 h- constante de Planck ($3,978 \times 10^{-32} \text{ J.min}$)
 H- entalpia (kJ.mol^{-1})
 HFR- "hollow-fiber reactor" (reator constituído por membranas de filtração tangencial do tipo fibra oca dispostas em um arranjo tipo feixe).
 HFS- "High Fructose Syrup" (xarope com elevada concentração de frutose)
 HTM - "High Test Molasses" (tipo de melaço em que não ocorre a cristalização da sacarose)
 IA- índice de adsorção (%)
 IRA- resina de troca aniônica
 IRC- resina de troca catiônica
 k- constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
 k'- constante de inativação térmica
 K_i - constante de inibição (mM)
 Kd- coeficiente de distribuição
 kDa- quilo Dalton (1kDa corresponde a massa molar de 1000 átomos de hidrogênio)
 K_M - constante de Michaelis-Menten (mM)
 $(K_m)_{ap}$ - constante de Michaelis-Menten aparente (enzima imobilizada)
 K_{Mi} - constante de Michaelis-Menten na presença de peróxido de hidrogênio

k_T - constante de desnaturação térmica
 Log- logaritmo
 M - molaridade (mol.L^{-1})
 mM - milimolar
 nm - nanômetros (comprimento de onda ou porosidade da membrana de nanofiltração)
 N - normalidade
 p - peso
 PA - produto de grau analítico
 PEG - polietileno glicol
 pH - potencial hidrogeniônico
 $p\text{-HEMA-GMA}$ - poli (2-hidroxietil metacrilato-glicidil metacrilato)
 pH_i ou pI - potencial hidrogeniônico isoelétrico
 PTA - proteína total adicionada (mg)
 PTS - proteína total no sobrenadante (mg)
 Q - vazão volumétrica na saída do reator (mL.min^{-1})
 R - constante universal dos gases [$8,31 \text{ J. (K.mol)}^{-1}$]
 R^2 - coeficiente de correlação referente à regressão linear
 r - velocidade de reação [$(\text{mmol}).(\text{h.mg}_{\text{Enzima}})^{-1}$]
 RM - reator de membrana
 rpm - rotação por minuto
 s - segundos
 $[s]$ - concentração de sacarose
 S - entropia [kJ. (mol.K)^{-1}]
 S_s - enzima solúvel
 SI - enzima imobilizada
 T - temperatura ($^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius; temperatura absoluta do meio reacional (K))
 t - tempo (segundo, minuto, hora)
 U - unidade de atividade enzimática para invertase (quantidade em miligramas de ART formado por mililitros do meio reacional)
 U - unidade de atividade enzimática para glicose oxidase (quantidade em mg de peróxido de hidrogênio formado por mililitros do meio reacional)
 UV - ultravioleta
 v_E - velocidade da reação ou atividade enzimática (U.mL^{-1})
 v - volume (mL)
 V - volts
 $V_{\max}$ - velocidade máxima (U.mL^{-1})
 $(V_{\max})_{ap}$ - velocidade máxima aparente (enzima imobilizada) (U.mL^{-1})
 $V_{\max i}$ - velocidade máxima na presença de peróxido de hidrogênio (U.mL^{-1})
 X - conversão (%)

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa (fator de separação)

Δ - delta (diferença de valores)

μ - micra

μg - micrograma

μL - microlitro

μm - micrometros (diâmetro dos poros da membrana de microfiltração)

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Sobre biorreatores	3
2.2	Biorreator com membrana	4
2.3	Sobre as enzimas	8
2.3.1	Invertase	8
2.3.2	Glicose oxidase (GOD)	10
2.4	Sobre os produtos	12
2.4.1	Frutose	12
2.4.2	Ácido glicônico	14
2.5	Aspectos conclusivos	16
3	Objetivos	17
3.1	Objetivo geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
3.3	Variáveis de estudo	17
4	Esquema Geral	19
4.1	Plano geral	19
4.1.1	Sistema bifásico	19
4.1.2	Sistema Monofásico	20
5	Metodologia	21
5.1	Materiais	21
5.1.1	Invertase e glicose oxidase	21
5.1.2	Membranas	21
5.1.3	Resinas	21
5.1.4	Reagentes e vidrarias	21
5.2	Equipamentos	21

5.2.1	Biorreatores	21
5.2.2	Outros	22
5.3	Métodos	22
5.3.1	Método de imobilização da enzima por adsorção	22
5.3.1.1	Imobilização da invertase	23
5.3.1.2	Imobilização da glicoseoxidase	23
5.3.1.3	Imobilização simultânea da invertase e glicoseoxidase	23
5.3.2	Determinação da atividade da glicose oxidase (ensaio padrão)	24
5.3.3	Caracterização da glicoseoxidase	24
5.3.3.1	Efeito do pH na atividade e estabilidade da glicoseoxidase	24
5.3.3.2	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da glicoseoxidase	24
5.3.3.3	Efeito da concentração da glicose na atividade da glicoseoxidase	25
5.3.3.4	Efeito da concentração da H_2O_2 na atividade da glicoseoxidase	25
5.3.3.5	Efeito da concentração da glicose na atividade da glicoseoxidase na presença de H_2O_2	25
5.4	Ensaio no biorreator com membrana (biorreator da “Bioengineering”)	26
5.4.1	Invertase solúvel/imobilizada	
5.4.2	Glicoseoxidase (GOD) solúvel	26
5.4.3	Glicoseoxidase e invertase na forma solúvel ou imobilizada	27
5.5	Ensaio na célula de ultrafiltração e microfiltração da Millipore®	27
5.6	Separação de açúcares (frutose e glicose) através da cromatografia de troca iônica	27
5.6.1	Preparo da resina catiônica	28
5.6.2	Estudo de retenção da glicose e frutose na resina	28
5.6.3	Separação das hexoses	28
5.6.4	Procedimento dos ciclos	28
5.7	Determinações analíticas	29
5.7.1	Dosagem de proteína	29
5.7.2	Dosagem de açúcares redutores totais (ART)	29
5.7.3	Determinação da glicose (método enzimático)	29
5.7.4	Determinação de água oxigenada	30
5.7.5	Determinação de oxigênio dissolvido	30

5.8	Análise dos resultados	30
5.8.1	Eficiência da imobilização da invertase em resina Dowex	30
5.8.2	Coeficiente de imobilização (CI) no processo contínuo	31
5.8.3	Eficiência da separação cromatográfica	31
5.8.4	Cálculos dos resultados obtidos no biorreator	31
5.8.5	Cálculos da concentração de frutose formada	31
5.8.6	Cálculo da concentração de sacarose consumida	33
5.8.7	Cálculo do grau de conversão da reação de hidrólise da sacarose	33
5.8.8	Cálculo da velocidade de reação ou produtividade	33
5.8.9	Cálculo das constantes cinéticas das enzimas	34
5.8.10	Cálculo dos parâmetros termodinâmicos	34
5.8.11	Cálculo da água oxigenada formada, glicose consumida e ácido glicônico formado	34
6	Resultados e discussão	35
6.1	Experimentos realizados	35
6.1.1	Tabela de experimentos	35
6.1.1.1	Invertase	35
6.1.1.1.1	Ensaio no biorreator com membrana	35
6.1.1.2	Glicoseoxidase	36
6.1.1.2.1	Ensaio em batelada	36
6.1.1.2.2	Ensaio no biorreator com membrana ("Bioengineering®")	36
6.1.1.2.3	Imobilização da glicoseoxidase	37
6.1.1.2.4	Ensaio no biorreator da "Bioengineering®" com glicoseoxidase imobilizada em Dowex®1x4:200	37
6.1.1.2.5	Ensaio no biorreator da "Bioengineering®" com ambas as enzimas imobilizadas	38
6.1.1.2.6	Ensaio na célula de ultrafiltração da Millipore®	38
6.1.1.3	Separação cromatográfica	39
6.2	Invertase	40
6.2.1	Efeito da concentração da sacarose na atividade invertásica	43
6.2.2	Efeito do pH	49

6.2.3	Efeito da temperatura	50
6.3	Glicoseoxidase	53
6.3.1	Caracterização da glicoseoxidase (ensaio em batelada)	53
6.3.1.1	Efeito do pH na atividade da GOD	53
6.3.1.2	Efeito do pH na estabilidade da GOD	54
6.3.1.3	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da GOD	56
6.3.1.3.1	Efeito da temperatura na atividade da GOD	56
6.3.1.3.2	Estabilidade da GOD frente à temperatura	58
6.3.1.3.3	Efeito da concentração da glicose na atividade da GOD	59
6.3.1.3.4	Efeito da concentração de H_2O_2 na atividade da GOD	60
6.3.1.3.5	Efeito inibitório da água oxigenada sobre a atividade da GOD	61
6.3.2	Biorreator com membrana da "Bioengineering" operando com a GOD	63
6.3.3	Imobilização da glicoseoxidase e desempenho no biorreator com membrana.	66
6.4	Separação cromatográfica	74
6.4.1	Estudo de retenção da glicose e frutose na resina	74
6.5	Ensaio no biorreator de membrana empregando invertase e glicoseoxidase simultaneamente na forma solúvel ou imobilizada	84
7	Conclusões	89
7.1	Comentário geral	89
7.2	Invertase	89
7.2.1	Ensaio no biorreator da "Bioengineering"	89
7.3	Glicoseoxidase	90
7.3.1	Caracterização da glicose oxidase - Ensaio realizado num reator do tipo batelada	90
7.3.2	Ensaio no biorreator da "Bioengineering"	90
7.3.2.1	Glicoseoxidase na forma solúvel	90
7.3.3	Imobilização da glicoseoxidase em resina aniônica do tipo Dowex®	91
7.3.3.1	Desempenho da glicoseoxidase imobilizada no reator da "Bioengineering"	91
7.4	Separação cromatográfica	91

7.5	Sistema constituído por ambas as enzimas solúveis e imobilizadas	92
7.5.1	Desempenho da invertase e glicoseoxidase solúveis no reator da “Bioengineering”	92
7.5.2	Desempenho da invertase e glicoseoxidase imobilizadas no reator da “Bioengineering”	92
7.5.3	Desempenho da invertase e glicoseoxidase imobilizadas na célula de filtração da Millipore®	92
8	Referências bibliográficas	93

1. Introdução

O presente trabalho refere-se ao estudo da conversão da sacarose, um substrato barato e abundante, em produtos de maior valor agregado (frutose e ácido glicônico), de amplo uso em vários segmentos industriais e, inclusive importados pelo Brasil.

Considerando que as enzimas, devido às suas propriedades inerentes permitem a obtenção de alta percentagem de conversão em condições brandas, foi estudada a aplicação seqüencial e conjunta do sistema invertase/glicose oxidase sobre a sacarose e derivados, utilizando-se reator com membrana (RM) operado de modo contínuo e em regime permanente.

Ao longo de mais de 10 anos, os processos de imobilização da invertase vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Enzimologia Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP/São Paulo – e, salienta-se que a metodologia de imobilização se encontra em processo de patenteamento intitulado “Método de imobilização de enzima em suporte inerte e complexo resina-enzima assim obtido” (nº. do Protocolo 002904).

Neste trabalho, foi explorado, o aspecto referente ao emprego da invertase imobilizada em Dowex® (um copolímero de poliestireno-divinilbenzeno) para a hidrólise da sacarose bem como da glicose oxidase (GOD) e de ambas as enzimas imobilizadas no mesmo suporte. O uso da enzima na forma imobilizada em um reator de membrana tem a vantagem de possibilitar o uso de membranas com diâmetro de poro da ordem de 5µm, o que permite trabalhar com o fluxo elevado e/ou operar o reator sob menor pressurização. Foram utilizados especificamente o sistema Dowex® 1x4:200/invertase, 1x4:200/GOD e 1x4:200/GOD-invertase por apresentar alta capacidade de retenção das moléculas de invertase/glicose oxidase, estabilidade mecânica (as partículas da resina mantêm a forma por longos períodos sob agitação moderada), térmica e química (frente ao pH).

Destaca-se que o desenvolvimento deste processo poderá ter aplicação em empresas sucro-alcooleiras nacionais, visto que os materiais empregados do RM, normalmente fazem parte do fluxo produtivo de empresas do gênero, não se esperando maiores dificuldades de ordem técnica.

No caso de se utilizar o sistema sacarose/invertase/GOD, como proposto neste projeto, a obtenção da frutose envolveu as etapas, a saber, dissolução da

sacarose e conversão enzimática em frutose e ácido glicônico. Este processo quando comparado ao da isomerização da glicose em frutose é mais simples e, por conseguinte, poderá ser mais econômico. Finalmente, o desenvolvimento deste processo não só permitirá usufruir o sinergismo da associação invertase/glicose oxidase, enzimas bastante usadas separadamente assim como os produtos resultantes, mas também propiciará uma adequada gestão ambiental, por gerar resíduos inócuos e em pequenas quantidades, por exigir baixo consumo de recursos energéticos e por utilizar matérias-primas de baixo custo ou abundante (sacarose) ou, ainda, residuais (melaço de cana-de-açúcar).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Sobre os Biorreatores

As bioconversões, reações químicas catalisadas por enzimas, células ou organelas celulares e executadas em meio com alta ou baixa atividade de água, vêm apresentando interesse crescente na síntese orgânica (ROCHA-FILHO, VITOLO, 1998; COLE-HAMILTON, 2003; SCHOEMAKER, MINK & WUBBOLTS, 2003).

O sucesso da biocatálise se deve ao fato da transformação poder ser rigorosamente controlada e conduzida de modo contínuo sob condições brandas de pH e temperatura, favorecendo a manipulação de substâncias sensíveis a condições extremas de processo. Associam-se, também, a alta seletividade (do ponto de vista químico, da regioseletividade e enantioseletividade), a formação de efluentes menos tóxicos e facilmente tratáveis e a possibilidade de se executarem reações simultâneas (BOMMARIUS, 1993; GORTON, *et al.*, 1994). A disponibilidade de biocatalisadores têm aumentado em decorrência dos avanços da biotecnologia (novas técnicas de cultivo celular, isolamento e manipulação genética: cruzamentos, mutações, DNA recombinante, hibridoma), resultando em aumento do número de aplicações em processos industriais, dentre os quais citam-se, a conversão da insulina suína em humana, a produção de aspartame, acrilamida e de penicilinas semi-sintéticas (SMITH, 1996; ABRAHÃO-NETO, 2001; ROCHA-FILHO, VITOLO, 1998). Um outro aspecto a destacar, é a competição vantajosa da biocatálise, quando possível de ser aplicada, frente aos processos tradicionais de extração (fortemente dependente da disponibilidade da matéria-prima e baixo rendimento em produto final), fermentação (só é econômica, quando se operam grandes volumes) e de síntese química.

A eficiência da biocatálise depende do binômio biocatalisador/biorreator.

Os biorreatores são equipamentos nos quais um agente de natureza biológica (células, enzimas, organelas celulares ou anticorpos) é utilizado para transformar um dado substrato em produto (GIORNO, DRIOLI, 2000).

Em termos operacionais o biorreator pode ser do tipo descontínuo ou contínuo.

O biorreator descontínuo, no qual o tempo de residência é igual para reagentes, produtos e catalisador, é preferido nos casos em que o biocatalisador é barato, não requer cofator ou possui meia-vida curta (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001). Apesar de ser o tipo mais simples para operar e modelar, tem o inconveniente

de dificultar ou até mesmo impossibilitar a recuperação do biocatalisador no final do processo (ILLANES, 1994). No caso do biocatalisador ser solúvel, uma enzima por exemplo, dever-se-ia adaptar na linha de saída uma unidade de ultrafiltração, a qual permitiria recuperá-lo e reciclá-lo no processo (CURCIO, CALABRÓ & IORIO, 2002; LATHOUDER *et al.*, 2005). Por outro lado, se o biocatalisador é suscetível à inibição por substrato, passa a ser recomendável o emprego do processo descontínuo-alimentado, porque ao se adicionar o substrato paulatinamente ter-se-ia a possibilidade de manter sua concentração abaixo do limite inibitório (SENGUPTA, MODAK, 2001).

O biorreator contínuo surgiu como uma extensão aplicativa da técnica de imobilização de biocatalisadores, introduzida efetivamente no início da década de setenta. Com o biocatalisador ligado por método físico ou químico em matrizes inertes e insolúveis foi possível operar biorreatores contínuos com diferentes configurações, a saber, colunas com o material imobilizado empacotado (reator de fluxo pistonado) ou mantido suspenso em meio líquido através da alimentação da solução substrato sob pressão gerada por bomba peristáltica (reator de leito fluidizado) (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

Uma variante para manter o biocatalisador imobilizado em suspensão é o biorreator de tanque continuamente agitado (CSTR), cuja configuração básica seria a de um reator descontínuo, ao qual se adaptou um sistema contínuo de introdução e de retirada de material. Os biorreatores dos tipos leito fluidizado e tanque continuamente agitado não possuem problemas relacionados ao estabelecimento de gradientes radiais ou axiais de pH, temperatura e concentrações de substrato e produto (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

Em geral, o biorreator tipo tanque continuamente agitado acaba sendo a primeira escolha para o desenvolvimento de um novo processo, porque possui grande flexibilidade operacional (por exemplo, pode-se trabalhar com um amplo intervalo de velocidades de agitação) e de utilização (não é desenhado para um processo em particular, podendo, inclusive, ser usado na configuração descontínua).

2.2. Biorreator com membrana

No contexto dos biorreatores contínuos, merece atenção o biorreator com membrana (BM), que pode ser configurado de dois modos distintos, a saber, reator continuamente agitado (CSTR) ao qual se acopla uma membrana ou um recipiente

cilíndrico desprovido de sistema de agitação contendo grande número de membranas de filtração tangencial do tipo fibra oca dispostas em um arranjo tipo feixe. Este último tipo de BM é conhecido pelo nome "hollow-fiber reactor" (HFR).

Segundo GIORNO e DRIOLI (2000), em um biorreator com membrana, que não o HFR, o arranjo biocatalisador/membrana pode ser de dois tipos. Em um deles o biocatalisador não está ligado à membrana, a qual, neste caso, atua como uma unidade de separação, impedindo o escape do biocatalisador no permeado. No outro tipo, o biocatalisador encontra-se unido à membrana, a qual atua tanto como sítio de catálise quanto como unidade de separação. Quando não há interação entre o biocatalisador e a membrana, tem-se as situações em que a membrana está em um módulo acoplado em série ao biorreator (caso de um CSTR típico), sendo o biocatalisador impelido e removido continuamente de sua superfície (caso em que o biocatalisador é reciclado ao CSTR) ou o biocatalisador é confinado dentro do módulo com a membrana (caso em que não há reciclo do biocatalisador).

Existe, também, o arranjo em que o CSTR tem uma membrana como integrante de sua base (nesta configuração o sistema funciona como CSTR e módulo de separação simultaneamente, sem a necessidade de reciclo). Quando existe união entre o biocatalisador e a membrana, pode-se ter o biocatalisador aprisionado na membrana, depositado na forma de gel sobre a superfície da membrana ou ligado através de interação química (adsorção, ligação iônica ou ligação covalente). Para este caso, pode-se, também, dispor de um único sistema CSTR/módulo de separação (GIORNO, DRIOLI, 2000).

Os biorreatores com membrana aparecem como alternativa viável aos reatores tradicionais de enzimas imobilizadas (leito fixo, CSTR-TRADicional, leito fluidizado), já que o biocatalisador não precisa estar necessariamente ligado a um suporte insolúvel (PRAZERES, CABRAL, 1994). Neste último aspecto, diferencia-se do reator agitado tradicional (CSTR-TRAD), embora mantenha todos os atributos favoráveis deste tipo de reator contínuo. Lembra-se que o BM, em princípio, permite integrar em uma única etapa a conversão catalítica, a separação/concentração do produto e a recuperação do biocatalisador. Estes aspectos podem promover significativa produtividade e redução de custos por ocasião da ampliação de escala (GIORNO, DRIOLI, 2000). O BM apresenta as seguintes vantagens: catálise homogênea, ausência de limitações difusionais, estéricas e conformacionais, alta atividade por unidade de volume, possibilidade de se trabalhar em condições

assépticas, produtividade constante garantida pela constância da dosagem da enzima e possibilidade de uso de sistemas multi-enzimáticos (ALFANI, *et al.*, 1999).

Os primeiros estudos sobre os biorreatores com membrana tiveram início em 1970, resumindo-se na tentativa de hidrolisar o amido à glicose, usando α -amilase retida em um sistema de filtração convencional. O principal problema observado relacionou-se à concentração de polarização da membrana, acarretando diminuição do fluxo ao longo do tempo e perda da enzima. O BM só começou a se tornar viável após os avanços ocorridos na tecnologia de membranas, as quais passaram a ser produzidas com espessura adequada, diâmetro e formato dos poros uniformes (microfiltração: 0,1 – 0,5 μ ; ultrafiltração: 0,001 μ - 0,1 μ ; nanofiltração: menor que 2 nm), além das características químicas definidas das mesmas (hidrofílicas, hidrofóbicas, neutras ou carregadas), as quais resultam da natureza dos materiais empregados, a saber, polímeros orgânicos (por exemplo, polisulfonas, celulose, acetato de celulose, politetrafluoretileno) e inorgânicos (FANE, CHANG, 2002; SHIN, KANG, 2003).

O BM configurado como CSTR é o mais usado, podendo-se identificar estudos recentes preconizando sua aplicação na obtenção de ciclodextrinas (SLOMINSKA, SZOSTEK & GRZESKOWIAK, 2002), frutoligossacarídeos (SHEU, *et al.*, 2002; SANGEETHA, RAMESH & PRAPULLA, 2005), catecol (BOSHOF, BURTON & BURTON, 2003), proteólise da caseína (CURCIO, CALABRÓ & IORIO, 2000), da hemoglobina (BELHOCINE, *et al.*, 2000) e síntese de ésteres (Lozano *et al.*, 2004).

GIORNO e DRIOLI (2000) identificaram o uso do BM nos setores agro-alimentar (na hidrólise da pectina por pectinase em sucos de fruta, em enologia, na remoção da lactose do soro e/ou leite integral e modificação de óleos e gorduras), químico-farmacêutico (dentre outros, citam-se a título de exemplos, as conversões do ácido fumárico e L-aspartico, respectivamente, em ácido L-aspartico e L-alanina, a obtenção do ibuprofeno a partir de seu ciano-éster e a obtenção de oligonucleotídeos a partir de DNA) e biomédico (órgãos artificiais para uso extra-corpóreo). Recorda-se, também, que o BM configurado desta maneira, foi objeto de uma das primeiras patentes (de propriedade da Degussa AG/GBF) visando o seu uso industrial em processo contínuo para a produção de L-aminoácidos (metionina e valina), estando a aminoacilase retida em uma membrana de ultrafiltração (BOMMARIUS, 1993).

O BM configurado como HFR mostrou-se útil no caso de se usar células íntegras (de origem animal ou microbiana) como biocatalisadores (CALABRÓ, CURCIO & IORIO, 2002; GOVENDER, *et al.*, 2003). Lembra-se que o HFR, atualmente, está sendo preconizado no tratamento de águas residuais, usando o lodo ativado como “biocatalisador” (WINTGENS, *et al.*, 2003) ou, ainda, como simples sistema de microfiltração (KANG, LEE & KIM., 2003; LESJEAN *et al.*, 2004), bem como de ultrafiltração para a sanitização da água (ARNAL *et al.*, 2004) e quando combinado com o tratamento biológico prévio da biomassa, a conjunção deste com o uso da membrana mostrou-se muito mais eficiente (NAKLA, *et al.*, 2006).

Embora o transporte através da membrana possa se dar por difusão (a separação se baseia, apenas, no gradiente de concentração estabelecido entre as duas faces da membrana) ou por convecção (resultante do estabelecimento de um gradiente de pressão ou temperatura através da membrana), os BM mais usados, que requerem fluxos elevados, valem-se deste último mecanismo de transporte (CURCIO, CALABRÓ & IORIO, 2002).

A direção do fluxo introduzido no BM e a travessia do fluido através da membrana podem ser paralelos (ambos perpendiculares à superfície da membrana) ou perpendiculares entre si (o fluido alimentado tangencia a superfície da membrana e a travessia se dá perpendicularmente à superfície da mesma) (CURCIO *et al.*, 2002). Este último padrão de operação do BM é o mais indicado para evitar o fenômeno da polarização da membrana (PESSOA-Jr, KILIKIAN, 2001; BYHLIN, JONSSON, 2002). Caso se faça o reciclo do efluente, a eficiência do BM é, ainda, mais aumentada. Atualmente o custo das membranas não afeta substancialmente o custo global do reator, porque são bastante estáveis e podem ser regeneradas várias vezes. Por isso, ao invés de minimizar a área da membrana para um determinado fluxo, prefere-se fornecer área de membrana suficiente para otimizar o tempo de operação de um BM (BOMMARIUS, 1993).

Apesar da retenção de enzimas por membranas e a imobilização em suportes sólidos serem consideradas duas técnicas distintas de retenção do biocatalisador, a linha divisória entre elas não é nítida, sobretudo quando se imagina a membrana como uma superfície de imobilização, sendo o BM, neste caso, considerado como um tipo especial de reator para enzimas imobilizadas.

Finalmente, os biorreatores de membrana podem ser utilizados em escala de laboratório para monitoramento contínuo da atividade de enzimas, avaliando-se a desativação por pH ou pela temperatura em condições operacionais. Pode ser útil, também, na identificação de mecanismos de inibição enzimática. Em escala industrial para recuperação e reutilização de biocatalisadores solúveis, na facilidade de separação dos produtos e como técnica de reator de enzimas imobilizadas com elevada área superficial.

2.3. Sobre as Enzimas

A conversão enzimática da sacarose pela ação sucessiva ou simultânea da invertase e da glicose oxidase, permite obter a frutose e o ácido glicônico, dois produtos de amplo uso nas indústrias alimentícia (frutose), farmacêutica (ácido glicônico e frutose) e química (ácido glicônico).

2.3.1. Invertase

A invertase (EC.3.2.1.26, β -fructofuranosídeo fructohidrolase) é uma enzima que catalisa a hidrólise de carboidratos β -fructofuranosídicos, devendo o grupo β -fructofuranosil, que é parte da molécula do substrato que se encaixa no sítio ativo da enzima, possuir todas as suas hidroxilas livres (VITOLO, 2004).

A invertase é uma glicoproteína (possui cerca de 30 cadeias de manana por molécula de proteína) que se localiza na parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*, sua principal fonte, tendo massa molar de 270 kDa. Possui estrutura quaternária formada por duas cadeias peptídicas, mas que podem se aglutinar formando agregados supra moleculares tetra, hexa e/ou octaméricos apresentando atividade catalítica e termoestabilidade crescentes (READY, MALEY, 1990; DE QUEIROZ, *et al.*, 1996; VITOLO, 2004). É estável a temperaturas entre 30 e 50° C e pH: 3,5 – 5,5 (sendo o ótimo igual a pH=4,6). Observa-se para esta enzima, que a velocidade da reação diminui frente à concentrações de sacarose superiores à 120 g.L⁻¹, como consequência do aumento da viscosidade do meio reacional e/ou diminuição da atividade de água (ALMEIDA-CUNHA, VITOLO, 1984; TREVISAN, 1993; VITOLO, 2004).

No caso da hidrólise da sacarose, obtém-se o açúcar invertido (mistura equimolar de glicose e frutose com poder rotatório levógiro) que possui índice de dulçor superior ao do dissacarídeo e não cristaliza com facilidade. Lembra-se, ainda,

que a hidrólise da sacarose pode ser feita por via ácida em reator contínuo operado em contracorrente, obtendo-se, no entanto, um produto contaminado por compostos resultantes das modificações sofridas pelas hexoses (glicose e frutose, no caso) nas condições de processo (75-80° C e meio fortemente ácido). Por esse motivo, o xarope invertido por via ácida deve ser submetido a tratamentos de purificação, enquanto que nenhum tratamento extra é necessário para o xarope oriundo da hidrólise enzimática (processo executado à 37-40° C e pH: 4,5 – 5,0).

Porém, o emprego da enzima na forma solúvel tem a desvantagem de obrigar o uso de reator descontínuo com a conseqüente impossibilidade de recuperação do biocatalisador. Este aspecto torna o processo enzimático mais caro que o ácido. Portanto, o desafio da hidrólise enzimática continua sendo a disponibilidade da invertase na forma imobilizada, o que possibilitaria sua reutilização e o emprego de reator contínuo (VITOLLO, 2004).

A invertase tem sido imobilizada por diversas técnicas e em muitos tipos de suportes (TOMOTANI, 2002), além de seu desempenho ter sido, também, estudado em reatores de membrana (ALFANI, *et al.*, 2000). As características favoráveis já apontadas para este tipo de biorreator, a eficiência e a disponibilidade comercial da invertase, estimulam os estudos para viabilizar o uso do biorreator de membrana contendo invertase na hidrólise da sacarose. Tanto é verdade que a mesma tem sido imobilizada em membrana microporosa p-HEMA-GMA [poli (2-hidroxietil metacrilato-glicidil metacrilato)] covalentemente para verificar a viabilidade do seu uso na área analítica como biosensor bem como nos reatores para a hidrólise da sacarose (DANISMAN, *et al.*, 2004).

Recentemente, no entanto, surgiu na literatura um trabalho preconizando o uso da invertase em reator de leito fixo, tendo a enzima sido imobilizada em um filme de poli-2-hidroxietilmetacrilato-co-glicidilmetacrilato (BAYRAMOGLU, *et al.*, (2003).

Lembram-se, também, os usos potenciais e/ou reais desta enzima em confeitaria, na preparação do HTM ("High Test Molasses", tipo de melaço em que não ocorre a cristalização da sacarose) (VITOLLO, VAIRO & BORZANI, 1985), em biossensores (BARLIKOVA, 1991), como enzima-modelo em estudos de liofilização e/ou congelamento/descongelamento (BREDA, *et al.*, 1992) e na avaliação da aplicabilidade de novos suportes inertes para a imobilização de enzimas (De QUEIROZ, *et al.*, 2002).

2.3.2. Glicose oxidase (GOD)

A glicoseoxidase (EC.1.1.3.4) (GOD) é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da glicose em ácido glicônico e água oxigenada. A enzima é específica para β -D-glicose, e não atua no isômero α . Entretanto, é capaz de oxidar D-glicose total, considerando que por mutarrotação o isômero α é transformado em isômero β . Ela também oxida 2 deoxi-D-glicose, D-manose e D-frutose mas a uma velocidade muito menor. Durante a catálise enzimática, a D-glicose é oxidada primeiramente a gliconolactona com simultânea redução do FAD a FADH₂. Na segunda etapa da reação, o FADH₂ é re-oxidado pelo oxigênio molecular produzindo peróxido de hidrogênio (PERALTA, MARQUES de SOUZA & BÔER, 2004).

A GOD tem massa molar entre 150 e 190 kDa, dependendo da fonte da qual foi obtida, sendo constituída por 16% de carboidratos (manose, galactose e glicosamina na forma N-acetil), duas cadeias polipeptídicas idênticas ligadas por pontes de dissulfeto, tendo cada subunidade um íon Fe⁺² e uma molécula de FAD (CRUEGER, 1990). O K_M da GOD situa-se na faixa entre 15 mM a 100 mM, dependendo da fonte da enzima. Segundo RABA, MOTTOLA (1995), o K_M para a GOD de *Aspergillus niger* é igual a 15 mM, a molécula absorve intensamente nos comprimentos de onda 278nm, 380nm e 460nm, a absortividade molar a 450 nm é de $1,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, coeficiente de sedimentação de 7,93s (em água a 20° C). coeficiente de difusão (em água a 20° C) de $5,02 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e massa molar de 154 kDa. A enzima tem pH_{ótimo} = 5,6, pI= 4,2, estabilidade frente ao pH entre 4,0 e 6,0, mantendo cerca de 50% de sua atividade inicial em valores de pH entre 3,5 e 7,0 (PAZUR, 1966; TREVISAN, 1993; CRUEGER, 1990). A glicoseoxidase atua bem a temperaturas entre 30° C e 40° C, sendo instável frente a temperaturas acima de 50° C (CRUEGER, 1990; TREVISAN, 1993).

Segundo RABA, MOTTOLA (1995) a GOD é uma das enzimas mais usadas, tanto na forma solúvel quanto imobilizada, dentre todas aquelas disponíveis no momento. Isto se deveria a sua alta especificidade pela glicose, uma substância de ocorrência generalizada tanto a nível laboratorial (análises clínicas, por exemplo) quanto industrial (fermentação alcoólica, por exemplo), cuja concentração quase sempre precisa ser determinada.

Dentre as aplicações preconizadas ou efetivas da GOD na forma solúvel tem-se: a) em kits enzimáticos para dosagem da glicose em solução (VASILEVA, GODJEVARGOVA, 2004; GODFREY, WEST, 1996); b) na indústria de alimentos,

neste caso associada à catalase, para a desglicosação de ovos e como agente estabilizador das propriedades organolépticas de alimentos em geral (cerveja, peixe durante a refrigeração, enlatados e refrigerantes) (CRUEGER, 1990; PERALTA, MARQUES de SOUZA & BÔER, 2004); c) em medicamentos anti-cancerígenos, cujo efeito se deveria à formação da água oxigenada *in situ*, que, por sua vez, participaria na formação de radicais livres deletérios às células tumorais (RABA, MOTTOLA, 1995; SANTOS, 2001); d) na estimativa da transferência do oxigênio em processo fermentativo semi-sólido (ZHAO, *et al.*, 2002).

O uso da GOD na forma imobilizada parece dominar atualmente os estudos para a aplicação desta enzima. Dentre seus empregos efetivos ou previstos tem-se: a) a marcação de antígenos e anticorpos na técnica da enzimaímunoensaio (ELISA) (RABA, MOTTOLA, 1995); b) em biossensores, sozinha, associada a outras enzimas ou a complexos inorgânicos (VOJINOVIC, *et al.*, 2005; LIU, *et al.*, 2004; MORCILLO, *et al.*, 2002; CRUEGER, 1990). Inclusive, WILLNER (2002) propôs o acoplamento de dois eletrodos enzimáticos (um contendo a GOD e o outro citocromo c / citocromo oxidase) para confeccionar uma célula de biocombustível, que no futuro poderia ser usada como marca-passo implantado no paciente, obtendo a energia para seu funcionamento a partir da oxidação da glicose corpórea. TRAU, RENNEBERG, (2003), por sua vez, propuseram para uso em biossensores a GOD aprisionada em polímeros orgânicos (hidroclorato de poli-alilamina, poli-4-estirenosulfonato de sódio, ácido poli acrílico, por exemplo) na forma de filmes com espessuras situadas entre 5nm e 500 μm . Dentro desta mesma linha, merece menção o trabalho de FANG, *et al.* (2002), no qual foi descrito o aprisionamento da GOD em camadas formadas com nanopartículas de sílica (diâmetros entre 9 e 45 nm) ou de magnetita (diâmetro=12nm), propiciando a miniaturização do biossensor. Acrescenta-se o eventual aumento do desempenho do dispositivo, quando submetido a um campo magnético de baixa intensidade, devido à ligeira agitação no seio da película promovida pelos grânulos de magnetita; c) em reatores para a conversão da glicose em ácido glicônico. Neste caso, dispõe-se de reatores de dimensões reduzidas para fins puramente analíticos (dosagem da glicose “on line”; acoplados a aparelhos analíticos ou diretamente ao reator) ou de maior porte em plantas industriais (geralmente para a produção de ácido glicônico a partir da glicose). Pela literatura observa-se que os reatores empregados são do tipo leito fixo em sua maioria, porém, quando claramente do tipo BM, a GOD acha-se unida à membrana (RABA,

MOTTOLA ,1995; CRUEGER, 1990; GIORNO, DRIOLI, 2000, BRAHIM, NARINESING & GUISEPPI-ELIE, 2002).

Recentemente foi descrito um biorreator do tipo leiteo fluidizado, usando ar comprimido como agente mantenedor da fluidez do leiteo, carregado com glicoseoxidase aprisionada dentro de lipossomas, que, por sua vez, foram ligados covalentemente à quitosana (WANG, *et al.*, 2003; YOSHIMOTO, *et al.*, 2003).

Os preparados comerciais da glicoseoxidase obtidos do *A.niger* são geralmente contaminados pela catalase, o que, dependendo da aplicação da enzima, pode ser ou não vantajoso (caso de biossensores calibrados para a medida amperométrica da água oxigenada formada na oxidação da glicose). No processo de conversão da sacarose a ácido glicônico e frutose pelo sistema invertase/GOD a presença da catalase é vantajosa, porque ao decompor a água oxigenada há a liberação do O₂, que ao reduzir o FAD regenera a atividade catalítica da GOD.

2.4. Sobre os Produtos

2.4.1. Frutose

Até a década de setenta , a frutose era produzida tradicionalmente a partir de soluções de açúcar invertido, usando o método do frutonato de cálcio para separação. Este envolve a mistura de hidróxido de cálcio com soluções de açúcar invertido, tratamento com dióxido de carbono e separação do carbonato de cálcio, seguido de evaporação à vácuo e cristalização fracionada do frutonato de cálcio. A partir de 1964 a frutose passou a ser produzida em escala industrial, usando resinas de troca iônica para sua separação do açúcar invertido (CRUEGER, CRUEGER, 1984).

A frutose, também, pode ser produzida por isomerização da glicose, utilizando-se a enzima glicose-isomerase e produzindo-se xaropes com elevada concentração de frutose (HFS- High Fructose Syrup). Os xaropes de frutose, que são uma mistura de frutose e glicose de elevada viscosidade, são muito parecidos ao mel e a principal fonte de dextrose industrial são os hidrolisados de milho (COKER, VENKATASUBRAMANIAN, 1985a).

A introdução do processo de isomerização da glicose pela glicose-isomerase imobilizada revolucionou o mercado de adoçantes em países não produtores de cana-de-açúcar, como EUA e Canadá, a tal ponto que já em 1984 o xarope de frutose correspondia a 34% do mercado de adoçantes nestes dois países,

lembrando-se que o processo começou a ser operado em escala industrial em 1977/1978 (COKER, VENKATASUBRAMANIAN, 1985b). Neste processo, o hidrolisado amiláceo contendo 94 a 96% em peso de glicose é introduzido em reatores contínuos de leito fixo, sendo o tempo de residência da ordem de 4h. Como a reação catalisada pela glicose-isomerase leva a um equilíbrio em partes iguais de glicose e frutose ($K_{eq} = 1$), cujo equilíbrio leva muito tempo para ser alcançado, prefere-se obter um xarope com 42% de conversão. Antes de ser concentrado, o xarope contendo a mistura frutose (42% p/p) e glicose (53% p/p) é tratado sucessivamente com carvão ativo e resina de troca iônica. Os xaropes com teor em frutose superior a 42%, por sua vez, possuem alta demanda de mercado, então o xarope resultante do isomerizador é passado por colunas cromatográficas, valendo-se da característica da frutose ser adsorvida por grupos catiônicos com maior intensidade do que a glicose (PEPPLER, REED, 1987).

Um xarope contendo até 90% de frutose é possível ser obtido. Um arranjo promissor para produzir frutose a partir do hidrolisado de sacarose (açúcar invertido) foi proposto por AZEVEDO, RODRIGUES (2001). A proposta consiste basicamente na execução simultânea da reação e da separação dos produtos, utilizando-se uma série de doze colunas interligadas e dispostas em um circuito fechado, sendo cada uma delas carregada com uma resina que adsorve preferencialmente uma das hexoses. As soluções de invertase e de sacarose seriam introduzidas no sistema em contracorrente e o efluente enriquecido em frutose recolhido em pontos estrategicamente dispostos ao longo do circuito.

Uma outra proposta é citada por ZHANG, *et al.* (2004) que estudaram a produção de xarope de frutose também contendo 90% através de um reator híbrido de leito fluidizado. Estes autores otimizaram esse sistema disposto de dezesseis colunas de adsorção e de sete reatores enzimáticos, onde primeiramente a glicose e frutose são separadas e subsequentemente a glicose é catalisada pela ação da isomerase imobilizada. A produção do xarope de frutose embora tenha sido similar ao do convencional, o novo sistema apresentou um melhor aproveitamento das resinas. Os reatores e as colunas de adsorção foram dispostas alternadamente em uma seqüência tal, onde a mistura é introduzida primeiramente na coluna e, então no reator, onde a maior parte da glicose é transformada em frutose (zona 3). Esse sistema foi dividido em 3 seções, onde o efluente vindo da zona 3 contendo baixa concentração tanto de glicose e de frutose é reciclada e utilizada como eluente. A

frutose adsorvida em zona 3 é levada para a zona 1 e 2. A função da zona 2 é permitir a reciclagem da glicose na zona 3, enquanto a maior parte da frutose adsorvida na zona 3 é recuperada na zona 1.

No caso de se utilizar o sistema sacarose/invertase/GOD, como proposto neste projeto, a obtenção da frutose deverá envolver as etapas, a saber, dissolução da sacarose, conversão enzimática em frutose e ácido glicônico, tratamento do efluente com sal de cálcio, centrifugação ou filtração (separação do gliconato de cálcio) e concentração do sobrenadante ou filtrado até alcançar o teor desejado de frutose no xarope final. Pode-se chegar até à cristalização da frutose. Este processo quando comparado ao da isomerização é mais simples e, por conseguinte, poderá ser mais econômico.

2.4.2. Ácido Glicônico

O ácido glicônico para fins comerciais é obtido pela oxidação da glicose, que pode ser feita pelas vias química e biotecnológica (processo enzimático ou fermentativo). O processo químico, quando comparado ao biotecnológico, apresenta como desvantagens notórias o baixo rendimento, a formação de sub-produtos indesejáveis, a poluição ambiental causada pelos agentes oxidantes e o alto grau de pureza da glicose a ser convertida (ERZINGER, 1999). BIELLA, PRATI & ROSSI (2002) e WENKIN, *et al.* (2002) recentemente postularam a retomada da via química, utilizando catalisadores constituídos por metais (bismuto, paládio, platina e/ou ouro) imobilizados em carvão ativo, afirmando obter rendimentos da ordem de 99% para a oxidação da glicose em ácido glicônico. Admitem como única desvantagem deste processo frente ao biotecnológico (fermentativo) o fato de se obter o gliconato e não o ácido livre. Concluem que, uma vez resolvida esta dificuldade, a via química passará a ter vantagens frente à biotecnológica, por esta apresentar problemas intrínsecos como a separação das células, a formação de produtos colaterais e o descarte do líquido fermentado e das células microbianas formadas.

Atualmente a principal via de produção industrial deste composto é a fermentativa, através do cultivo de *Aspergillus niger*, *Gluconobacter suboxydans* ou *Acetobacter methanolicus* (ERZINGER, 2000; VOGELBUSCH GmbH., 2000). O processo fermentativo utilizando o *A.niger* como agente de transformação e realizado a pH = 5,5 e temperatura de 32° C permite obter ácido glicônico com

rendimento de 80% e a uma velocidade específica de produção da ordem de 30 h^{-1} (TAKAMATSU *et al.*, 1981 apud ERZINGER, 2000). A propósito, é oportuno lembrar que a primeira patente relacionada à produção deste ácido por via fermentativa data de 1932 e foi obtida por BERNHAUER & SCHULHOF (ROHR, KUBICEK, 1981 apud ERZINGER, 2000). Salienta-se, também, que o ácido glicônico junto com o sorbitol podem ser obtidos a partir de uma solução equimolecular de glicose e frutose em presença da bactéria *Zymomonas mobilis*, que possui na membrana plasmática a enzima glicose-frutose oxidorreductase, responsável direta pela biotransformação (ERZINGER, *et al.*, 1996; ERZINGER, 2000). De acordo com PAL, DATTA e BHATTACHARYA (2002) o ácido glicônico poderia ser obtido a partir da maltose, utilizando-se uma combinação de alfa-glicosidase e glicoseoxidase inseridas no interior de micelas presentes em uma emulsão do tipo água/óleo/água.

A característica marcante do ácido glicônico é sua alta capacidade quelante de íons metálicos, sobretudo em meio alcalino (por ex., 1g do ácido queila 325 mg de cálcio em solução de soda a 3%). Acrescenta-se, também, que este ácido e seus derivados têm como propriedades a baixa toxidez e corrosividade, capacidade de formar complexos hidrossolúveis com diferentes íons metálicos (VOGELBUSCH CO, 2000). O ácido glicônico é estável mesmo sob fervura em solução de NaOH 15%, além de biodegradável e de cristalizar a temperaturas inferiores a 10°C (JUNGBUNGLAUER CO, 2000).

O ácido glicônico e seus sais de cálcio, potássio, ferro e zinco são muito usados nas áreas alimentícia (acidulantes em formulações de sorvetes, balas, xaropes e refrescos; aditivos em produtos cárneos; removedores de sedimentos como calcário e metais na fabricação de bebidas) e farmacêutica (os sais de cálcio e ferro são usados na terapia de reposição destes íons e o de magnésio usado como padrão na dosagem deste íon no soro) (ERZINGER, 2000). Na área química encontram aplicação o ácido glicônico e o gliconato de sódio (na forma de solução a 60% de partes iguais do ácido e do sal sódico), sobretudo na limpeza de superfícies metálicas para remover óxidos, hidróxidos e carbonatos de cátions polivalentes. Na indústria textil são usados como branqueadores.

A produção do ácido glicônico via oxidação da glicose pela GOD (enzima disponível no mercado, conforme já referido) poderia ser executada com o substrato proveniente tanto da hidrólise da sacarose (neste caso acoplada à invertase) quanto da hidrólise do amido. Dado a natureza da reação, são vantagens inerentes deste

processo a geração de efluentes inofensivos ao meio ambiente, baixo consumo de energia e obtenção de um produto final com baixa percentagem ou, até mesmo, ausência de contaminantes. Recentemente, BAO, *et al.* (2001a,b) e BAO, *et al.* (2003) descreveram um processo constituído por dois reatores de leito fluidizado ("air lift") ligados em série, onde um funcionava como biorreator (a bioconversão glicose/ácido glicônico catalisada pela GOD imobilizada em alginato de cálcio) e o outro como cristalizador. Após a separação do sal, o liquor-mãe era reciclado para o reator enzimático, tendo-se assim acoplados em um sistema contínuo a formação e cristalização do ácido glicônico.

2.5. Aspectos Conclusivos

Pela revisão bibliográfica efetuada, observa-se que a bioconversão da glicose, quer proveniente da sacarose quer do amido, em ácido glicônico por via enzimática, continua sendo objeto de investigação.

Para a produção desta substância, parece que o processo fermentativo é o mais empregado, seguido da síntese química com catalisadores inorgânicos e, finalmente, da bioconversão enzimática.

Em relação aos tipos de reatores utilizados na bioconversão glicose/ácido glicônico por via enzimática, inegavelmente o de leito fixo tem predominado, embora tentativas estão sendo feitas para introduzir o reator de leito fluidizado. Quanto aos biorreatores com membrana, recebeu mais atenção aquele em que a GOD era fixada à membrana (catálise e separação simultâneas), restando, por conseguinte, um vasto campo a ser explorado com o BM em que a catálise ocorre em um compartimento (biorreator operando como CSTR) e a separação no módulo contendo a membrana de ultrafiltração. Inclusive, o arranjo em que um CSTR tem a membrana de ultrafiltração posicionada em sua base e não em módulo separado, que é o tipo de BM utilizado neste trabalho, ainda está bastante inexplorado.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Estabelecer as condições de hidrólise da sacarose e da conversão do açúcar invertido em frutose e ácido glicônico utilizando reator com membrana (RM).

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em duas fases (processo em duas etapas com reatores não operados em série), a saber, hidrólise da sacarose pelo complexo invertase/Dowex[®]1x4-200 e tratamento do açúcar invertido com a glicose oxidase solúvel (GOD) e posteriormente avaliar a performance da glicose oxidase imobilizada na resina aniônica do tipo Dowex[®] no reator;

3.2.2. No caso da conversão em duas etapas (reatores não operados em série), avaliar a possibilidade de intercalar ou não a separação, das hexoses antes da ação da glicose oxidase. A separação foi feita por cromatografia em coluna, usando resina catiônica Dowex[®];

3.2.3. Conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico pelo uso simultâneo das enzimas invertase e glicoseoxidase ambas nas formas solúveis e ambas imobilizadas na resina aniônica do tipo Dowex[®] (processo em etapa única).

3.3. Variáveis de Estudo

Objetivando estabelecer as condições mais adequadas para a bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator com membrana, foram consideradas as seguintes variáveis:

3.3.1. Vazão específica (D) de alimentação do reator;

3.3.2. Fonte da sacarose (sacarose grau analítico ou açúcar mascavo);

3.3.3. Concentração inicial da sacarose para os processos monofásico e bifásico;

3.3.4. Concentração inicial de glicose para a ação da glicose oxidase no processo bifásico (reatores não operados em série);

3.3.5. Atividade inicial das enzimas invertase e glicose oxidase nos processos mono e bifásico;

3.3.6. pH e temperatura do meio reacional para o processo monofásico;

3.3.7. Temperatura e pH do meio reacional para a ação da glicose oxidase no caso do processo bifásico;

3.3.8. Relação entre a altura do leito fixo e o fluxo de alimentação da coluna cromatográfica para a separação das oses.

4. Esquema Geral

4.1. Plano geral

4.1.1 Sistema bifásico:

4.1.1.1. Estabelecer o melhor sistema imobilizado (Dowex®/ invertase) para a obtenção de açúcares redutores totais no reator enzimático com membrana da "Bioengineering".

4.1.1.2. Determinar os parâmetros cinéticos bem como termodinâmicos da glicose oxidase solúvel em reator do tipo batelada.

4.1.1.3. Verificar a possibilidade de imobilização da glicose oxidase em diferentes resinas aniônicas do tipo poliestireno divinilbenzênico para posteriormente avaliar o seu desempenho no reator enzimático com membrana da "Bioengineering".

4.1.1.4. Determinar as melhores condições de trabalho para as enzimas invertase e glicose oxidase (formas solúvel ou imobilizada) no reator enzimático com membrana da "Bioengineering" utilizando membrana de ultrafiltração (cut off: 100kDa).

4.1.1.5. No mesmo sistema bifásico, avaliar a possibilidade de se utilizar a membrana de microfiltração para o sistema imobilizado (5µm).

4.1.1.6. Verificar a possibilidade da separação de glicose e frutose via coluna cromatográfica antes da ação da glicose oxidase.

4.1.2. Sistema Monofásico

4.1.2.1. Verificar o desempenho das duas enzimas, tanto na forma solúvel como na forma imobilizada (invertase e glicose oxidase, ambas as enzimas imobilizadas no mesmo suporte - no reator enzimático da “Bioengineering” empregando as membranas de ultrafiltração e microfiltração respectivamente).

4.1.2.2. Estabelecer a melhor vazão específica para o sistema monofásico para a bioconversão de sacarose em ácido glicônico e frutose.

4.1.2.3. “Scale-up” com membrana de 5 μ m empregando as duas enzimas imobilizadas adotando o sistema contínuo.

4.1.2.4. Uso do açúcar mascavo como substrato em substituição à sacarose grau pA em processo monofásico (sistema contínuo).

5. Metodologia

5.1. Materiais

5.1.1. Invertase e Glicose oxidase

Foi empregada a invertase (EC. 3.2.1.26), grau comercial, Bioinvert^R (Quest International) e glicose oxidase (EC. 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* adquirida da SIGMA[®] (código G 6766).

5.1.2. Membranas

As membranas usadas nos ensaios em biorreator foram da marca Millipore/Amicon código PLHK07610 (membrana de ultrafiltração de celulose regenerada com corte molecular de 100 kDa) e TMTP09030 (membrana de microfiltração de 5,0µm).

5.1.3. Resinas

Foram utilizadas as seguintes resinas, a saber, aniônica (1x2:100-400; 1x4:50-400, 1x8:50-400) e catiônica (50W: 8-100 e 4-100). Ambas as resinas foram adquiridas da Dow Chemical[®].

5.1.4. Reagentes e Vidraria

Todos os reagentes empregados eram de grau pA com exceção do açúcar mascavo de grau comercial. Foi utilizada vidraria comum de laboratório.

5.2. Equipamentos

5.2.1. Biorreatores

5.2.1.1. Reator enzimático com membrana da "Bioengineering" (EMRB)

O reator enzimático com membrana da "Bioengineering" de 10 mL de capacidade operacional, autoclavável, podendo operar à pressão de até 6 bar, tem como acessórios uma bomba doseadora de alta precisão (vazão entre 1 e 500 mL.h⁻¹ com variação de $\pm 0,5$ mL.h⁻¹), filtro esterilizante, dispositivo para pressurizar o sistema e para aprisionar bolhas eventualmente formadas ao longo da linha de alimentação do substrato.

5.2.1.2. Célula de ultrafiltração e filtração da Millipore® (Cat. No. XFUF 07601-76mm Ø)

As especificações deste biorreator, conforme o fabricante são: célula de ultrafiltração com capacidade nominal de 300mL, diâmetro da membrana de 76mm, área efetiva da membrana de 40cm² e pressão máxima de 90psi (6 bar). Foi acoplada a uma bomba peristáltica Heidolph (mod: Pump Drive PD5101) para a alimentação do substrato.

5.2.2. Outros

Foram utilizados os seguintes equipamentos de apoio principais: espectrofotômetro Beckman-Coulter (mod. DU 640), agitador de tubos Marconi (mod. MA-162), banho termostaticado Polystat (mod. CC3), banho termostaticado Fisaton (mod. 597), balanças Marte (mods. AS 2000C e AS 1000C), desmineralizador de água Fisaton (mod. 670), coletor de frações de Pharmacia Biotech (FRAC-200) e balança analítica Mettler Toledo (mod. AG 285).

5.3. Métodos

5.3.1. Método de imobilização das enzimas por adsorção (TOMOTANI, 2002).

A resina aniônica utilizada foi previamente lavada com água deionizada, para a remoção de eventuais impurezas presentes. A lavagem consistiu na suspensão da resina em 25 mL de água deionizada (pH 5,5), a qual foi mantida sob agitação de 100 rpm por 24 horas a 32°C. A resina foi separada por centrifugação (4000xg/30min), e a seguir, usada para imobilizar a enzima no “shaker”.

Os testes de imobilização foram iniciados usando-se determinada quantidade da resina Dowex® 1x4-200 nas quantidades de 25, 50, 100 mg, as quais foram misturadas com 25mL de água deionizada (pH ajustado a 5,5 com HCl 1,0M). A suspensão foi deixada sob agitação (100rpm) por 24 horas à temperatura de 32°C.

Os sistemas foram preparados conforme descritos nos itens a seguir.

5.3.1.1. Imobilização da invertase

Adicionaram-se 3,28mg ou 1,64mg de invertase (medida em termos de proteína total e contida em 1,0mL ou 0,5 mL de Bioinvert®) em um Erlenmeyer contendo 25mg, 50mg, 100mg de resina pré-hidratada e lavada. A seguir, adicionou-

se uma quantidade suficiente de água deionizada (pH 5,5) para completar o volume total de 10mL (ensaio no biorreator). Deixou-se a suspensão até 4 horas sob agitação (100rpm) a 32°C.

Findo este período, centrifugou-se o sistema (4000xg/30min) e mediu-se a concentração de proteína total presente no sobrenadante para a determinação do Índice de adsorção (IA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (sistema imobilizado) foi então utilizado para ensaio no biorreator (processo contínuo).

5.3.1.2. Imobilização da glicoseoxidase

O preparo da resina bem como o método para a imobilização da glicoseoxidase foram os mesmos descritos no item 5.3.1.

A partir da solução concentrada de glicoseoxidase 10mg/mL, adicionou-se 1mL da solução-mãe em um Erlenmeyer contendo 100mg de resina previamente lavada e hidratada. A seguir, adicionou-se uma quantidade suficiente de água deionizada (pH 5,5) para completar o volume total de 10mL (ensaio no biorreator). Deixou-se a suspensão até 4 horas sob agitação (100rpm) a 32°C.

Findo este período, centrifugou-se o sistema (4000xg/30min) e mediu-se a concentração de proteína total presente no sobrenadante para a determinação do Índice de adsorção (IA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (sistema imobilizado) foi então utilizado para ensaio no biorreator (processo contínuo). Repetiu-se o mesmo procedimento para todos os sistemas imobilizados obtidos, a saber: 1x8:50, 100, 200 e 400/glicoseoxidase, 1x4:50, 100, 200, e 400/glicoseoxidase e 1x2:100, 200 e 400/glicoseoxidase.

5.3.1.3. Imobilização simultânea da invertase e glicoseoxidase

O preparo da resina bem como o método para a imobilização da glicoseoxidase e da invertase foram os mesmos descritos no item 5.3.1.

A partir dos dados obtidos no item anterior, prosseguiu-se para a possibilidade de imobilização simultânea de ambas as enzimas no mesmo suporte (Dowex® 4:200). As quantidades utilizadas foram 1,64mg e 10mg de invertase e glicoseoxidase, respectivamente. Num Erlenmeyer contendo 100mg de resina previamente lavada e hidratada foram adicionadas ambas as enzimas. A seguir, adicionou-se uma quantidade suficiente de água deionizada (pH 5,5) para completar

o volume total de 10mL. Deixou-se a suspensão até 4 horas sob agitação (100rpm) a 32°C.

Findo este período, centrifugou-se o sistema (4000xg/30min) e mediu-se a concentração de proteína total presente no sobrenadante para a determinação do Índice de adsorção (IA da ordem de 45%). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (sistema imobilizado) foi então utilizado para ensaio no biorreator.

5.3.2. Determinação da atividade da glicoseoxidase (ensaio padrão)

A atividade da glicoseoxidase foi determinada conforme descrito por TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO. (2005).

Em uma cubeta de capacidade 1,2mL foram adicionados 0,2mL da solução de glicose oxidase (4mg.mL^{-1}), 0,5mL da solução de glicose ($0,8\text{mg.mL}^{-1}$) e 0,3mL de solução tampão acetato (pH 5,5/0,01M). Após a homogeneização da mistura, determinou-se a atividade enzimática através da formação de água oxigenada em comprimento de onda de 240nm (BERGMEYER, 1984). O espectrofotômetro foi programado para registrar um tempo total de reação de 315 segundos, sendo as leituras correspondentes à formação da H_2O_2 tomadas a cada 45 segundos. A temperatura foi mantida a 25°C.

As soluções de tampão e de glicose foram borbulhadas com oxigênio durante 15 minutos antes de serem adicionadas na cubeta.

O ponto zero do aparelho foi ajustado com uma solução constituída por 0,2mL de solução da enzima e 0,8mL de tampão acetato. A unidade de atividade (U_{GOD}) de glicoseoxidase foi expressa em mg H_2O_2 formada por minuto. Os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram iguais a $3,04 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e 4,03%, respectivamente.

5.3.3. Caracterização da glicoseoxidase

5.3.3.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da glicoseoxidase

Procedeu-se conforme TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO (2005).

A atividade da glicoseoxidase foi avaliada conforme descrito no ensaio padrão, a menos do pH do meio reacional, que foi ajustado para 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 ou 6,5.

A estabilidade da enzima frente ao pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) foi determinada, dissolvendo-se a GOD na solução-tampão de pH desejado e medindo-

se a atividade residual, conforme descrito no ensaio padrão, após 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30h de contato. A concentração de GOD foi de 4mg.mL^{-1} e as soluções foram mantidas à temperatura constante de 30°C .

As soluções tampão (0,01M) empregadas foram preparadas conforme VILLELA, BACILA & TASTALDI (1972), usando-se o tampão acetato para os valores de pH 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 e o tampão fosfato para os pH 6,0 e 6,5.

5.3.3.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da glicoseoxidase

Procedeu-se conforme TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO (2005).

O efeito da temperatura na atividade da GOD foi avaliado, realizando-se o ensaio padrão a 25°C , 30°C , 35°C , 40°C , 45°C , 50°C ou 55°C .

A estabilidade da GOD frente à temperatura foi determinada, deixando-se a enzima (4mg.mL^{-1}) dissolvida em tampão acetato 0,01M (pH 5,5) à temperatura de 25°C , 30°C , 35°C , 40°C , 45°C , 50°C ou 55°C por 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 horas. Nos tempos indicados, amostras da solução de enzima foram tomadas e a atividade catalítica residual medida conforme o ensaio padrão.

5.3.3.3. Efeito da concentração da glicose na atividade da glicoseoxidase

Procedeu-se conforme TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO (2005).

A atividade enzimática foi determinada frente às concentrações de glicose 2,2; 4,4; 6,6; 8,8; 11; 15; 20 e 25mM, sendo as demais condições mantidas conforme fixado no ensaio padrão.

5.3.3.4. Efeito da concentração da H_2O_2 na atividade da glicoseoxidase

Procedeu-se conforme TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO (2005).

Em uma cubeta de espectrofotômetro foram colocados 0,2 mL de uma solução de GOD ($4,0\text{mg.mL}^{-1}$) e 0,3 mL de uma solução diluída de H_2O_2 . Após 5 min a 25°C adicionou-se 0,5mL de solução de glicose ($8,0\text{mg.mL}^{-1}$), homogeneizou-se a mistura e determinou-se a atividade residual da enzima conforme descrito no ensaio padrão. As soluções diluídas de H_2O_2 (1:50; 1:100; 1:250; 1:500; 1:750; 1:1000) foram preparadas a partir de uma solução-mãe contendo 30 mg de $\text{H}_2\text{O}_2.\text{mL}^{-1}$. Neste estudo, as soluções de tampão e de glicose não foram borbulhadas com oxigênio e o branco correspondeu à mistura das soluções de GOD e de água oxigenada.

5.3.3.5. Efeito da concentração da glicose na atividade da glicoseoxidase na presença de H_2O_2 .

Procedeu-se conforme TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO (2005).

Em uma cubeta de espectrofotômetro foram colocados 0,2 mL de uma solução de GOD ($4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e 0,3 mL de uma solução diluída de H_2O_2 ($0,036 \text{ mg.mL}^{-1}$). Após 5 min a 25°C adicionou-se 0,5mL de solução de glicose (4,4, 6,6, 8,8, 11 ou 15mM) homogeneizou-se a mistura e determinou-se a atividade residual da enzima conforme descrito no ensaio padrão. Neste estudo, as soluções de tampão e de glicose não foram borbulhadas com oxigênio e o branco correspondeu à mistura das soluções de GOD e de água oxigenada.

5.4. Ensaio no biorreator com membrana (Biorreator da “Bioengineering”)

A integridade da membrana durante os ensaios foi monitorada através da dosagem de proteína nas amostras coletadas. A ausência de proteína no efluente foi tomado como critério da integridade da membrana. Todos os ensaios tiveram uma duração de 24 horas.

5.4.1. Invertase solúvel/imobilizada

O reator contendo 10 mL de uma solução tamponada de invertase solúvel ($3,28 \text{ g.mL}^{-1}$ ou $1,64 \text{ mg.mL}^{-1}$) ou na forma imobilizada ($3,28 \text{ g.mL}^{-1}$ ou $1,64 \text{ mg.mL}^{-1}$ adsorvida em 25, 50 e 100mg de resina aniônica) e munido de membrana de ultrafiltração ou de microfiltração com corte molecular de 100 kDa ou de $5\mu\text{m}$) foi alimentado com solução de sacarose (concentração: 2,5, 5, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100mM) a vazão específica de $0,4 \text{ h}^{-1}$, $0,8 \text{ h}^{-1}$ e $1,6 \text{ h}^{-1}$. As amostras foram coletadas a cada 1 hora de ensaio com o auxílio do coletor de frações. O pH do meio reacional (5,0, 5,5 ou 6,0) foi mantido ao longo do ensaio, usando-se tampão acetato 10mM, sendo a temperatura da reação (30° ou 45°C) mantida constante através do controlador de temperatura acoplado ao biorreator.

5.4.2. Glicoseoxidase (GOD) solúvel

O reator contendo 10 mL de uma solução tamponada de GOD (1 mg.mL^{-1}) e munido de membrana de ultrafiltração foi alimentado com solução de glicose (concentração: 2,5mM), às seguintes vazões específicas de $1,0$, $1,5$, $3,0$ e $6,0 \text{ h}^{-1}$. O

pH do meio reacional (5,0, 5,5 ou 6,0) foi mantido ao longo do ensaio, usando-se tampão acetato 10mM, sendo a temperatura da reação (30° ou 45°C) mantida constante através do controlador de temperatura acoplado ao biorreator.

5.4.3. Glicoseoxidase e invertase na forma solúvel ou imobilizada

O reator contendo 10 mL de uma solução tamponada de GOD (10mg) /invertase solúvel (1,64mg) ou ambas imobilizadas e munido de membrana de ultrafiltração ou membrana de microfiltração foi alimentado com solução de sacarose (concentração: 2,5mM), à vazão específica de 0,5, 0,8, 1,6 e 3,0 h⁻¹.

O pH do meio reacional (5,5) foi mantido ao longo do ensaio, usando-se tampão acetato 10mM, sendo a temperatura da reação (30°C) mantida constante através do controlador de temperatura acoplado ao biorreator.

5.5. Ensaio na célula de ultrafiltração e filtração da Millipore®

O reator contendo o sistema imobilizado glicoseoxidase/invertase/Dowex® 1x4:200 e munido de uma membrana de ultrafiltração ou de microfiltração foi alimentado com a solução de sacarose (concentração de 2,5mM) ou de açúcar mascavo (concentração equivalente a 2,5mM de sacarose), à vazão específica média de 180mL.h⁻¹. O volume médio do reator foi mantido a 100 ou 300mL. O pH do meio reacional (5,5) foi mantido ao longo do ensaio, usando-se tampão acetato 10mM, sendo a temperatura da reação a do ambiente (23-26°C).

As amostras foram coletadas a cada 5 minutos ao longo do ensaio até completar o período de 8 horas. A integridade da membrana durante os ensaios foi monitorada através da dosagem de proteína nas amostras coletadas. A ausência de proteína no efluente foi tomado como critério da integridade da membrana.

5.6. Separação de açúcares (Frutose e Glicose) através da cromatografia de troca iônica.

Foi utilizado o procedimento descrito por BART, *et al.* (1996).

5.6.1. Preparo da resina catiônica

A resina catiônica – Dowex® 50W 8-100 -, foi colocada numa coluna (Biorad: capacidade do leito 2mL para a resina e 10mL para a amostra) até alcançar a altura

de 1,5cm. A resina foi lavada previamente com água deionizada e em seguida foi deixada em repouso para a hidratação (24h).

No dia seguinte, tratou-se a resina com 10mL de HCl (2N) e 10mL de CaCl_2 (2N). Lavou-se, em seguida, a resina com água deionizada até se obter um efluente de pH neutro.

5.6.2. Estudo de retenção da glicose e frutose na resina

A vazão do eluente e do efluente foi acertada para 10mL.h^{-1} . Uma vez acertada a vazão, estudou-se a retenção dos açúcares em separado. Foram preparadas duas soluções, a saber, de glicose (8mg.mL^{-1}) e de frutose (8mg.mL^{-1}).

Adicionou-se 2mL de glicose ou frutose na coluna e eluiu-se com a água deionizada.

5.6.3. Separação das hexoses

Aumentou-se a altura do leito (de 1,5 para 3,5cm de resina) com a finalidade de se reter maior percentagem de frutose adicionada. Determinado o comportamento da retenção da frutose no novo sistema, seguiu-se para o estudo de separação dos dois açúcares.

O procedimento adotado, a seguir, diferiu-se no uso de uma solução tamponada de acetato de cálcio como eluente. O tampão foi preparado conforme AZEVEDO e RODRIGUES (2001).

A solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5), foi preparada a partir da solução de ácido acético (0,28% - v/v) e da solução de acetato de cálcio (0,5% - p/v). O acetato de cálcio, por sua vez, foi utilizado para evitar a alteração da forma iônica da resina e manter a sua propriedade de adsorção (AZEVEDO e RODRIGUES, 2001).

As demais condições deste procedimento foram mantidas. Avaliou-se também o reciclo da mistura das oses subsequente ao estudo do emprego da solução tamponada de acetato de cálcio.

5.6.4. Procedimento dos reciclos

Foram realizados um total de 3 reciclos. Após a primeira separação das hexoses conforme já mencionado no item anterior, as amostras contendo a mistura de glicose e frutose foram ajuntadas para formar um “pool” de hexoses. Em seguida,

o “pool” desta mistura foi introduzida numa nova coluna cromatográfica preparada conforme descrito anteriormente e eluída com a solução tamponada de acetato de cálcio. Em todos os ciclos, as condições pré-estabelecidas foram mantidas. Após a separação obtida no 1º ciclo, repetiu-se o mesmo procedimento por mais duas vezes, coletando as amostras com a mistura das oses seguida de outra separação cromatográfica.

5.7. Determinações Analíticas

5.7.1. Dosagem de proteína

Foi utilizado o método da diferença de absorção no UV a 215 e 225nm (SEGEL, 1979).

5.7.2. Dosagem de açúcares redutores totais (ART)

A determinação dos açúcares redutores totais foi feita usando-se os reativos de SOMOGYI (1952), conforme adaptação preconizada por ARRUDA (1996).

5.7.3. Determinação da glicose (método enzimático)

A dosagem da glicose foi feita pelo método enzimático (Kit Laborlab® cat. 02200) conforme descrito na bula.

Preparou-se o reativo de trabalho (mono-reagente) conforme descrito na bula e a determinação da concentração de glicose foi realizada conforme indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema montado para a dosagem de glicose pelo método enzimático.

Tubos	Vol (μL)	Mono-Reagente (μL)
Branco	-	1000
Padrão (100mg.dL ⁻¹)	10	1000
Amostra	10	1000

Cálculos para a dosagem de glicose da(s) amostra(s):

- Com fator:

$$[glicose] = Absorbância(amostra) \times Fator$$

$$Fator = \frac{100mg \times dL^{-1}}{\Delta A(padrão)} \quad (Eq.1)$$

- Com padrão ou calibrador:

$$Glicose(100mg \times dL^{-1}) = 1mg \times mL^{-1}$$

$$[Amostra](mg \times mL^{-1}) = \frac{\Delta A(amostra)}{\Delta A(padrão)} \times 100 \quad (Eq.2)$$

Para estabelecer o erro experimental desta técnica, foram preparadas cinco soluções de glicose ($2mg.mL^{-1}$) com as quais foram obtidos os correspondentes valores. Assim, os valores do desvio-padrão e do coeficiente de variação foram iguais a $1,68 mg.dL^{-1}$ e $0,877\%$, respectivamente.

5.7.4. Determinação da água oxigenada

A concentração da água oxigenada foi determinada através do método de leitura da absorção no UV a 240nm (BERGMEYER, 1984), tendo sido utilizado o procedimento descrito por TOMOTANI, Das NEVES e VITOLO (2005). A curva-padrão foi estabelecida para concentrações de H_2O_2 entre $0,006$ e $0,6 mg.mL^{-1}$, utilizando-se como padrão uma solução de H_2O_2 10 V (grau farmacêutico).

5.7.5. Determinação do oxigênio dissolvido

O oxigênio dissolvido foi medido utilizando-se o oxímetro Digimed (mod. DM-4).

5.8. Análise dos Resultados

5.8.1. Eficiência da imobilização da invertase em resina Dowex®

A eficiência foi expressa em termos de Índice de Adsorção (IA,%) definido pela equação (TOMOTANI, 2002):

$$IA = \left[\frac{PTA - PTS}{PTA} \right] \times 100 \quad (Eq.3)$$

Onde:

PTA = quantidade total de proteína adicionada (mg) (antes da adsorção)

PTS = quantidade total de proteína remanescente no sobrenadante (mg).

5.8.2. Coeficiente de imobilização (CI, %) no processo contínuo.

$$CI = \left[\frac{r_{(enz. imobilizada)}}{r_{(enz. solúvel)}} \right] \times 100 \quad (Eq.4)$$

5.8.3. Eficiência da Separação Cromatográfica (VOGEL, 1981).

No eluato foram determinadas as concentrações de glicose e de ART respectivamente, pelos métodos do kit enzimático e de Somogyi. A concentração de frutose no eluato corresponde à diferença entre o ART e a quantidade de glicose.

A velocidade com que os dois constituintes se separam (frutose e glicose) na coluna foi determinada pela razão dos dois respectivos coeficientes de distribuição, onde o coeficiente de distribuição (K_d) foi definido como segue (VOGEL, 1981):

$$K_d = \frac{\text{sóluto(resina)}}{\text{resina(g)}} \div \frac{\text{sóluto(solução)}}{\text{volume(solução)(cm}^3\text{)}} \quad (Eq.5)$$

O fator de separação (α) foi usado como medida da separação cromatográfica possível, e sendo obtido da equação:

$$\alpha = \frac{K_{d1}}{K_{d2}} \quad (Eq.6)$$

Onde: K_{d1} - frutose

K_{d2} - glicose

5.8.4. Cálculos dos resultados obtidos no biorreator

Para os cálculos foram utilizadas planilhas de cálculos no Microsoft Excel.

5.8.5. Cálculo da concentração de frutose formada

A partir da determinação analítica de açúcares redutores totais (método de Somogyi-Nelson), calculou-se a concentração de açúcares redutores ([AR]) ou de glicose ([G]) formada durante a reação. No caso da amostra ter sido diluída, esse

valor foi multiplicado por sua respectiva diluição para a obtenção do valor real da concentração.

$$Abs = a \times [AR] + b \quad \text{ou} \quad Abs = a \times [G] + b \quad (\text{Eq. 7})$$

sendo: a = coeficiente angular da curva de calibração, b = coeficiente linear da curva de calibração, Abs = absorvância média, [AR] = concentração de açúcares redutores (mg.mL⁻¹) e [G] = concentração de glicose (mg.mL⁻¹).

Lembrando que a hidrólise da sacarose segue a reação:

Então, cada mol de sacarose (342g) fornece dois moles de açúcares redutores (mistura equimolar de glicose e frutose – 360g) ou 1 mol de glicose (180g). Pode-se concluir que a concentração de frutose ([F]) equivale à concentração de glicose ou à metade da concentração de açúcares redutores na amostra multiplicado pelo fator 0,95.

Logo, tem-se a relação:

$$[F] = [G] = \frac{[AR]}{2} \times 0,95 \quad (\text{Eq. 8})$$

A conversão da unidade de concentração de frutose (de mg/mL para mM) foi feita através da equação:

$$[F](\text{mM}) = \frac{[F](\text{mg.mL}^{-1}) * 1000}{180} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde: [F] corresponde à concentração de frutose produzida.

5.8.6. Cálculo da concentração de sacarose consumida

A concentração de sacarose consumida corresponde à concentração de frutose ou glicose produzida, de acordo com a estequiometria da reação. Ou seja:

$$[S]_{consumida} = [F] = [G] = \frac{[AR]}{2} \times 0,95 \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde: $[S]_{consumida}$ corresponde à concentração de sacarose consumida na reação.

Portanto a concentração de sacarose na saída do reator equivale à diferença entre a concentração de sacarose na entrada do reator ($[S]_0$) e a concentração de sacarose consumida ($[S]_{consumida}$). Ou seja:

$$[S]_{saída} = [S]_0 - [S]_{consumida} \quad (\text{Eq. 11})$$

5.8.7. Cálculo do grau de conversão da reação de hidrólise da sacarose

Calcula-se o grau de Conversão (X) através da equação :

$$X(\%) = \frac{[S]_{consumida}}{[S]_0} \times 100 \quad (\text{Eq.12})$$

Onde: $[S]_{consumida}$ corresponde à concentração de sacarose consumida na reação e $[S]_0$ a concentração de sacarose na alimentação do reator.

5.8.8. Cálculo da velocidade de reação ou produtividade

A taxa ou velocidade de reação (r) equivale à quantidade de produto formado produzida por miligrama de enzima e por volume de meio reacional. A unidade a ser utilizada para a taxa de reação é ($\text{mmol}_{\text{produto}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{enzima}}$). Calculou-se de acordo com a equação seguinte:

$$r = (Q \times [\text{produto}]) / (1000 \times m_{\text{enzima}}) \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde: $[\text{produto}]$ corresponde à concentração de frutose (caso da hidrólise da sacarose pela invertase) ou H_2O_2 (caso da oxidação da glicose pela GOD) formada

na reação, Q a vazão volumétrica na saída do reator (mL.h^{-1}) e m_{enzima} a massa de enzima (invertase ou glicoseoxidase, conforme o caso) pesada no reator.

5.8.9. Cálculo das constantes cinéticas das enzimas

As constantes cinéticas (K_M e V_{max}) da glicose oxidase (ensaio em batelada) foram calculadas através do método gráfico convencional de Lineweaver-Burk.

5.8.10. Cálculo dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos (E_a , ΔG , ΔH e ΔS) relacionados com a invertase e a GOD foram determinados através das equações termodinâmicas clássicas (CASTELLAN, 1986).

5.8.11. Cálculo da água oxigenada formada, glicose consumida e ácido glicônico formado

A partir da determinação analítica da H_2O_2 (método da leitura no UV a 240 nm) feita em duplicata para cada amostra coletada, era possível calcular uma absorbância média (Abs) e, por meio da curva de calibração, era possível calcular a concentração de H_2O_2 formada durante a reação. No caso da amostra ter sido diluída, esse valor era multiplicado por sua respectiva diluição para a obtenção do valor real da concentração.

Lembrando que a oxidação da glicose segue a reação:

Então, cada mol de glicose fornece um mol de ácido glicônico e 1 mol de H_2O_2 . Logo, tem-se que a concentração de glicose ($[G]$) consumida e a concentração de ácido glicônico ($[AG]$) formado são iguais à da água oxigenada formada ($[\text{H}_2\text{O}_2]$). Por conseguinte temos:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = [G]_{\text{consumida}} = [AG]_{\text{formada}} \quad (\text{Eq. 14})$$

A conversão da unidade de concentração de H_2O_2 (de mg.mL^{-1} para mM) foi feita através da equação:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ (mM)} = [\text{H}_2\text{O}_2](\text{mg.mL}^{-1}) \times 29,4 \quad (\text{Eq. 15})$$

6. Resultados e discussão

6.1. Experimentos realizados

6.1.1. Tabela de experimentos

6.1.1.1. Invertase

6.1.1.1.1 Ensaio no biorreator com membrana

Com o objetivo de estabelecer a melhor relação enzima/resina para obter maior grau de conversão da sacarose em frutose (X) e na velocidade da reação hidrolítica (r) foram realizados ensaios nas condições mostradas na Tabela 2.

Na Tabela 3 são apresentadas as condições dos ensaios realizados com a invertase imobilizada. Foram avaliados também os efeitos da concentração do substrato, da vazão específica, da temperatura e do pH na atividade invertásica bem como a viabilidade do uso da membrana de microfiltração de 5 μ m (Tabela 4).

Tabela 2. Condições empregadas nos ensaios usados para o estabelecimento da relação massa da invertase/massa da resina. As condições operacionais mantidas constantes foram: [sacarose]=100mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão de alimentação=8mL.h⁻¹ e agitação entre 100-150rpm. Em I-3, I-4 e I-7 empregou-se 1,64mg de proteína enquanto para os I-5 e I-6 utilizou-se 3,28mg de proteína para o preparo do sistema imobilizado.

Ensaio	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7
Forma da enzima	Solúvel	Solúvel	Imob *(97,6%)	Imob *(98,8%)	Imob *(94,3%)	Imob *(97,2%)	Imob *(97,5%)
Qtde de enzima (mg)	1,64	3,28	**1,60	**1,62	**3,09	**3,19	**1,60
Qtde de resina (mg)	-	-	25	50	25	50	100

*Índice de adsorção calculado conforme a equação 3.

** Quantidade real da proteína absorvida no suporte

Tabela 3. Condições operacionais variadas nos ensaios I-8 a I-19. Foram mantidos constantes: pH5,5, T=30°C, agitação entre 100-150 rpm e membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100 kDa). No ensaio I-8 o sistema imobilizado foi preparado com 3,28mg de proteína e 100mg de resina (IA=98%) e nos demais ensaios (I-9 à I-19) empregou-se a relação 1,64mg de proteína para 100mg de resina (IA médio de 94%).

Variáveis	Ensaio											
	I-8	I-9	I-10	I-11	I-12	I-13	I-14	I-15	I-16	I-17	I-18	I-19
[Substrato], mM	100/50	50	25	12,5	6,25	6,25	5	5	50	25	12,5	6,25
D, h ⁻¹	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4 0,8 1,6	0,4 0,8	0,8 1,6	0,8 1,6	0,8 1,6	0,8 1,6	0,8 1,6

Tabela 4. Condições operacionais variadas nos ensaios I-20 a I-27. Foram mantidos constantes: [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100 e 150rpm, razão invertase/resina (1,64mg de proteína/100mg de resina tendo IA médio de 96%). Nos ensaios I-20 a I-25 empregou-se a membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100 kDa) e para I-26 e I-27 a de microfiltração de 5µm.

Variáveis	Ensaio							
	I-20	I-21	I-22	I-23	I-24	I-25	I-26	I-27
D, h ⁻¹	0,4	0,8	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
pH	5,5	5,5	5,5	5,0	6,0	5,5	5,5	5,5
T, °C	30	30	30	30	30	45	30	45

6.1.1.2. Glicose oxidase

Previamente foram realizados ensaios em batelada com a finalidade de determinar as constantes cinéticas bem como estabelecer as melhores condições de trabalho antes de avaliar o desempenho desta enzima no reator com membrana da "Bioengineering®". Na Tabela 5 são indicados os ensaios em batelada com os respectivos parâmetros variados.

6.1.1.2.1. Ensaios em batelada

Tabela 5. Estudos realizados com GOD solúvel efetuados em batelada e os respectivos parâmetros variados.

Estudos	Parâmetros
GOD-1	Efeito do pH na atividade
GOD-2	Efeito do pH na estabilidade
GOD-3	Efeito da temperatura na atividade
GOD-4	Efeito da temperatura na estabilidade
GOD-5	Efeito da concentração da glicose na atividade
GOD-6	Efeito da concentração do H ₂ O ₂ na atividade da GOD
GOD-7	Efeito inibitório do H ₂ O ₂ sobre a atividade da GOD

6.1.1.2.2. Ensaios no biorreator com membrana ("Bioengineering®")

Tabela 6. Condições operacionais variadas nos ensaios GOD 8 a 14 feitos em biorreator com membrana da "Bioengineering®". Foram mantidos constantes: [glicose]=2,5mM, agitação entre 100 e 150rpm e membrana de 100 kDa. A enzima estava na forma solúvel.

Variáveis	Ensaio						
	GOD-8	GOD-9	GOD-10	GOD-11	GOD-12	GOD-13	GOD-14
D, h ⁻¹	1	1,5	3	6	6	6	6
T, °C	30	30	30	30	45	30	30
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,0	6,0

6.1.1.2.3. Imobilização da glicoseoxidase

Tabela 7. Resinas aniônicas (Dowex® 1x2, 4 e 8) empregadas como suporte para a imobilização da glicoseoxidase (razão da glicoseoxidase/resina: 0,219mg de proteína/100mg de resina seca) [32°C, pH5,5, 100 rpm durante 4horas].

Ensaio	Tipos de resinas
GODi-1	2:100
GODi-2	2:200
GODi-3	2:400
GODi-4	4:50
GODi-5	4:100
GODi-6	4:200
GODi-7	4:400
GODi-8	8:50
GODi-9	8:100
GODi-10	8:200
GODi-11	8:400

6.1.1.2.4. Ensaio no biorreator da “Bioengineering®” com glicoseoxidase imobilizada em Dowex® 1x4:200

Tabela 8. Estudo do comportamento do sistema imobilizado, Dowex® 1x4:200/glicoseoxidase (IA~76%), no biorreator da “Bioengineering®” variando os valores de pH, T e tipo de membrana com exceção da concentração do substrato (2,5mM de glicose), da vazão específica de alimentação ($6h^{-1}$) e agitação entre 100 e 150rpm.

Variáveis	Ensaio					
	GODi-12	GODi-13	GODi-14	GODi-15	GODi-16	GODi-17
pH	5,0	5,5	6,0	5,5	5,5	5,5
T, °C	30	30	30	45	30	45
Tipo de membrana	100kDa	100kDa	100kDa	100kDa	5μ	5μ

6.1.1.2.5. Ensaios no biorreator da "Bioengineering®" com ambas as enzimas imobilizadas

Tabela 9. Ensaios dos sistemas constituídos por invertase e glicoseoxidase solúveis (Gls) e imobilizadas (Gli) em Dowex®1x4:200 e vazão específica (h^{-1}) empregada no reator de membrana da Bioengineering [2,5mM de sacarose, pH 5,5, 30°C] utilizando a membrana de ultrafiltração (100kDa) ou de microfiltração (5 μ).

Ensaios	Variáveis	
	Tipo de membrana	D (h^{-1})
Gli-1	5 μ	0,5
Gli-2	5 μ	0,8
Gli-3	5 μ	1,6
Gls-1	100kDa	0,5
Gls-2	100kDa	0,8
Gls-3	100kDa	1,6
Gls-4	100kDa	3,0

6.1.1.2.6. Ensaios na célula de ultrafiltração da Millipore®

Tabela 10. Ensaios na célula de ultrafiltração da Millipore® empregando glicoseoxidase e invertase ambas solúveis (Gls) ou imobilizadas (Gli) variando o volume reacional, o tipo de membrana e substrato. Os demais parâmetros foram mantidos ([sacarose]=2,5mM; pH 5,5; 23-26°C e agitação entre 100 e 150rpm).

Ensaios	Variáveis			
	Volume reacional (mL)	Tipo de membrana	D (h^{-1})	Tipo de substrato
Gls-5	150	100kDa	1,2	Sacarose
Gli-4	150	5 μ	0,6	Sacarose
Gli-5	150	100kDa	0,6	Sacarose
Gli-6	300	5 μ	1,2	Sacarose
Gli-7	300	5 μ	1,2	Açúcar mascavo

6.1.1.3. Separação Cromatográfica

Tabela 11. Ensaios para a separação cromatográfica da glicose e da frutose.

Ensaio	A		B	
	Resina		Resina	
	50W:4-100		50W:8-100	
Estudo individual (eluente: água deionizada; altura do leito: 1,5 cm)	-	1	Frutose	
			Glicose	
Estudo individual (eluente: água deionizada; altura do leito: 3,5 cm)	-	2	Frutose	
			Glicose	
Estudo individual (eluente: solução tamponada altura do leito: 3,5 cm)	1	3	Frutose	
			Glicose	
Estudo da mistura de açúcares (eluente: água deionizada altura do leito: 3,5 cm)	-	4	Frutose+glicose	
Estudo da mistura de açúcares (eluente: solução tamponada altura do leito: 3,5 cm)	2	5	Frutose+glicose	
Reciclo (eluente: solução tamponada altura do leito: 3,5 cm)	-	6	Frutose+glicose	

6.2. Invertase

A seguir, são apresentados os resultados obtidos para os ensaios realizados com a invertase solúvel e imobilizada (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Perfil do grau de conversão [X] para os ensaios com a invertase solúvel (I-1 e I-2) [(◇) – 3,28mg de proteína; (□) – 1,64mg de proteína]. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]=100mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de $0,8h^{-1}$ e agitação entre 100-150rpm.

Figura 2. Perfil do grau de conversão [X] para os ensaios com a invertase imobilizada (I-3 a I-7) [(□) – 1,64mg de proteína/25mg de resina (I-3), (×) – 1,64mg de proteína/50mg de resina (I-4) (◇) – 3,28mg de proteína /25mg de resina (I-5), (△) – 3,28mg de proteína/50mg de resina (I-6), (*) – 1,64mg de proteína/100mg de resina (I-7)]. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]=100mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de $0,8h^{-1}$ e agitação entre 100-150rpm.

A avaliação da eficiência dos sistemas imobilizados foi feita comparando-se a velocidade de reação média (r) e o grau de conversão (X).

Calculou-se o valor médio do " r " e o " X ", a partir do momento em que o sistema entrou na fase estacionária. Considerou-se o intervalo entre 4-24 horas (o intervalo considerado foi do momento em que a velocidade da reação permaneceu bem próxima durante 3 horas até o término do ensaio). Embora houvesse um declínio nos valores de " r ", definiu-se 4-24 horas como melhor intervalo para efeito de comparação entre os ensaios.

Assim, os valores apresentados na Tabela 12 serão avaliados para o desempenho dos sistemas.

Tabela 12. Valores médios da velocidade de reação (r).

Ensaio	Velocidade de reação (r , mmol ART/h.mg de proteína)
I-1	0,50
I-2	0,22
I-3	0,13
I-4	0,25
I-5	0,05
I-6	0,07
I-7	0,50

Neste método de imobilização, ao duplicar a quantidade da resina nota-se a tendência do aumento da velocidade da reação. Um comportamento semelhante pôde ser observado em ensaios em batelada realizado por Tomotani (2002). A partir destes dados prévios, as respectivas velocidades de reação obtidas por diferentes sistemas imobilizados em ensaios em batelada, conforme apresenta a Tabela 13, o acerto da quantidade de ambos os constituintes (resina e enzima) mostrou ser de extrema importância para determinar o melhor sistema imobilizado.

Embora os sistemas imobilizados sejam diferentes para ambos os processos (contínuo e em batelada), os dados experimentais indicam o aumento da atividade hidrolítica, bem como maior conversão de sacarose para frutose no sistema preparado com maior quantidade de resina.

Tabela 13. Atividade hidrolítica de diferentes sistemas Dowex®4-200/invertase (IA médio de 97%) determinados nos ensaios em batelada (TOMOTANI, 2002).

Resina Dowex®4-200 (mg)	Invertase (mL)	*Atividade (U.mL ⁻¹)
100	0,5	0,037
100	1,0	0,052
100	3,0	0,120
200	3,0	0,230

*A unidade de atividade invertásica (U) foi definida como sendo a quantidade de ART (mg) formado por minuto por mililitro do meio reacional.

Segundo citam os autores, READY, *et al.* (1990) e De QUEIROZ, *et al.*, (1996), a invertase possui estrutura quaternária formada por duas cadeias peptídicas, que podem se aglutinar formando agregados supra moleculares tetra, hexa e/ou octaméricos. Esmon *et al.* (1987) constataram, inclusive, que a atividade hidrolítica da invertase aumentava com o grau de agregação de suas moléculas. Provavelmente, nos sistemas constituídos com menor quantidade de resina, esses agregados, tetrâmeros, hexâmeros e octâmeros, poderiam estar mais fortemente aderidos à resina e então apresentar um certo comprometimento na interação do substrato com o sítio ativo. No entanto, ao dobrar a quantidade de resina, essas formas supramoleculares de invertase se encontrariam melhor distribuídas pelas partículas da resina elevando a atividade enzimática nos sistemas imobilizados.

Quanto aos valores de velocidade de reação (r), nos sistemas imobilizados preparados com 3,28mg de proteína (I-5, I-6) observa-se que não houve diferenças significantes entre si. No entanto, o sistema constituído de 1,64mg de enzima mostrou melhor desempenho ao duplicar e quadruplicar a quantidade da resina .

Tabela 14. Eficiência dos sistemas imobilizados (I-3 a I-7). A eficiência é a razão entre a velocidade de reação da enzima imobilizada e a solúvel. A velocidade de reação da enzima solúvel para 1,64mg e 3,28mg de proteína foram respectivamente 0,50 e 0,22 mmol de ART.h⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

Ensaio	Velocidade de reação (mmol ART.h ⁻¹ .mg ⁻¹ de proteína)	Eficiência do sistema imobilizado (%)
I-3	0,13	26,0
I-4	0,25	50,0
I-5	0,05	22,7
I-6	0,07	31,8
I-7	0,50	100

Nota-se a partir da Tabela 10 e da Figura 2, o aumento do valor da eficiência e do intervalo da fase estacionária ao empregar maior quantidade de resina. Para

dar continuidade ao estudo realizou-se um teste exploratório (I-8) utilizando-se o sistema constituído por 3,28mg de proteína e 100mg de resina para então prosseguir para a determinação de melhores condições para a hidrólise da sacarose.

6.2.1. Efeito da concentração da sacarose na atividade invertásica

Nos estudos anteriores utilizou-se uma solução de sacarose com concentração de 100mM para avaliar o desempenho da invertase imobilizada.

Prosseguiu-se para único ensaio empregando-se o sistema imobilizado (3,28mg de proteína de Bioinvert[®]/100mg de resina) porém com finalidade de verificar a possível inibição enzimática pelo substrato. Utilizou-se neste estudo duas concentrações de substrato em separado a saber, 100mM e 50mM (as primeiras 23h alimentando-se com sacarose 100mM e as demais 23h seguintes com 50mM na vazão específica de $0,4 \text{ h}^{-1}$) (Figura 3).

A Figura 3 mostra o desempenho da hidrólise da sacarose nas condições já mencionadas e os respectivos valores médios de rendimento bem como a atividade enzimática estão apresentados na Tabela 15.

Figura 3: Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-8 [invertase imobilizada (3,28mg de proteína /100mg de resina)] onde a [sacarose]=100mM no intervalo de 0-23h e [sacarose]=50mM no intervalo de 23-46h. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de $0,4 \text{ h}^{-1}$ e agitação entre 100-150rpm.

Tabela 15: Valores médios obtidos no ensaio I-8.

[Sacarose], mM	r, mmol/h.mg _{enzima imob}	X, %
50	0,14	100
100	0,12	97,0

Embora o sistema I-8 tenha apresentado uma boa conversão em ambas as concentrações, quando comparado com o valor da velocidade de reação média do imobilizado I-7 (1,64mg de proteína/100mg de resina), seu valor foi bem menor.

Nos demais testes, por conseguinte, empregou-se a razão 1,64mg de proteína (0,5mL de Bioinvert[®]) para 100 mg de resina para o preparo do sistema imobilizado.

O perfil do grau de conversão dos ensaios I-9 a I-12 [estudo do efeito da concentração do substrato ([S]), a saber, [S] = 2,5; 5,0; 6,25; 12,5; 25 e 50 mM, onde cada ensaio teve uma duração de 24 horas e a vazão específica foi mantida ($D=0,4h^{-1}$)] está apresentado na Figura 4. Na Tabela 16 são mostrados os respectivos valores de "r" e "X" dos ensaios I-9 a I-12.

Tabela 16: Valores médios obtidos nos estudos do efeito do substrato empregando-se $D=0,4h^{-1}$ (1,64mg de proteína/100mg de resina) – ensaios I-9 a I-12.

Ensaio	[Sacarose], mM	r, mmol/h.mg _{enzima imob}	X, %
I-9	50	0,28	100
I-10	25	0,28	100
I-11	12,5	0,32	100
I-12	6,25	0,31	100

Comparando-se os valores médios obtidos para 50mM e 25mM em relação aos valores médios obtidos para 12,5mM e 6,25mM, observa-se um aumento de 11% na velocidade da reação (r) com a redução da concentração de substrato. Salienta-se, também, que houve maior estabilidade operacional (em termos de duração do estado estacionário) no ensaio onde a menor concentração de sacarose foi empregada (6,25mM).

Figura 4: Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios I-9 a I-12 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foram variadas as concentrações de sacarose: 50mM (◇); 25mM (□); 12,5mM (△) e 6,25mM (○) . Foram mantidas as seguintes condições operacionais: volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa), vazão específica de 0,4h⁻¹ e agitação entre 100-150rpm.

O passo subsequente foi variar a vazão (4mL.h⁻¹-8mL.h⁻¹-16mL.h⁻¹) mantendo-se a concentração de substrato em 6,25mM tanto quanto as condições do processo (pH e temperatura) e, então, avaliar as velocidades enzimáticas do sistema imobilizado em cada situação (Figura 5).

A Tabela 17 com seus respectivos valores de “r” e “X” obtidos para cada vazão mostra claramente que o aumento da vazão melhora a performance do processo de hidrólise da sacarose, o que também pode ser visualizado na Figura 6, onde empregou-se 5mM de sacarose – a mudança da vazão foi efetuada após 10 horas de processo (Tabela 18 e Figura 6).

Tabela 17: Valores médios de r e X obtidos no ensaio I-13 [estudo do efeito da vazão específica D=0,4h⁻¹, 0,8 h⁻¹ e 1,6 h⁻¹ usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina, [S]=6,25mM)].

D, h ⁻¹	r, mmol/h.mg _{enzima imob}	X, %
0,4	0,22	80,4
0,8	0,38	73,2
1,6	0,91	89,1

Tabela 18: Valores médios de r e X obtidos nos ensaios I-14 e I-15 [estudo do efeito da vazão específica $D=0,4h^{-1}$, $0,8 h^{-1}$ e $1,6 h^{-1}$ usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina, $[S]=5mM$)].

D, h^{-1}	$r, mmol.h^{-1}.mg^{-1}_{enzima\ imob}$	$X, \%$
0,4	0,26	100
0,8	0,49	97,4
1,6	0,71	70

Figura 5: Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para o ensaio I-13 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a vazão de alimentação: $4mL.h^{-1}$, $8mL.h^{-1}$ e $16mL.h^{-1}$. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: $[sacarose]= 6,25mM$, volume do reator= $10mL$, $30^{\circ}C$, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.

Os dados apresentados nas Tabelas 17 e 18, mostram o aumento dos valores das velocidades enzimáticas em função da vazão específica (D). Os estudos realizados com diferentes concentrações de sacarose, (6,25mM – condição 1 e 5mM – condição 2) mostram que ao duplicar o valor de D , as respectivas velocidades apresentaram em média 100% de aumento para a condição 1 (73% para $0,4-0,8h^{-1}$ e 100% para $0,8-1,6h^{-1}$) e 67% para a condição 2 (88,5% para $0,4-0,8h^{-1}$ e 45% para $0,8-1,6h^{-1}$).

Nota-se que em baixa concentração de substrato e maior D , o desempenho da enzima é favorecido. Provavelmente, esse aumento pode ser devido à maior remoção de produtos formados, bem como à facilidade da interação enzima/substrato nessas condições.

Figura 6: Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para o ensaio I-14 e I-15 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a vazão de alimentação: 8mL.h^{-1} para 4mL.h^{-1} (◇) e 16mL.h^{-1} para 8mL.h^{-1} (□). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 5 mM, volume do reator=10mL, 30°C , pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.

Verificado a melhoria do desempenho enzimático com o aumento de D , prosseguiu-se para a avaliação do efeito da concentração do substrato frente à vazão específica de 0,8 e $1,6\text{ h}^{-1}$ (Fig. 7).

Figura 7: Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios I-16 a I-19 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a concentração da sacarose: 50mM (◇), 25mM (□), 12,5mM (△) e 6,25mM (○). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: vazão de alimentação para as primeiras 10 horas foi 8mL.h^{-1} e as demais horas foi 16mL.h^{-1} , volume do reator=10mL, 30°C , pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.

Tabela 19: Valores médios obtidos nos ensaios I-16 a I-19 [estudos do efeito da vazão em função do substrato usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina)].

Ensaio	[sacarose], mM	r, mmol/h.mg _{enzima imob}		X, %	
		D= 1,6h ⁻¹	D= 0,8h ⁻¹	D= 1,6h ⁻¹	D= 0,8h ⁻¹
I-16	50	1,04	0,45	89,0	100
I-17	25	0,64	0,29	62,3	56,0
I-18	12,5	0,83	0,40	80,3	77,3
I-19	6,25	1,12	0,52	100	100

Os resultados apresentados na tabela 19, mostram que “r” aumenta com o aumento de D independentemente da concentração do substrato. Apesar de r obtido no ensaio I-16 (50mM de sacarose) ser adequado para a hidrólise da sacarose, optou-se por utilizar solução menos concentrada deste substrato, a fim de que o teor de glicose no açúcar invertido estivesse dentro da faixa requerida para a ação da glicoseoxidase (conforme descrito no item no item 6.3).

Em seguida, comparou-se os valores de “r” para as seguintes situações, a saber, concentrações de sacarose de 5mM (I-14 e 15) e 2,5mM (I-20, 21 e 22) aplicando vazão de alimentação de 4mL.h⁻¹, 8mL.h⁻¹ e 16mL.h⁻¹ (Figuras 6 e 8). Na Tabela 20 estão apresentados os respectivos valores obtidos.

Figura 8: Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios I-20 a I-22 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variada a vazão de alimentação: [I-20- 4mL.h⁻¹ (◇)], [I-21- 8mL.h⁻¹ (□)] e [I-22 - 16mL.h⁻¹ (△)]. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 2,5mM, volume do reator=10mL, 30°C, pH 5,5, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.

Tabela 20: Valores médios obtidos nos estudos do efeito da vazão em função do substrato usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina): 2,5mM e 5mM de sacarose.

Ensaio	[sacarose], mM	r, mmol/h.mg _{enzima imob}			X, %		
		D= 1,6h ⁻¹	D= 0,8h ⁻¹	D= 0,4h ⁻¹	D= 1,6h ⁻¹	D= 0,8h ⁻¹	D= 0,4h ⁻¹
I-14 e 15	5,0	0,71	0,49	0,26	100	97,4	100
I-20, 21 e 22	2,5	0,88	0,50	0,36	100	98	80

Os estudos seguintes, de pH tanto como o de temperatura, foram realizados empregando-se a condição na qual ocorreu o maior valor de “r”, a saber: D=1,6h⁻¹, 30°C e 2,5mM de sacarose (Ensaio I-20 conforme apresentado na Tabela 20).

6.2.2. Efeito do pH

O aumento do “r” com o pH corrobora o que se evidenciou no estudo previamente feito em batelada (TOMOTANI e VITOLO, 2004), ou seja, deslocamento para a faixa menos ácida. O pH 5,5 é o mais adequado para a hidrólise da sacarose o que coincide com o melhor pH para a atividade enzimática da glicose oxidase (Tabela 21 e Figura 9).

Tabela 21: Valores médios obtidos de “r” e “X” nos ensaios I-22 a I-24 usando a invertase imobilizada: estudos do efeito do pH na hidrólise da sacarose].

pH	r, mmol/h.mg _{enzima imob}	X, %
5,0	0,76	73,3
5,5	0,88	98,0
6,0	0,74	72,8

Figura 9: Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios I-22 a I-24 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variado o pH: [I-22-5,0(◇)], [I-23-5,5 (□)] e [I-24-6,0 (△)]. Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 2,5mM, volume do reator=10mL, 30°C, vazão de alimentação de 16mL.h⁻¹, membrana de celulose regenerada (corte molecular de 100kDa) e agitação entre 100-150rpm.

6.2.3. Efeito da temperatura

Neste presente estudo, além de determinar os parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica, utilizando-se a forma integrada da equação de Arrhenius, verificou-se também a viabilidade de se empregar a membrana de microfiltração (membrana de 5µm) no mesmo biorreator.

A partir dos dados apresentados na Tabela 22, calculou-se a Energia de ativação (E'a) para a desnaturação térmica da enzima imobilizada bem como os parâmetros termodinâmicos para 45°C para ambas as situações utilizando-se membrana de 100kDa ou de 5µm.

Tabela 22: Valores médios obtidos de "r" e "X" nos ensaios I-22 e I-25 a I-27 usando a invertase imobilizada (1,64mg de proteína/100mg de resina): estudos do efeito da temperatura na hidrólise da sacarose empregando membrana com "cut off" de 100kDa ou de 5µm.

T, °C	r, mmol/h.mg _{enzima imob}		X, %	
	100kDa	5µm	100kDa	5µm
30	0,88	1,02	98,0	99,3
45	0,70	0,51	67,7	49,8

A equação integrada de Arrhenius para o cálculo de E_a' (SEGEL, 1979) está apresentada abaixo:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a'}{2,303 \times R} \times \frac{(T_1 - T_2)}{T_2 \times T_1} \quad (\text{Eq.17})$$

Onde:

$k_1=r_1= 0,70$ ou $0,51$ e $k_2=r_2= 0,88$ ou $1,02$;

$T_1= 318\text{K}$ (45°C) e $T_2= 308\text{K}$ (30°C);

$R= 8,31 \text{ J.}(\text{k.mol})^{-1}$ (constante universal dos gases);

E_a' = Energia de ativação para desnaturação térmica.

Substituindo-se os termos das equações pelos seus valores reais, tem-se que E_a' é igual a $12,5 \text{ kJ}$ e $38,2 \text{ kJ}$ para 100kDa e $5\mu\text{m}$, respectivamente.

Os cálculos de $\Delta S'$, $\Delta G'$ e $\Delta H'$ foram determinados conforme descrito por CASTELLAN (1979). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Parâmetros termodinâmicos calculados para a invertase imobilizada ($1,64\text{mg}$ de proteína/ 100mg de resina) a 318K empregando-se membrana com "cut off" de 100kDa ou de $5\mu\text{m}$.

Membrana	E_a' , kJ.mol^{-1}	$\Delta G'$, kJ.mol^{-1}	$\Delta H'$, kJ.mol^{-1}	$\Delta S'$, $\text{kJ.}(\text{K.mol})^{-1}$
100kDa	12,5	-13,1	9,82	$7,08 \times 10^{-2}$
5μm	38,2	-13,2	35,5	$1,51 \times 10^{-1}$

Da Tabela 23 observa-se que o sistema imobilizado em biorreator com membrana de $5\mu\text{m}$ apresenta maior E_a' e conseqüentemente, maior é sua estabilidade operacional em comparação com a de 100kDa . Embora o aumento da temperatura tenha reduzido 20% e 50%, na velocidade enzimática nos sistemas com a membrana de ultrafiltração e de microfiltração respectivamente, o valor necessário de E_a' para afetar o sistema de $5\mu\text{m}$ mostrou-se superior ao de 100kDa (Tabela 22).

Apesar do $\Delta H'$ para o sistema com a membrana de microfiltração ser maior do que a de ultrafiltração, conforme mostram os dados acima, segundo OWUSU, *et al.* (1992), somente valores de $\Delta H'$ da ordem de $200\text{-}300\text{kJ.mol}^{-1}$ causariam desnaturação da proteína através de desarranjos na sua estrutura terciária e/ou quaternária. Em ambos os casos acima citados os valores de $\Delta H'$ é pelo menos 99% (100kDa) e 82% ($5\mu\text{m}$) inferior ao indicado acima.

A queda do “r” em função da temperatura poderia ser atribuída em maior grau à desagregação das estruturas supramoleculares da invertase ligada ao suporte do que a perturbações nas estruturas terciária e quaternária da enzima.

Figura 10: Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para o ensaio I-22 e I-25 a I-27 [invertase imobilizada (1,64mg de proteína /100mg de resina)]. Foi variado a temperatura e o “cut off” da membrana: 30°C e 100kDa(◇), 30°C e 5μm(□), 45°C e 100kDa(△) e 45°C e 5μm (○). Foram mantidas as seguintes condições operacionais: [sacarose]= 2,5mM, volume do reator=10mL, pH=5,5, vazão de alimentação de 16mL.h⁻¹, e agitação entre 100-150rpm.

6.3. Glicose oxidase (GOD)

A aplicação da glicose oxidase no reator da “Bioengeneering” foi baseado no estudo prévio descrito por Tomotani *et al.* (2005). A melhor condição de ensaio obtida foi quando 1mg.mL^{-1} de enzima foi empregada alimentando-se o sistema com 2,5mM de glicose (solução tamponada de acetato de sódio 10mM, cujo pH foi acertado para 5,5, e temperatura mantida a 30°C).

Como estudo inicial, determinou-se os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da glicose oxidase através dos ensaios realizados em batelada, conforme descrito na Metodologia (item 5.4).

A partir dos dados obtidos prosseguiu-se para os estudos em processo contínuo.

6.3.1. Caracterização da Glicose oxidase (ensaio em batelada).

6.3.1.1. Efeito do pH na atividade da GOD

Os resultados referentes ao efeito do pH sobre a atividade da GOD são apresentados na Tabela 24 e Figura 11.

Da figura 11 observa-se que a maior atividade ocorre em pH5,5, que está de pleno acordo com os resultados da literatura (RABA, MOTTOLA, 1995; FOGARTY, KELLY, 1990).

Tabela 24. Efeito do pH sobre a atividade da GOD (Ensaio GOD-1)

pH	Atividade, (U.mL ⁻¹)X10 ²
4,0	0,735
4,5	1,47
5,0	1,63
5,5	1,64
6,0	1,43
6,5	1,26

Figura 11. Efeito do pH sobre a atividade da GOD

6.3.1.2. Efeito do pH na estabilidade da GOD

Os resultados relacionados ao efeito do pH sobre a estabilidade da glicose oxidase são mostrados na Tabela 25 e Figura 12.

Tabela 25. Efeito do pH sobre a estabilidade da glicose oxidase. Os valores constantes do corpo da tabela representam a atividade residual da GOD (U.mL⁻¹)x10³.

Tempo, h	pH					
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
1	3,35	3,84	3,02	3,74	4,76	2,99
5	4,11	3,62	4,81	3,44	3,56	3,88
10	3,68	3,00	2,72	2,81	3,34	3,02
15	3,88	2,87	3,43	3,91	4,31	3,31
20	4,54	3,91	2,92	3,28	3,98	3,02
25	4,30	4,32	3,52	3,28	3,28	3,13
30	4,57	4,01	4,03	3,38	2,81	3,15
Valor médio	4,06	3,65	3,49	3,41	3,72	3,21
Desvio-padrão	0,42	0,49	0,67	0,33	0,62	0,29

Figura 12. Efeito do pH sobre a estabilidade da glicose oxidase [pH 4,0 (◇), pH4,5 (□), pH5,0 (△), pH 5,5(×), pH 6,0 (*) e pH 6,5 (○)].

Da Tabela 25 nota-se que a estabilidade da GOD ao longo do tempo variou de acordo com o pH da solução, sendo a atividade residual em pH 4,0 cerca de 21% e 16% superior àquelas em pH 6,5 e 5,5, respectivamente. A menor variação na atividade residual da GOD ocorrida em pH 5,5, coincide com o fato de ser este o valor de pH no qual a enzima apresenta maior atividade. As variações da atividade residual ocorridas ao longo do tempo nos diferentes pH, provavelmente estariam relacionadas às características estruturais da enzima.

Segundo FOGARTY e KELLY (1990) a GOD é constituída por duas cadeias peptídicas unidas por pontes de dissulfeto, contendo cada uma delas um íon ferroso e um grupo FAD. De acordo com o pH da solução, os grupos ionizáveis das cadeias laterais dos aminoácidos constituintes da proteína sofrem diferentes graus de ionização, acarretando modificações conformacionais ao nível das estruturas terciária e quaternária da macromolécula. As mudanças conformacionais, por sua vez, afetariam o posicionamento dos íons Fe^{2+} e do FAD, tornando-os mais ou menos propensos às reações de óxido-redução. Dependendo do posicionamento intramolecular relativo dos grupos FAD, sua participação no mecanismo catalítico da GOD (glicose $\rightarrow$ ácido glicônico + H_2O_2) poderia ser afetada, além de não estar descartada a ocorrência de uma reação de óxido-redução intramolecular com os íons ferrosos. Lembra-se que o Fe^{+2} pode ceder seu elétron ao FAD, transformando-se em Fe^{+3} e o FAD acabar sendo parcial ou totalmente reduzido. Nesta última

situação, o FAD não estaria adequadamente disponível para participar da catálise, podendo-se, em consequência, esperar a variação na atividade residual da GOD.

6.3.1.3. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da glicose oxidase

6.3.1.3.1. Efeito da temperatura na atividade da GOD

Na Tabela 26 e Figura 13 apresentam-se os resultados referentes ao efeito da temperatura sobre a atividade da glicose oxidase.

Tabela 26. Efeito da temperatura sobre a atividade da glicose oxidase.

T, °C	Atividade, (U.mL ⁻¹)X10 ³
25	3,56
30	4,60
35	5,00
40	5,60
45	6,20
50	6,87
55	5,33

Frente aos resultados obtidos nota-se que a maior atividade da GOD ocorreu a 50°C. Da Figura 13 observa-se, também, que a atividade da GOD aumenta linearmente dentro da faixa de temperatura entre 25°C e 50°C, tendo-se estabelecido a equação:

$$v = 1,25 \times 10^{-4} \cdot T + 6,25 \times 10^{-4} \quad (r = 0,993) \quad (\text{Eq.18})$$

Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade da GOD

Aplicando-se o método convencional de Arrhenius, determinou-se a energia de ativação (E_a) da reação catalisada pela GOD (Tabela 27 e Figura 14).

A equação que correlaciona $\log v = f(1/T)$, de acordo com a curva mostrada na Figura 14, é:

$$\text{Log } v = -1030.(T^{-1}) + 1,35 \quad (r = -0,989) \quad (\text{Eq.19})$$

Por conseguinte, o valor calculado para E_a é 19,4kJ/mol. Aplicando-se as equações termodinâmicas clássicas, calculou-se os demais parâmetros termodinâmicos relacionados com a reação catalisada pela GOD, a saber, $\Delta G = -14,5$ kJ/mol, $\Delta H = 16,9$ kJ/mol e $\Delta S = 0,105$ kJ/mol.

Tabela 27. O logaritmo da atividade da GOD em função do inverso da temperatura do meio reacional.

$T^{-1}, (K^{-1}) \times 10^3$	Log v
3,36	-2,45
3,30	-2,34
3,25	-2,30
3,19	-2,25
3,14	-2,21
3,10	-2,16

Figura 14. Gráfico baseado no método de Arrhenius para calcular a Energia de ativação da reação calculada pela GOD.

6.3.1.3.2. Estabilidade da GOD frente à temperatura

Na Tabela 28 são apresentadas a atividade residual frente às temperaturas compreendidas na faixa 25°C – 50°C (variada de 5 em 5°C). através da regressão linear procurou-se estabelecer as equações de $\log v = f(t)$ para cada temperatura estudada. Obtiveram-se equações lineares com bons coeficientes de correlação somente às temperaturas de 45°C e 50°C, respectivamente, Eq. 20 e 21.

$$(45^{\circ}\text{C}) \log v = -0,0057.t - 3,347 \quad (r=0,991) \quad (\text{Eq.20})$$

$$(50^{\circ}\text{C}) \log v = -0,019.t - 2,411 \quad (r=0,997) \quad (\text{Eq.21})$$

Como se dispõe de dois valores da constante de inativação térmica a duas temperaturas distintas, foi possível estimar a energia de ativação para o processo de inativação térmica (E_a) da GOD através da forma integrada da equação de Arrhenius (SEGEL, 1979).

Substituindo-se os termos da Eq.9 pelos seus valores reais, a saber, 323K (T_2), 318K (T_1), $0,0057\text{h}^{-1}$ (k_2), $0,019\text{h}^{-1}$ (k_1) e $8,31\text{kJ} \cdot (\text{K} \cdot \text{mol})^{-1}$ (R), tem-se que a E_a é igual a 206,6 kJ/mol. Em decorrência foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos relacionados com a inativação térmica da GOD à temperatura de 318K

Assim, tem-se $\Delta G' = -9,46\text{kJ/mol}$, $\Delta H' = 204\text{kJ/mol}$ e $\Delta S' = 0,671\text{kJ/mol}$. Para as temperaturas menores que 45°C o coeficiente de variação da atividade enzimática residual sempre foi inferior a 10%, indicando que a GOD é relativamente estável por 30h nestas temperaturas.

Tabela 28. Estabilidade da GOD frente à temperatura. Os valores foram expressos como $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) \times 10^3$, sendo o logaritmo decimal da atividade mostrado entre parêntesis.

t, h	Temperatura					
	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
1	3,52 (-2,45)	3,91 (-2,41)	4,01 (-2,40)	3,99 (-2,40)	4,51 (-2,35)	3,55 (-2,43)
5	4,16 (-2,38)	3,75 (-2,43)	4,00 (-2,40)	3,86 (-2,41)	4,13 (-2,38)	3,05 (-2,52)
10	3,61 (-2,44)	3,44 (-2,46)	3,84 (-2,42)	3,77 (-2,42)	3,97 (-2,40)	2,63 (-2,52)
15	3,49 (-2,46)	3,31 (-2,48)	3,73 (-2,43)	3,73 (-2,43)	3,70 (-2,43)	1,99 (-2,70)
20	4,27 (-2,37)	3,28 (-2,48)	3,56 (-2,48)	3,61 (-2,44)	3,40 (-2,47)	1,55 (-2,81)
25	3,69 (-2,43)	3,26 (-2,49)	3,25 (-2,49)	3,56 (-2,45)	3,29 (-2,48)	1,35 (-2,87)
30	4,07 (-2,39)	3,81 (-2,55)	3,11 (-2,51)	3,56 (-2,45)	2,63 (-2,58)	1,28 (-2,98)

6.3.1.3.3. Efeito da concentração da glicose na atividade da glicose oxidase

A Tabela 29 mostra a variação da atividade enzimática em função da concentração de glicose, enquanto que a Figura 15 mostra a correlação linear entre os inversos da atividade e da concentração de substrato, conforme o método convencional de Lineweaver-Burk. O bom coeficiente de correlação ($r=0,995$) da reta $v^{-1}=f([S]^{-1})$ indica que a cinética da reação catalisada pela GOD seguiu o modelo de Michaelis-Menten. Da equação 14 calcularam-se as constantes cinéticas, a saber, $K_M = 29\text{mM}$ e $V_{\max} = 75,2 \times 10^{-3} \text{ U.mL}^{-1}$. O valor do K_M encontrado na literatura para a GOD proveniente do *A. niger* tem magnitude comparável aos valores encontrados na literatura, a saber, 30mM (FOGARTY, KELLY, 1990) e 33mM (BARMAN, 1969; SWOBODA, *et al.*, 1969).

$$v^{-1} = 385,95 ([S]^{-1}) + 13,29 \quad (r=0,995) \quad \text{Eq.22}$$

Tabela 29. Variação da atividade da GOD frente à concentração da glicose.

[Glicose], mM	[glicose] ⁻¹ , (mM) ⁻¹	v, (U.mL ⁻¹)x10 ⁻³	v ⁻¹ , (U.mL ⁻¹) ⁻¹
2,2	0,455	5,38	185,9
4,4	0,227	6,96	143,7
6,6	0,150	14,7	68,0
8,8	0,114	18,1	55,3
11	0,0909	21,5	46,5
15	0,0667	23,9	41,8
20	0,0500	30,7	32,6

Figura 15. Os inversos da atividade da GOD versus os inversos das concentrações de glicose, elaborado conforme o método de Lineweaver-Burk $\{v^{-1} = 385,95[s]^{-1} + 13,29 \quad (R^2=0,99)\}$.

6.3.1.3.4. Efeito da concentração da H_2O_2 na atividade da glicose oxidase

Na Tabela 30 e Figuras 16 e 17 tem-se o efeito da presença da água oxigenada sobre a GOD antes da introdução da glicose no meio reacional. No caso, deixou-se a GOD em contato por 5 minutos com uma dada quantidade de H_2O_2 ($0,030 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,060 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ ou $0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$), adicionando-se em seguida a glicose. O acúmulo de água oxigenada foi registrado por 315 segundos. Observa-se claramente que o contato prévio da GOD (4 mg.mL^{-1}) com concentrações de H_2O_2 superiores a $0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$ acarretaram a perda da capacidade catalítica da enzima.

Tabela 30. Acúmulo de água oxigenada no meio reacional resultante da oxidação da glicose pela GOD, deixada previamente em contato por 5min com diferentes quantidades do referido produto (* $0,030 \text{ mg.mL}^{-1}$, ** $0,060 \text{ mg.mL}^{-1}$, *** $0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ e **** $0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$).

t, s	H_2O_2 formada, mg.mL^{-1}			
0	0,0406*	0,0619**	0,169***	0,911****
45	0,0414	0,0633	0,171	0,911
90	0,0416	0,0638	0,175	0,911
135	0,0428	0,0638	0,178	0,911
180	0,0280	0,0664	0,181	0,911
225	0,0450	0,0671	0,184	0,911
270	0,0480	0,0684	0,189	0,911
315	0,0503	0,0719	0,195	0,911

Figura 16. Água oxigenada formada na oxidação da glicose pela GOD, após o contato prévio de 5min da enzima com a solução de H_2O_2 na concentração de $0,030 \text{ mg.mL}^{-1}$ (x) e $0,060 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Δ).

Figura 17. Água oxigenada formada na oxidação da glicose pela GOD, após o contato prévio de 5min da enzima com a solução de H₂O₂ na concentração de 0,30 mg.mL⁻¹ (◇) e 0,60 mg.mL⁻¹ (□).

6.3.1.3.5. Efeito inibitório da água oxigenada sobre a atividade da glicose oxidase

Na Tabela 31 são mostrados os valores da atividade da GOD frente a diferentes concentrações de glicose e com a presença ou ausência de H₂O₂ desde o início da reação.

Analisando-se as curvas mostradas na Figura 18, concluiu-se que a H₂O₂ atua como inibidor reversível não competitivo. Como primeira aproximação para explicar este tipo de inibição, seria considerar que a água oxigenada oxidaria os íons Fe⁺² a Fe⁺³, localizados fora do domínio do sítio ativo, causando perturbações na estrutura da enzima, que se traduziria em diminuição do desempenho catalítico. A viabilidade da reação de óxido-redução ($2\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{Fe}^{+3} + 2\text{H}_2\text{O}$) dever-se-ia ao fato dos potenciais de redução em meio ácido dos pares Fe⁺³/Fe⁺² e H₂O₂/H₂O serem, respectivamente iguais a +0,771V e +1,77V (OHLWEILER, 1968).

Tabela 31. Atividade da GOD frente a diferentes concentrações de glicose na ausência e na presença de H_2O_2 (concentração inicial de $0,036 \text{ mg.mL}^{-1}$).

[Glicose], mM	$v_i, (\text{U.mL}^{-1}) \times 10^3$	$[\text{Glicose}]^{-1}, (\text{mM})^{-1}$	$v_i^{-1}, (\text{U.mL}^{-1})^{-1}$	$v, (\text{U.mL}^{-1}) \times 10^3$	$v^{-1}, (\text{U.mL}^{-1})^{-1}$
2,2	-	0,445	-	5,38	186
4,4	5,00	0,227	200	6,94	144
6,6	6,66	0,152	150	14,7	68,0
8,8	7,86	0,114	127	18,1	55,3
11	12,5	0,0910	80,0	21,5	46,5
15	12,8	0,0666	78,1	23,9	41,8
20	-	0,050	-	30,7	32,6

Figura 18. Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação das constantes cinéticas da GOD na presença (□) e na ausência de inibidor (◇).

Por conseguinte, obteve-se $K_M=29,0\text{mM}$ e $V_{\max}=75,2 \times 10^{-3} \text{ U.mL}^{-1}$ para a GOD na ausência de H_2O_2 e $(K_M)_i=34,3\text{mM}$ e $(V_{\max})_i=43,1 \times 10^{-3} \text{ U.mL}^{-1}$ na presença do inibidor. Utilizando a equação $v=f(t)$ escrita de forma a englobar o efeito inibitório não competitivo (MORRIS, 1972), foi possível estimar o valor da constante de inibição (K_i), que foi igual a $1,12\text{mM}$.

6.3.2. Biorreator com membrana da “Bioengineering” operando com a glicoseoxidase

Foram feitos 7 ensaios com o objetivo de verificar o comportamento da glicose oxidase em reator com membrana da “Bioengineering” para converter a glicose em ácido glicônico.

Nas Tabelas 32 a 34 e nas Figuras 19 a 21 são apresentados os principais resultados experimentais dos ensaios mencionados na Tabela 6.

A quantidade empregada da enzima (0,219mg de proteína) para estes ensaios foi adotada em conformidade com o resultado apresentado por TOMOTANI, DAS NEVES e VITOLO (2005). Neste estudo prévio realizado em reator da “Bioengineering” foram estudadas concentrações diferentes de glicose oxidase (1 e 2 mg/mL) tanto como de substrato (2,5mM e 5mM). A melhor condição foi observada quando alimentou-se com 2,5mM de glicose o reator contendo 1mg.mL^{-1} de enzima (0,219mg de proteína). A melhor conversão obtida foi 55% nas seguintes condições adotadas, a saber, 30°C , pH 5,5, $D=0,15\text{ min}^{-1}$.

Partindo-se, então das informações acima, optou-se em manter as quantidades da enzima tanto como a do substrato e variar a vazão de alimentação (ensaios GOD-8 a GOD-11). Pôde-se notar que na vazão de 60mL.h^{-1} o sistema apresentou-se mais estável ao longo do ensaio (Fig 19).

A queda de conversão nas primeiras horas podem ser devidas à inibição causada pelo peróxido de hidrogênio formado e já mencionado anteriormente nos ensaios realizados em batelada (Fig 16 e 17). O aumento da vazão amenizaria então, o efeito inibitório sobre a enzima e estabilizando-a ao longo do ensaio (Tabela 32 e Fig 19).

Salienta-se, também, uma conversão média maior no ensaio GOD-10 (80,9%), porém a estabilidade do sistema ao empregar a vazão de alimentação de 60mL.h^{-1} chama a atenção porque o seu regime estacionário permite avaliar com maior facilidade os demais parâmetros como efeito frente ao pH e à temperatura.

Tabela 32. Valores médios obtidos no estudo do efeito da vazão específica (D).

Ensaio	D (h^{-1})	r, $\text{mmol/h.mg}_{\text{enzima}}$	X, %
GOD-8	1	$5,96 \times 10^{-2}$	52,2
GOD-9	1,5	$4,77 \times 10^{-2}$	28,2
GOD-10	3	$2,77 \times 10^{-1}$	80,9
GOD-11	6	$3,91 \times 10^{-1}$	58,5

Figura 19. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios GOD-8 a GOD-11. Variou-se a vazão de alimentação: 10mL.h^{-1} ($\diamond$), 15mL.h^{-1} ($\square$), 30mL.h^{-1} ($\triangle$) e 60mL.h^{-1} ($\circ$). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 30°C , $[\text{GOD}]=1\text{mg.mL}^{-1}$ (0,219mg de proteína), $[\text{glicose}]=2,5\text{mM}$ e agitação entre 100-150 rpm.

Adotando-se o melhor D como 6 h^{-1} , partiu-se para a avaliação do seu desempenho em função da temperatura e do pH. Os resultados médios obtidos nestes ensaios estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33. Valores médios obtidos nos estudos do efeito da temperatura e do pH.

Ensaio	pH	T, $^\circ\text{C}$	r, $\text{mmol/h.mg}_{\text{enzima}}$	X, %
GOD-11	5,5	30	$3,91 \times 10^{-1}$	58,5
GOD-12	5,5	45	$2,97 \times 10^{-1}$	44,5
GOD-13	5,0	30	$2,29 \times 10^{-1}$	34,3
GOD-14	6,0	30	$2,11 \times 10^{-1}$	31,7

A partir da Tabela 33 e do perfil dos gráficos apresentados na Figura 21 nota-se que o pH 5,5 é o mais favorável coincidindo com o do estudo realizado em reator em batelada. Estimou-se também, a partir dos valores de “r” apresentados na tabela acima obtidos no estudo frente à temperatura, a Energia de ativação para a desnaturação térmica (E_a) da glicose oxidase tanto como os parâmetros termodinâmicos para 45°C . Os valores calculados estão apresentados na Tabela 34.

Figura 20. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios GOD-11 e GOD-12. Variou-se a temperatura da reação: 30°C(O) e 45°C (Δ). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação de 60mL/h, pH 5,5, $[GOD]=1\text{mg.mL}^{-1}$ (0,219mg de proteína), $[glicose]=2,5\text{mM}$ e agitação entre 100-150 rpm.

Tabela 34. Comparação dos parâmetros termodinâmicos da glicoseoxidase solúvel no ensaio em processo contínuo e em batelada estimados para 318K.

T (K)	E'a (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta G'$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta H'$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta S'$ (kJ.mol ⁻¹)
318	14,7	-1,8	12,1	$43,7 \times 10^{-3}$
318*	207*	-9,46*	204*	$6,71 \times 10^{-1}$ *

* Valores estimados no estudo realizado no reator do tipo batelada

Figura 21. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios GOD-11, GOD-13 e GOD-14. Variou-se o pH da reação: 5,0 (□), 5,5 (O) e 6,0 (Δ). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação de 60mL.h⁻¹, 30°C, $[GOD]=1\text{mg.mL}^{-1}$ (0,219mg de proteína), $[glicose]=2,5\text{mM}$ e agitação entre 100-150 rpm.

Quanto aos parâmetros termodinâmicos de desnaturação térmica, os valores da E'_a e do $\Delta H'$ para a glicose oxidase solúvel em processo contínuo foram em torno de 14 e 15 vezes menores respectivamente, quando comparados com os do processo em batelada.

Este resultado indica que a GOD em processo contínuo está sujeita à desnaturação térmica mais intensa do que no processo em batelada ($E'_a=14,7\text{kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta H'=12,1\text{kJ.mol}^{-1}$). Isto se deve ao fato de que a enzima estará submetida à temperatura de reação por um tempo bem mais longo do que no processo em batelada. Como o efeito desnaturante da temperatura é do tipo cumulativo (interações intramoleculares estabilizadoras das estruturas terciária e quaternária vão sendo destruídas paulatinamente ao longo da reação), quanto maior o tempo de exposição menor é a energia total necessária para a desnaturação térmica. Por conseguinte, no caso da GOD usada em reator contínuo a temperatura da reação não pode ultrapassar 45°C.

Segundo OWUSU, *et al.* (1992), valores de $\Delta H'$ acima de 200kJ levaria à desnaturação térmica da enzima através do desarranjo das estruturas terciária e/ou quaternária da molécula enzimática.

6.3.3. Imobilização da glicoseoxidase e desempenho no biorreator com membrana.

Na imobilização da enzima glicoseoxidase foram mantidas as quantidades de resina (100mg), da proteína (0,219mg), bem como o volume da suspensão e das condições previamente estabelecidas por TOMOTANI (2002). O procedimento está descrito no item 5.3.2.2.

Tabela 35. Resinas aniônicas (Dowex® 1x2, 4 e 8) empregadas como suporte para a imobilização de glicoseoxidase (razão da glicoseoxidase/resina: 0,219mg de proteína/100mg de resina seca) [32°C, pH5,5, 100 rpm durante 4horas], valores de índices de adsorção (IA, %) e as respectivas velocidades de reação média obtidas quando empregadas no biorreator da “Bioengineering®” [condição do ensaio: agitação entre 100 e 150rpm, 2,5mM de glicose, pH 5,5, 30°C, D= 6h⁻¹ e membrana de 100kDa].

Ensaio	Tipos de resinas	IA (%)	r (mmol/h.mg _{enzima})
GODi-1	2:100	86,5	1,09x10 ⁻¹
GODi-2	2:200	88,7	9,11x10 ⁻²
GODi-3	2:400	93,6	1,21x10 ⁻¹
GODi-4	4:50	83,4	9,49x10 ⁻²
GODi-5	4:100	78,5	9,39x10 ⁻²
GODi-6	4:200	76,6	1,54x10 ⁻¹
GODi-7	4:400	96,7	8,62x10 ⁻²
GODi-8	8:50	79,3	1,79x10 ⁻¹
GODi-9	8:100	84,4	1,37 x10 ⁻¹
GODi-10	8:200	78,2	1,11 x10 ⁻¹
GODi-11	8:400	85,2	1,44 x10 ⁻¹

Pela Tabela 35 observa-se que o índice de adsorção (IA) referente ao binômio glicoseoxidase/Dowex®, variou 6,5% em relação ao valor médio (84,6%).

As propriedades das resinas Dowex® podem ser alteradas tanto pela variação do tamanho das partículas quanto pelo número de ligações cruzadas na cadeia hidrocarbônica.

A variação do grau de ligações cruzadas da resina afeta primordialmente a sua intensidade de entumescimento. O grau de entrecruzamento de um copolímero estireno-divinilbenzeno por sua vez, é devido exclusivamente à fração de divinilbenzeno presente na estrutura da resina. Assim, as resinas Dowex® contendo 2% (código 1x2), 4% (código 1x4) e 8% (código 1x8) de ligações cruzadas, são formadas por partículas contendo respectivamente 2%, 4% e 8% de divinilbenzeno e 98%, 96% e 92% de estireno, respectivamente. O divinilbenzeno é o responsável pela conformação tridimensional da rede polimérica e pela sua insolubilidade em solventes comuns. Quanto maior o grau de intercruzamento menor é a capacidade da resina se expandir em meio aquoso, de tal sorte que resinas contendo intercruzamento acima de 30% não se prestam ao intercambiamento de íons (TOMOTANI, 2002).

Sabe-se que o intercruzamento apresentado por uma resina Dowex® deve ser tal a permitir uma expansão adequada do material para acelerar a difusão dos íons em seu seio, levando ao rápido estabelecimento do equilíbrio iônico entre a solução

e a resina. Por conseguinte, uma resina com baixo grau de intercrossamento apresenta alta expansibilidade, tornando suas partículas moles e deformáveis, o que explica os maiores índices de adsorção obtida nos preparados com as resinas contendo menor grau de intercrossamento (1x2), com exceção do binômio constituído por 1x4:400. No entanto, os maiores valores das velocidades de reação média foram aqueles constituídos pelas resinas 4:200 (GODi-6) e 8:50 (GODi-8) (Tabela 35).

O índice de adsorção superior a 75% para todos os ensaios se deve às moléculas da enzima possuírem carga efetiva negativa, tendo em vista o pHi da glicose oxidase ser igual a 4,1 (CRUEGER, 1990). Apesar dos ensaios GODi-3 (93,6%) e GODi-7 (96,7%) apresentarem maiores índices de adsorção as respectivas velocidades de reação não foram promissoras quando comparadas aos de GODi-6 (76,6%) e GODi-8 (79,3%). Provavelmente, a forte adesão das moléculas da enzima na resina dificultaram a interação substrato/enzima afetando o desempenho do imobilizado no reator com membrana.

A seguir são apresentadas as Figuras correspondentes às performances dos imobilizados apresentados na Tabela 35 (Figuras 22-24).

Figura 22. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-1 (Δ), GODi-2 (□) e GODi-3 (◇). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60mL.h⁻¹, pH 5,5, 30°C, [glicose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

Figura 23. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios GODi-4 (○), GODi-5 (△), GODi-6 (□) e GODi-7 (◇). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60mL.h^{-1} , pH 5,5, 30°C , [glicose]= $2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

Figura 24. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios GODi-8 (○), GODi-9 (△), GODi-10 (□) e GODi-11 (◇). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60mL.h^{-1} , pH 5,5, 30°C , [glicose]= $2,5\text{mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

Considerando os melhores resultados obtidos para a imobilização da glicose oxidase, escolheu-se o imobilizado GODi-6 (Dowex®4:200; IA=76,6% e $r=0,178 \text{ mmol/h.mg}_{\text{enzima}}$) ao invés de GODi-8 que apresentou maior valor de IA (79,3% e $r=0,179 \text{ mmol/h.mg}_{\text{enzima}}$) para o estudo frente ao pH e temperatura. Essa escolha foi devido ao fato da invertase imobilizada ser constituída pela mesma resina (1x4:200) e de ter como objetivo posterior a tentativa de imobilizá-las simultaneamente para a bioconversão da sacarose em um sistema monofásico.

As Figuras seguintes (25-27) mostram o comportamento da glicoseoxidase imobilizada frente ao pH (GODi:12-14), temperatura (GODi:13 e 15; 100kDa) e a sua performance no biorreator empregando membranas de microfiltração (GODi: 16 e 17; 5 μm).

Figura 25. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-12,13 e 14: pH 5,0 (△), pH 5,5 (□), pH 6,0 (◇). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60 mL.h^{-1} , 30°C , $[\text{glicose}]=2,5 \text{ mM}$, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

Figura 26. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-13 e 15: 30°C (◇) e 45°C (△). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60mL.h⁻¹, pH 5,5, [glicose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

Figura 27. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios GODi-16 e 17: 30°C (◇) e 45°C (△). Foram mantidos constantes: vazão de alimentação 60mL.h⁻¹, pH 5,5, [glicose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 5μm.

Na Tabela 36 estão apresentados os respectivos valores de “r” referentes ao estudo frente ao pH, temperatura e do desempenho da glicoseoxidase imobilizada no biorreator empregando membranas diferentes (100kDa e 5μm).

Tabela 36. Valores da velocidade de reação da glicoseoxidase imobilizada referentes ao estudo do efeito do pH, temperatura e empregando membranas de ultrafiltração ou de microfiltração.

Ensaio	GODi-12	GODi-13	GODi-14	GODi-15	GODi-16	GODi-17
r (mmol/h.mg _{enzima})	0,229	0,178	0,100	0,161	0,256	0,163

A partir da Figura 25 e da tabela acima, observa-se que em pH 5,0 o sistema imobilizado GODi-12 apresentou uma conversão em torno de 74% bem como “r” 28,7% maior em relação ao GODi-13 (pH5,5). Isso se deve ao fato de que o deslocamento do perfil da curva da atividade versus pH é de ocorrência comum, quando se empregam suportes carregados eletricamente (VITOLO, 2001). Como as resinas empregadas são aniônicas, e, portanto, possuidoras em sua estrutura de grupos com carga positiva, o deslocamento do perfil da melhor velocidade para uma faixa mais ácida de pH é esperado, conforme citado por TOMOTANI (2002). Porém comparando-se com “r” da glicoseoxidase solúvel, GODi-12 não teve o seu valor alterado (GOD-13; pH5,0; $r=2,29 \times 10^{-1}$ mmol.h⁻¹.mg⁻¹_{enzima}) e o sistema imobilizado apresentou maior conversão (~74%) enquanto GOD-13 (forma solúvel) teve 34,3%.

Em relação aos ensaios realizados em pH 5,5, o “r” da enzima solúvel (GOD-11) foi 1,2 vezes maior que o de GODi-13. No entanto, os valores de conversão média foram em torno de 58% para ambas as formas (comparação direta para ensaios empregando a membrana de 100kDa).

Quanto ao estudo frente à temperatura, os parâmetros termodinâmicos estimados estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37. Parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica da glicoseoxidase imobilizada (0,219mg de proteína/100mg de resina) calculados para 318K empregando-se membrana de 100kDa ou de 5µm.

Membrana	E_a (kJ.mol ⁻¹)	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (kJ.mol ⁻¹)
100kDa	4,92	-13,6	2,28	$4,99 \times 10^{-2}$
5µm	23,8	-2,10	21,2	$7,33 \times 10^{-2}$

A partir da Tabela 37, observa-se de um modo geral que ao empregar a membrana de 5µm, o sistema imobilizado apresentou-se mais estável que ao de 100kDa pois ele requer maior E_a para afetar o sistema. Provavelmente, isto decorre do fato de que a transmissão de calor dentro do sistema reacional – sobretudo o fluxo no sentido meio aquoso/partícula de resina com a GOD adsorvida/meio aquoso

– seja favorecida quando a membrana de microfiltração é utilizada. Ou seja, a dissipação do calor acumulado nas partículas de resina seria aumentada, resultando em menor dano térmico sobre a estrutura da enzima.

E, utilizando-se a membrana de microfiltração, o ensaio GODi-16 teve uma conversão em torno de 82% (Figura 27) e o “r” aumentado a 44% em relação ao GODi-13 (X~58%). A porosidade da membrana de microfiltração além de reduzir o custo do processo, por sua vez, pôde ter favorecido o desempenho do imobilizado ao longo do ensaio (menor possibilidade da ocorrência do fenômeno de “fouling” o que é comum nos reatores de membrana) (Le ROUX, *et al.*, 2005).

Ainda nesta fase de estudo bifásico da conversão da sacarose, ação da invertase seguida da de glicoseoxidase, tornou-se oportuno avaliar a separação da frutose do açúcar invertido, antes da mistura ser utilizada como substrato para a ação da GOD. A separação das hexoses foi testada por cromatografia de troca iônica.

6.4. Separação cromatográfica

6.4.1. Estudo de retenção da glicose e frutose na resina

A resina catiônica – Dowex® 50W 8-100 - foi tratada conforme descrito no item 5.7 de Materiais e Métodos. A resina foi preparada diretamente na coluna (Biorad: capacidade do leito 2mL para a resina e 10mL para a amostra).

Os autores que descreveram o preparo da resina tiveram como finalidade a separação dos seguintes componentes, a saber, frutose, manitol e sorbitol. Aproveitando as informações de Bart, *et al.* (1996) e da separação de frutose e glicose através do uso de resina catiônica de poliestireno sulfonada (PETERSEN, 1975; JONES e WALL, 1960), estudou-se a possibilidade de separação quantitativa dos dois açúcares.

Apenas a título de exemplo, a planilha contendo os dados relacionados à separação da mistura de dois açúcares está apresentada na Tabela 38.

Para verificar a retenção dos açúcares iniciou-se com o volume de 1mL de resina equivalente a coluna de 1,5cm de comprimento.

Acertada a vazão do eluente e do efluente para 10mL.h^{-1} , prosseguiu-se primeiramente para o estudo da retenção dos açúcares em separado [glicose (8mg.mL^{-1}) e frutose (8mg.mL^{-1})].

Adicionou-se, então, 2mL de glicose (16mg) ou frutose (16mg) na coluna (altura da coluna igual a 1,5cm) e eluiu-se com água deionizada, obtendo-se, então, as respectivas curvas de eluição [Fig.28 (ensaio B-1)].

Pela Figura 28, observa-se a superposição das duas curvas e também um certo afastamento da distribuição em ambas as oses. Idealmente, as curvas devem se aproximar de uma distribuição gaussiana (normal). Assim, um afastamento excessivo desta distribuição indicaria condições operacionais inadequadas e/ou procedimento inviável (VOGEL, 1981). Neste caso, verifica-se pela mesma figura que houve um afastamento, mas não tão excessivo e, portanto, prosseguiu-se na tentativa de melhorar o procedimento.

Tabela 38. Resultados experimentais referentes à separação da mistura de açúcares (altura do leito: 3,5cm: Ensaio B-4).

Volume do eluente (mL)	Abs 540nm (Det. ART)	Abs 500nm (Det. Glic)	[glicose] (mg.mL ⁻¹)	[ART] (mg.mL ⁻¹)	[frutose]* (mg.mL ⁻¹)
0,5	0,0096	0	0	0,0292	0,0292
1,5	0,227	0,0286	0,0972	0,411	0,314
2,5	0,232	0,0277	0,0942	0,4194	0,325
3,5	0,158	0,0174	0,0592	0,290	0,231
4,5	0,0646	0,0039	0,0133	0,126	0,112
5,5	0,0530	0,0029	0,00986	0,105	0,0955
6,5	0,0355	0,0012	0,00408	0,0747	0,0706
7,5	0,019	0	0	0,0457	0,0457
8,5	0,0126	0	0	0,0345	0,0345
9,5	0,0082	0	0	0,0268	0,0268
10,5	0,0059	0	0	0,0227	0,0227
11,5	0	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0	0

*[Frutose] foi determinada subtraindo-se a concentração de açúcares redutores totais (ART) pela concentração de glicose.

Figura 28. Curvas de eluição de glicose (○) e frutose (□) no leito de 1,5cm de resina: Ensaio B-1.

Após o ensaio adotando 1,5cm de altura da coluna, aumentou-se a altura do leito para 3,5cm. Neste ensaio, adicionou-se o mesmo volume de 2mL de glicose ou frutose na coluna, porém com as concentrações reduzidas para 1mg.mL⁻¹ (a redução da concentração teve como objetivo facilitar a dosagem dos açúcares no eluato). As demais condições do procedimento anterior foram mantidas.

A Figura 29 mostra as respectivas curvas de eluição de glicose e frutose e, na Figura 30, a separação da mistura das oses nas mesmas condições (3,5 cm de altura: ensaios B-2 e B-4).

Figura 29. Curvas de eluição de glicose (□) e frutose (◇) no leito de 3,5 cm de altura: Ensaio B-2.

Figura 30. Separação da mistura de glicose e frutose no leito de 3,5 cm de altura [mistura glicose e frutose (◇), glicose (□) e frutose (△)]: Ensaio B-4.

A Tabela 39 apresenta os respectivos coeficientes de distribuição dos açúcares obtidos nos dois procedimentos (coluna com 1,5 e 3,5 cm de altura). E a partir dos valores de K_d dos açúcares, calculou-se o fator de separação ($\alpha = K_{d1}/K_{d2}$)

para todas as condições estudadas. Os valores de α estão apresentados na Tabela 40.

Tabela 39. Coeficientes de distribuição dos açúcares.

Açúcar	Qtde. de açúcar na resina (mg)	Resina (g)	Qtde. de açúcar na solução (mg)	Volume da solução (mL)	Coeficientes de distribuição (K_d)
Glicose	16	0,813	7,34	7,5	20,1
Frutose	16	0,813	16	7,0	8,61
Glicose	2	1,6	1,38	8,5	7,69
Frutose	2	1,6	2	8,5	5,31
Mistura (glicose e frutose)					
Glicose	1	1,6	0,540	10,5	6,56
Frutose	1	1,6	1	4,5	5,20

Tabela 40. Fator de separação (α) dos açúcares.

Açúcares	Altura do leito (cm)	Fator de separação (α)
Glicose/frutose (16mg)*	1,5	2,33
Glicose/frutose (2mg)*	3,5	1,45
Glicose + frutose (2mg)**	3,5	1,26

* Estudo individual

** Estudo da mistura

Os valores do fator de separação, α , apresentaram-se maiores que 1,2. (Tabela 40) indicando a possibilidade de uma separação satisfatória das oses.

Sabe-se pela literatura, que quanto mais o fator de separação se desviar da unidade, mais facilmente se processará a separação. Na prática normal de laboratório, toma-se como base que α deve ser maior do que 1,2 e menor que 0,8 para obter uma separação quantitativa (VOGEL, 1981).

Ressalta-se que os resultados das separações de troca iônica podem ser influenciados pela variação do pH do solvente ou do eluente, a temperatura, a natureza da resina de troca iônica, o tamanho de partícula, a velocidade de fluxo do eluente e o comprimento da coluna (VOGEL, 1981).

Os diferentes valores de α , portanto, poderiam ser explicados pela dificuldade de acertos operacionais (para os primeiros ensaios), diferença da altura da coluna (1,5 e 3,5 cm) e da variação do tipo de eluente (água deionizada de procedência variada - foi necessária a troca de deionizador entre os ensaios).

Pelos resultados obtidos, nota-se a viabilidade desta metodologia para a separação de glicose e frutose. No entanto, para efeito de comparação, estudos utilizando-se uma outra resina catiônica (granulometria ou ligações cruzadas diferentes) seriam interessantes para verificar melhor separação entre glicose e frutose.

O perfil da separação de glicose e da frutose utilizando a solução tamponada de acetato de sódio utilizando resina catiônica do tipo Dowex® 50W:4-100 (Ensaio A-1 e A-2) e 8-100 (Ensaio B-3 e B-5) podem ser observados nas Figuras 31 à 34. Na Tabela 41 estão apresentados os respectivos valores dos coeficientes de distribuição (K_d) e dos fatores de separação (α) obtidos em cada uma das situações.

Tabela 41. Valores de K_d e do α obtidos para os açúcares tanto individualmente quanto na separação da mistura das oses em ambos os tipos de resina catiônica.

50W: 4-100	Estudo individual		Mistura (glicose+frutose)	
	glicose	frutose	glicose	frutose
K_d	1,21	0,49	0,46	1,42
α	*2,46/ **0,41		*0,32/**3,1	
50 W: 8-100	Estudo individual		Mistura (glicose+frutose)	
	glicose	frutose	glicose	frutose
K_d	0,84	2,53	0,45	0,075
α	*0,33/**3,0		*6,0/**0,17	

$$\alpha = *K_{dG}/K_{dF} \text{ ou } **K_{dF}/K_{dG}$$

Conforme mostra a Tabela 41, a separação das oses foi melhorada ao utilizar o eluente tamponado. Estima-se que a separação obtida pode ser considerada quantitativa porque os valores de α obtidos foram superiores ou inferiores ao valor de referência ($\alpha > 1,2$ ou $\alpha < 0,8$).

Escolheu-se a coluna com a resina 50W:8-100 como o melhor sistema de separação das oses. O seu desempenho é mostrado nas Figuras 31 e 33.

Como melhoria do processo estudou-se o reciclo (Ensaio B-6) para o melhor sistema. As Figuras 35 a 37 mostram o perfil dos açúcares ao longo de 3 reciclos e na Tabela 42 estão apresentados a concentração estimada da frutose obtida após a separação cromatográfica.

Figura 31. Separação individual de glicose (◇) e frutose (□) utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:8-100: Ensaio B-3.

Figura 32. Separação individual de glicose (◇) e frutose (□) utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:4-100: Ensaio A-1.

Figura 33. Separação da mistura de glicose e frutose utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:8-100 [ART ($\square$), glicose ($\circ$) e frutose ($\triangle$): Ensaio B-5.

Figura 34. Separação da mistura de de glicose e frutose utilizando a solução tamponada de acetato de cálcio (pH 5,5) como eluente – resina 50W:4-100 [ART ($\square$), glicose ($\circ$) e frutose ($\triangle$): Ensaio A-2.

Figura 35. Reciclo (1) - Separação da mistura de açúcares utilizando solução tamponada de acetato de cálcio como eluente – resina 50W:8-100 [ART ($\square$), glicose ($\circ$) e frutose ($\triangle$): Ensaio B-6.

Figura 36. Reciclo (2) - Separação da mistura de açúcares utilizando solução tamponada de acetato de cálcio como eluente – resina 50W:8-100 [ART ($\square$), glicose ($\circ$) e frutose ($\triangle$): Ensaio B-6.

Figura 37. Reciclo (3) - Separação da mistura de açúcares utilizando solução tamponada de acetato de cálcio como eluente – resina 50W:8-100 [ART ($\square$), glicose ($\circ$) e frutose ($\triangle$): Ensaio B-6

Figura 38. Perfil da separação da glicose da frutose ao longo dos 3 ciclos [G_0 -1ª. Separação ($\diamond$), G_{r1} -1º.reciclo ($\square$), G_{r2} -2º.reciclo ($\triangle$), G_{r3} -3º.reciclo($\times$): Ensaio B-6.

Figura 39. Perfil da separação da frutose da glicose ao longo dos 3 ciclos [F_0 -1ª. Separação (◇), F_{11} -1º. reciclo (□), F_{12} -2º. reciclo (△), F_{13} -3º. reciclo (×)]: Ensaio B-6.

Tabela 42. Concentração de frutose estimada após a coleta da terceira amostra da separação cromatográfica e dos ciclos efetuados.

Separação da mistura (glicose+frutose)	Concentração de frutose (%)
Separação	78%
1º reciclo	74%
2º reciclo	64%
3º reciclo	70%

Utilizando-se a solução tamponada como eluente foi possível obter um produto comercial de 71,5 % em média de frutose. Como um processo de separação das duas oses, a coluna contendo a resina 50W: 8-100 apresentou-se viável.

Embora, a coluna cromatográfica ainda apresente uma necessidade de se adequar a altura do leito que permita a separação da concentração superior àquela mencionada nos estudos previamente apresentados, ou mesmo de reciclo, para o estudo de reator operando em série, o resultado mostrou-se promissor.

6.5. Ensaios no biorreator com membrana empregando invertase e glicoseoxidase simultaneamente na forma solúvel ou imobilizada

Na imobilização de ambas as enzimas (glicoseoxidase e invertase), foram mantidas as quantidades de resina (100mg), da proteína (0,219mg e 1,64mg de glicoseoxidase e invertase, respectivamente), bem como o volume da suspensão e das condições previamente estabelecidas por TOMOTANI (2002). O procedimento da imobilização e dos ensaios no biorreator estão descritos nos itens 5.3.2.3, 5.5.3 e 5.6.

Baseando-se nos resultados prévios obtidos na imobilização da glicoseoxidase bem como da invertase escolheu-se a resina Dowex®4:200 como suporte. O presente estudo tem como objetivo avaliar a possibilidade da bioconversão da sacarose em um sistema monofásico.

As Figuras 40 e 41 mostram o desempenho de ambas as enzimas na forma solúvel e imobilizada, respectivamente, quando se variou a vazão de alimentação (0,5, 0,8, 1,6 e 3,0 h⁻¹). Para esta finalidade, introduziu-se as mesmas quantidades de enzimas solúveis (1,64 mg de invertase e 0,219 mg de glicoseoxidase) no reator da “Bioengineering” para determinar a melhor vazão de alimentação mantendo as condições seguintes: pH 5,5, 30°C, [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

Como estudo posterior, foi então avaliada a possibilidade da bioconversão da sacarose utilizando o mesmo sistema imobilizado numa célula de filtração da Millipore®.

As Tabelas 43 e 44 mostram o desempenho de ambas as enzimas imobilizadas em Dowex® 1x4:200 quando introduzidas respectivamente no reator da “Bioengineering” e na célula de filtração da Millipore®. Os respectivos perfis de conversão ou da velocidade de reação estão apresentados nas Figuras 40 a 42.

Pela Tabela 43, observa-se que o “D” onde houve a maior conversão para ambas as formas das enzimas foram diferentes.

Tabela 43. Valores médios da velocidade de reação e da conversão obtidos empregando ambas as enzimas imobilizadas (IA médio de 42,4%) no reator da “Bioengineering”.

Ensaio	D (h ⁻¹)	X, %
Gli-1 (5μ)	0,5	67,4
Gli-2 (5μ)	0,8	38,2
Gli-3 (5μ)	1,6	16,2
Gls-1 (100kDa)	0,5	50,5
Gls-2 (100kDa)	0,8	96,6
Gls-3 (100kDa)	1,6	67,4
Gls-4 (100kDa)	3,0	46,1

Sabe-se que a atividade específica da invertase é em torno de 3,5 vezes menor que a da glicoseoxidase (37,4U/mg de proteína e 134U/mg de proteína) (TOMOTANI, 2002; SANTUCCI, *et al.*, 2000) e, portanto, o melhor “D” para o sistema monofásico seria aquele que forneça a quantidade necessária de produto/substrato para a conversão seguinte. Da Tabela 43, observa-se uma tendência da melhora no desempenho da bioconversão sacarose/(frutose e ácido glicônico) para velocidades específicas não superiores a 0,8h⁻¹.

Em relação às enzimas imobilizadas (Gli-1 a 3), o menor “D” mostrou-se mais eficiente. Quando a enzima é imobilizada em partículas porosas, como é o caso das pérolas aniônicas de Dowex®, de uma forma análoga, conforme menciona TSUKAMOTO, MORITA e OKADA (1982 e 1983) que estudaram o performance da glicose oxidase imobilizada em carvão ativo granulado, um dos fatores que influencia a taxa global da reação enzimática é a limitação por transferência de massa do substrato para a enzima. Neste aspecto, o sistema imobilizado apresentou-se mais afetado, porém ainda com a vantagem de permitir o uso da membrana de microfiltração e conversão da ordem de 67,4%.

Figura 40. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios Glis-1 a Glis-4. Variou-se a vazão de alimentação: 5 mL.h^{-1} (x), 8 mL.h^{-1} (◇), 16 mL.h^{-1} (□) e 30 mL.h^{-1} (△). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 30°C , 0,219mg de proteína (GOD) e 1,64mg de proteína (invertase), [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa (reator da Bioengineering).

Figura 41. Perfil do grau de conversão $[X]$ em função do tempo para os ensaios Gli-1 a Gli-4. Variou-se a vazão de alimentação: 5 mL.h^{-1} (x), 8 mL.h^{-1} (◇), 16 mL.h^{-1} (□) e 30 mL.h^{-1} (△). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 30°C , sistema imobilizado constituído por Dowex[®] 1x4:200/ GOD e invertase, [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de $5\mu\text{m}$ (reator da Bioengineering).

Em seguida, avaliou-se o desempenho de ambos os sistemas utilizando-se a célula de ultrafiltração da Millipore®. As vazões de alimentação empregadas, utilizado-se uma bomba peristáltica, foram adaptadas de uma maneira que fossem as mais próximas possíveis dos ensaios realizados no reator da “Bioengineering®”. Desta maneira, verificou-se a possibilidade de adaptar a célula de filtração normalmente utilizada em batelada, como um biorreator com membrana operando em sistema contínuo.

Tabela 44. Valores médios da velocidade de reação e da conversão obtidos empregando ambas as enzimas imobilizadas na célula de filtração da Millipore®.

Ensaio	Volume reacional (mL)	D (h ⁻¹)	X, %
*Gli-5 (100kDa)	150	1,2	98,6
*Gli-4 (5μ)	150	0,6	97,6
*Gli-5 (100kDa)	150	0,6	62,6
*Gli-6 (5μ)	300	1,2	93,6
**Gli-7 (5μ)	300	1,2	95,4

* substrato: sacarose

** substrato: açúcar mascavo

A partir da Tabela 44, observa-se que com o aumento do volume reacional, o problema relacionado com a inibição pelo produto pode ter sido amenizado elevando os valores da conversão quando comparado com os ensaios anteriores. Neste contexto, nos ensaios Gli-4 e Gli-5, a melhora na difusibilidade de peróxido de hidrogênio e/ou o menor acúmulo no meio, parece ter favorecido o desempenho catalítico da glicoseoxidase. Sabe-se pela literatura que a oxidação da glicose pela glicoseoxidase é realizada em conjunto com um agente removedor de peróxido de hidrogênio (catalase ou peroxidase ou MnO₂) com o intuito de contornar o efeito inibitório pelo produto (VOJINOVIC, *et al.*, 2005; BAO, *et al.*, 2004; KANG, BAE, 2003).

Figura 42. Perfil do grau de conversão [X] em função do tempo para os ensaios Gls-5 e Gli-4 a Gli-6.

Variou-se a vazão específica (D), o tipo de membrana e o volume interno do reator: Gls-5/100kDa/0,6h⁻¹/150mL (Δ), Gli-5/100kDa/0,6h⁻¹/150mL (◇), Gli-6/5μm/1,2h⁻¹/150mL (□), Gli-7/5μm/1,2h⁻¹/300mL (+) e Gli-8/5μm/1,2h⁻¹/açúcar mascavo (x). Foram mantidos constantes: pH 5,5, 23-26°C, quantidade das enzimas solúveis e do sistema imobilizado constituído por Dowex[®] 1x4:200/ GOD e invertase, [sacarose]=2,5mM ou [açúcar mascavo] = 2,5mM de sacarose, agitação de 100-150 rpm (célula de filtração da Millipore).

Nas condições adotadas, ao manter a quantidade da relação enzimas/resina, na célula de filtração da Millipore[®], a conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico foi mais eficiente, lembrando ainda que o sistema imobilizado nestes ensaios teve um índice de adsorção média da ordem de 45%. Embora com menor quantidade de enzimas presentes, a conversão acima de 90% para ambos os casos a saber, empregando a sacarose ou o açúcar mascavo, mostrou a viabilidade do uso da célula de Millipore[®] para esta finalidade.

7. Conclusões

7.1. Comentário geral

Em linhas gerais, concluiu-se deste trabalho que a conversão enzimática da sacarose pela ação sucessiva da invertase e da glicose oxidase (GOD), utilizando-se o reator com membrana da “Bioengineering” (RMB) ou uma célula de filtração da Millipore® acoplado à membrana de 100kDa (categoria: ultrafiltração) ou de 5µm (categoria: microfiltração), operado de modo contínuo permitiu obter produtos de maior valor agregado, a saber, frutose e ácido glicônico.

O emprego das enzimas quer em separado quer em conjunto – tanto na forma solúvel quanto imobilizada na resina Dowex®1x4:200 – mostrou-se promissor nas condições operacionais estabelecidas. Salienta-se, também, que o não desprendimento da invertase ou glicoseoxidase /invertase e glicoseoxidase dos suportes permitiu o uso da membrana de microfiltração, trazendo vantagens à operação de RM.

Em relação a separação dos produtos obtidos, verificou-se a possibilidade da separação de glicose e frutose por cromatografia de troca iônica.

Finalmente, os pontos conclusivos notáveis e específicos foram anotados como segue.

7.2. Invertase

7.2.1. Ensaio no biorreator da “Bioengineering”

- ☞ O biorreator manteve boas condições de vazão do permeado, não apresentando sinais de entupimento durante a operação;
- ☞ A invertase na forma solúvel (1,64mg e 3,28mg de enzima) manteve-se estável durante toda a operação nas condições empregadas ([sacarose]=100mM, tampão acetato 10mM, pH 5,5, 30°C, D=0,8h⁻¹);
- ☞ O aumento na quantidade da resina nos sistemas imobilizados melhorou a velocidade de reação tanto como a estabilidade operacional independente do método de preparo do sistema imobilizado invertase/Dowex®;
- ☞ A redução da concentração do substrato levou ao aumento da velocidade enzimática tanto como a melhoria da estabilidade operacional;

- A melhor vazão específica, concentração de sacarose, pH e temperatura para a invertase imobilizada (1,64mg de invertase/ Dowex®1x4:200) foram respectivamente $1,6h^{-1}$, 2,5mM, pH5,5 e $30^{\circ}C$.
- Os parâmetros termodinâmicos calculados para a inativação da invertase imobilizada no reator utilizando-se membrana de 100kDa foram: $E_a' = 12,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta H' = 9,82 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Por outro lado, quando utilizou-se membrana de 5 μ m, os valores calculados foram: $E_a' = 38,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta H' = 35,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
- A performance da invertase imobilizada no biorreator foi melhor quando a membrana de 5 μ m foi empregada.

7.3. Glicose oxidase

7.3.1. Caracterização da glicose oxidase - Ensaio realizado num reator do tipo batelada

- O pH ótimo foi 5,5 encontrando-se dentro da faixa de estabilidade 4,0- 6,0.
- A temperatura ótima foi $50^{\circ}C$ e a faixa de estabilidade enzimática observada foi entre 25 a $40^{\circ}C$.
- Os parâmetros termodinâmicos relacionados com a reação catalisada pela GOD são: $E_a = 19,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta H = 16,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$
- A energia de ativação para a inativação térmica da GOD e o valor de ΔH calculados para 318K ($45^{\circ}C$) são: $E_a' = 206,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta H = 204 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
- As constantes cinéticas, a saber, K_M e V_{Max} foram respectivamente, 29mM e $75,2 \times 10^{-3} \text{ U.mL}^{-1}$.
- Detectou-se a inibição não competitiva da enzima pelo peróxido de hidrogênio, sendo $(K_M)_i$ e $(V_{Max})_i$, na presença do inibidor, serem respectivamente iguais a 34,3mM e $43,1 \times 10^{-3} \text{ U.mL}^{-1}$. O valor estimado da constante de inibição (K_i) foi igual a 1,12mM.

7.3.2. Ensaio no biorreator da "Bioengineering"

7.3.2.1. Glicoseoxidase na forma solúvel

- Adotando-se 1 mg.mL^{-1} (0,219mg de proteína) de GOD, $T = 30^{\circ}C$ e pH 5,5, a melhor condição obtida foi quando empregou-se $D = 6h^{-1}$, onde observou-se a maior atividade enzimática e estabilidade operacional.

- O melhor pH e temperatura para a glicose oxidase no reator foram respectivamente 5,0 e 30°C.
- A energia de ativação para a inativação térmica ($E'a$) da GOD foi igual a 14,7kJ.mol⁻¹ e o ΔH calculado para 45°C foi 12,1kJ.mol⁻¹.

7.3.3. Imobilização da glicoseoxidase em resina aniônica do tipo Dowex®

- Os imobilizados que apresentaram maior índice de adsorção foram aqueles constituídos por resinas com 2% de ligações cruzadas e aquele com 4% porém com a granulometria de 400 “mesh”.
- De um modo geral, o índice de adsorção médio foi da ordem de 84,6% utilizando as resinas aniônica do tipo Dowex® como suporte.

7.3.3.1. Desempenho da glicoseoxidase imobilizada no reator da “Bioengineering”

- Nas condições adotadas (agitação entre 100 e 150rpm, 2,5mM de glicose, pH 5,5, 30°C, $D=6h^{-1}$ e membrana de 100kDa), os sistemas imobilizados que apresentaram maior velocidade de reação foram aqueles constituídos por resina 4:200 (0,178 mmol/h.mg_{enzima}) e 8:50 (0,179 mmol/h.mg_{enzima}).
- O sistema glicoseoxidase/ Dowex® 4:200 apresentou maior conversão em pH5,0 e em temperatura de 30°C (agitação entre 100 e 150rpm, 2,5mM de glicose, $D=6h^{-1}$ e membrana de 100kDa).
- Os parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica da glicoseoxidase imobilizada (0,219mg de proteína/100mg de resina) calculados para 318K empregando-se diferentes membranas foram: $E'a=4,92kJ.mol^{-1}$ e $\Delta H=2,28kJ.mol^{-1}$ para 100kDa ou $E'a=23,8 kJ.mol^{-1}$ e $\Delta H=21,2 kJ.mol^{-1}$ para 5µm.

7.4. Separação cromatográfica

- A resina catiônica Dowex® 50W: 8-100, tratada conforme o procedimento adotado permitiu a separação satisfatória de glicose e frutose;
- A separação de glicose e frutose foi melhorada ao empregar a solução tamponada de acetato de cálcio como eluente e três ciclos do eluato, permitindo a obtenção de xarope de frutose da ordem de 70% utilizando-se a resina catiônica 50W:8-100.

7.5. Sistema constituído por ambas as enzimas solúveis e imobilizadas

7.5.1. Desempenho da invertase e glicoseoxidase solúveis no reator da “Bioengineering”

- ☞ A conversão de 96,6% foi observado quando empregou-se o D de $0,8\text{h}^{-1}$ nas condições operacionais de pH 5,5, 30°C , [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de 100kDa.

7.5.2. Desempenho da invertase e glicoseoxidase imobilizadas no reator da “Bioengineering”

- ☞ A conversão de 67,4% foi observado quando empregou-se o D de $0,5\text{h}^{-1}$ nas condições operacionais de pH 5,5, 30°C , [sacarose]=2,5mM, agitação entre 100-150 rpm e membrana de $5\mu\text{m}$.

7.5.3. Desempenho da invertase e glicoseoxidase imobilizadas na célula de filtração da Millipore®

- ☞ Com o aumento do volume reacional, o sistema imobilizado constituído por ambas as enzimas, mostrou ser mais eficiente ($X=93,6\%$ nas condições de pH 5,5, $23-26^{\circ}\text{C}$, [sacarose]=2,5mM, volume reacional de 300mL, $D=1,2\text{h}^{-1}$ e membrana de $5\mu\text{m}$).
- ☞ A conversão do substrato comercial (açúcar mascavo) em ácido glicônico e frutose foi acima de 95%, mostrando a eficiência do processo de bioconversão.

8. Referências bibliográficas

- ABRAHÃO-NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W., eds. **Biotecnologia Industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, cap.19, p.405-412.
- ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; VITOLO, M. Biocatalyst operational stability: a review of investigation methods in ultrafiltration membrane reactors. **Farm. Quím.**, São Paulo, v.32, n.4, p.17-23, 1999.
- ALMEIDA CUNHA, B.C.; VITOLO, M. Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalized by invertase obtained from *S. cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, Hoboken, v.26, p.811-813, 1984.
- ARNAL, J.M.; SANCHO, M.; VERDÚ, G.; LORA, J.; MARÍN, J.F.; CHÁFER, J. Selection of the most suitable ultrafiltration membrane for water disinfection in developing countries. **Desalination**, Amsterdam, v.168, p.265-270, 2004.
- ARRUDA, L.M.O., VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl. Biochem. Biotechnol.** Totowa, v.81, n.1, p.23-33, 1999.
- AZEVEDO, D.C.S.; RODRIGUES, A.E. Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for the inversion of sucrose and glucose-fructose separation. **Chem. Eng. J.**, Amsterdam, v.82, p.95-107, 2001.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucoseoxidase for production of calcium gluconate. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v.8, p.91-102, 2001.
- BAO, J.; KOUMATSU, K.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Optimal operation of an integrated bioreaction – crystallization process for continuous production of calcium gluconate using external loop airlift columns. **Chem. Eng. Sci.**, Amsterdam, v.56, n.21/22, p.6165-6170, 2001.

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts service Source Index (CASSI), 2002.

- BAO, J.; KOUIMATSU, K.; ARIMATSU, Y.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on crystallization of calcium gluconate in external loop airlift column and stirred tank for an immobilized glucose oxidase reaction with crystallization. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v.15, n.3, p.177-184, 2003.
- BARMAN, E.T. **Enzyme handbook**. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1969. v.1, p.112-113.
- BARLIKOVA, A.; MIERTUS, S. Hybrid biosensor for the determination of sucrose. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.247, p.83-87, 1991.
- BART, H.J.; MESSENBLOCK, R.C.; BYERS, C.H.; PRIOR, A.; WOLFGANG, J. Continuous chromatographic separation of fructose, manitol and sorbitol. **Chem. Eng. Process.**, Amsterdam, v.35, p.459-471, 1996.
- BAYRAMOGLU, G.; AKGOL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; YAKUP, M. Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v.14, p.117-126, 2003.
- BELHOCINE, D.; MOKRANE, H.; GRIB, H.; LOUNICI, H.; PAUSS, A.; MAMERI, N. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. **Chem. Eng. J.**, Amsterdam, v.76, p.189-196, 2000.
- BERGMAYER, H.U., ed. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim, Berlin: Verlag Chemie, 1984. v.2, 539p.
- BIELLA, S.; PRATI, L.; ROSSI, M. Selective oxidation of D-glucose on gold catalyst. **J. Catal.**, New York, v.206, p.242-247, 2002.
- BOMMARIUS, A. Biotransformations and enzyme reactors. In: REHM, H.J.; REED, G.; PUHLER, A.; STADLER, P., eds. **Biotechnology**: a multi-volume comprehensive treatise. 2.ed. Weinheim, New York: VCH, 1993. p.427-466. [Bioprocessing, v.3].
- BOSHOF, A.; BURTON, M.H.; BURTON, S.G. Optimization of catechol production by membrane-immobilized polyphenol oxidase: a modeling approach. **Biotechnol. Bioeng.**, Hoboken, v.83, n.1, p.1-7, 2003.

- BREDA, M.; VITOLO, M.; DURANTI, M.A.; PITOMBO, R.N.M. Effect of freezing-thawing on invertase activity. **Cryobiology**, New York, v.29, p.281-290, 1992.
- BRAHIM, S.; NARINESING, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Kinetics of glucoseoxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, Amsterdam, v.18, n.1/3, p.69-80, 2002.
- BYHLIN, H.; JONSSON, A.S. Influence of adsorption and concentration polarization on membrane performance during ultrafiltration of a non-ionic surfactant. **Desalination**, Amsterdam, v.151, p.21-31, 2002.
- CALABRÓ, V.; CURCIO, S.; IORIO, G. A theoretical analysis of transport phenomena in a hollow fiber membrane bioreactor with immobilized biocatalyst. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.206, p.217-241, 2002.
- CASTELLAN, G.W. **Fundamentos de físico-química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1986. 527p.
- COLE-HAMILTON, D.J. Homogeneous catalysis: new approaches to catalyst separation, recovery and recycling. **Science**, Washington, v.299, p.1702-1706, 2003.
- COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. High fructose corn syrup. In: CHEREMISINOFF, P.N.; OUELLETTE, R.P., eds. **Biotechnology: applications and research**. Lancaster: Technomic Publishing, 1985a. 699p.
- COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. Starch conversion processes. In: MOO-YOUNG, M., ed. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford, New York: Pergamon Press, 1985b. 1136p. [The practice of biotechnology, v.3].
- CRUEGER, A.; CRUEGER, W. Carbohydrates. In: REED, G.; REHM, H.J.; KIESLICH, K.; BRAUER, H.; PAPE, H.; KENNEDY, J.F.; JACOBSON, G.K., ed. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes**. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. [Biotransformations, v.6].
- CRUEGER, A.; CRUEGER, W. Glucose transforming enzymes. In: FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2.ed. London, New York: Elsevier Applied Science, 1990. p.178-226. (Elsevier applied biotechnology series).

- CURCIO, S.; CALABRÓ, V.; IORIO, G. An experimental analysis of membrane bioreactor performances with immobilized chymosin. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.173, p.247-261, 2000.
- CURCIO, S.; CALABRÓ, V.; IORIO, G. Monitoring and control of TMP and feed flow rate pulsatile operations during ultrafiltration in a membrane module. **Desalination**, Amsterdam, v.146, p.217-222, 2002.
- DANISMAN, T.; TAN, S.; KACAR, Y.; ERGENE, A. Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membrane. **Food Chem.**, Amsterdam, v.85, p.461-466, 2004.
- De QUEIROZ, A.A.A.; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R.C.; HIGA, Z.O. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. **Radiat. Phys. Chem.**, Amsterdam, v.47, n.6, p.873-880, 1996.
- De QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; RIBEIRO, R.R.; VITOLO, M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. **J. Appl. Polym. Sci.**, Hoboken, v.84, p.767-777, 2002.
- ERZINGER, G.S.; SILVEIRA, M.M.; VITOLO, M.; JONAS, R. Determination of glucose-fructose oxidoreductase activity in whole cells of *Z. mobilis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Dordrecht, v.12, n.1, p.22-24, 1996.
- ERZINGER, G.S. **Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glicônico por *Z. mobilis* ATCC 29191**: estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidoreductase. São Paulo, 2000. 141p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- ESMON, P.C.; ESMON, B.E.; SCHAUER, I.E.; TAYLOR, A., SCHEKMAN, R. Structure, assembly and secretion of octameric invertase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.262, n.9, p.4387-4394, 1987.
- FANE, A.; CHANG, S. Membrane bioreactors: design & operational options. **Filtr. Sep.**, Croydon, v.39, n.5, p.26-29, 2002.
- FANG, M.; GRANT, P.S.; McSHANE, M.J.; SUKHORUKOV, G.B.; GOLUB, V.O.; LVOV, Y.M. Magnetic bio/nanoreactor with multilayer shells of glucose oxidase and inorganic nanoparticles. **Langmuir**, Columbus, v.18, n.16, p.6338-6344, 2002.
- FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2.ed. London, New York: Elsevier Applied Science, 1990. 472p. (Elsevier Applied Botechnology Series).

- GIORNO, L.; DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends Biotechnol.**, Haywards Heath, v.18, n.8, p.339-349, 2000. [Review].
- GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2.ed. London: Macmillan, 1996. 609p.
- GORDON, L.; VARGA, M.G.; DOMINGUEZ, E.; EMNÉUS, J. Analysis of mono-, oligo- and polysaccharides by enzyme reaction detection. In: LAM, S.; MALIKIN, G., eds. **Analytical applications of immobilized enzyme reactors**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. p.51-130.
- GOVENDER, S.; JACOBS, E.P.; LEUKES, W.D.; PILLAY, V.L. A scalable membrane gradostat reactor for enzyme production using *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.25, n.2, p.127-131, 2003.
- ILLANES, A. **Biotecnologia de enzimas**. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
- JONES, J.K.N.; WALL, R.A. The separation of sugars on ion-exchange resins. Part II. Separation of monosaccharides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v.38, p.2290-2294, 1960.
- JUNGBUNZLAUER. Disponível em: www.jungbunzlauer.com/products. Acesso em: 10 nov. 2002.
- KANG, S.I.; BAE, Y.H. A sulfonamide based glucose-responsive hydrogel with covalently immobilized glucose oxidase and catalase. **Journal of Controlled Release**. v.86, p.115-121, 2003.
- KANG, I.J.; LEE, C.H.; KIM, K.J. Characteristics of microfiltration membranes in a membrane coupled sequencing batch reactor system. **Water Res.**, Amsterdam, v.37, p.1192-1197, 2003.
- LATHOUDER, K.M.; MARQUES, FLÓ, T.; KATEIJN, F.; MOULIJN, J.A. A novel structured bioreactor: Development of a monolithic stirrer reactor with immobilized lipase. **Catalysis Today**, v.105, n.3-4, p.443-447, 2005.
- LESJEAN, B.; ROSENBERGER, S.; SCHROTTER, J.-C.; RECHERCHE, A. Membrane-aided biological wastewater treatment: an overview of applied systems. **Membr. Technol.**, Oxford, v.2004, n.8, p.5-10, 2004.
- LE ROUX, I.; KRIEG, H.M.; YEATES, C.A.; BREYTENBACH, J.C. Use of chitosan as an antifouling agent in a membrane reactor. **J. of Membrane Science**, v.248, p.127-136, 2005.

- LIU, X.; NEOH, K.G.; CEN, T.; KANG, E.T. Enzymatic activity of glucose oxidase covalently wired via viologen to electrically conductive polypyrrole films. **Biosens. Bioelectron.**, Amsterdam, v.19, p.823-834, 2004.
- LOZANO, P.; VÍLLORA, G.; GÓMEZ, D.; GAYO, A.B.; SÁNCHEZ-CONESA, J.A.; RUBIO, M.; IBORRA, J.L. Membrane reactor with immobilized *Candida antartctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **J. Supercrit. Fluids**, Amsterdam, v.29, p.121-128, 2004.
- MORCILLO, P.; SALINAS, E.; SANZ, M.I.; RABA, J. Continuous-flow/stopped-flow system incorporating a rotating bioreactor based on a double redox catalytic cycle and electron transfer mediated by osmium complexes: application in the determination of extremely low levels of glucose. **Instrum. Sci. Technol.**, Philadelphia, v.30, n.3, p.281-293, 2002.
- MORRIS, J.C. **A biologist's physical chemistry**. London: Edward Arnold, 1972. 367p. (Contemporary Biology).
- NAKLA, G.; LUGOWSKI, A. ; PATEL, J.; RIVEST, V. Combined biological and membrane treatment of food-processing wastewater to achieve dry-ditch criteria: Pilot and full-scale performance. **Bioresource Technology** v.97, p.1-14, 2006.
- OWUSU, R.K.; MAKHZOUM, J. Heat inactivation of lyase from psychrotrophic *P. fluorescens*. P38: activation parameters and enzyme stability at low or ultra-high temperatures. **Food Chem.**, Oxford, v.44, p.261-268, 1992.
- OHLWEILER, O.A. **Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica**. Brasília: Universidade de Brasília, 1968. v.1, p.61.
- PAL, P.; DATTA, S.; BHATTACHARYA, P. Multi-enzyme immobilization in eco-friendly emulsion liquid membrane reactor: a new approach to membrane formulation. **Sep. Purif. Technol.**, Amsterdam, v.27, p.145-154, 2002.
- PAZUR, J.H. Glucose oxidase from *A. niger*. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.9, p.82-87, 1966.
- PEPPLER, H.J.; REED, G. Enzymes in food and feed processing. In: REED, G.; REHM, H.J.; KIESLICH, K.; BRUER, H.; PAPE, H.; KENNEDY, J.F.; JACOBSON, G.K., eds. **Biotechnology**: a comprehensive treatise in 8 volumes. Weinheim: Verlag Chemie, 1987. v.7. [Enzyme technology, v.7].
- PERALTA. M.R.; MARQUES DE SOUZA, C.; BÔER, C.G. As principais oxidorreduções de uso industrial. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R., eds.

- Enzimas como agentes tecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412p.
- PESSOA Jr., A.; KILILIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., eds. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.** São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p.493-522.
- PETERSEN, N.B. **Edible starches and starch-derived syrups.** Park Ridge, London: Noyes Data Corporation, 1975. p.408-409. (Food Technology Review, n.24).
- PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme Microb. Technol.**, Amsterdam, v.16, p.738-749, 1994.
- RABA, J.; MOTTOLA, H.A. Glucose oxidase as an analytical reagent. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, Philadelphia, v.25, n.1, p.1-42, 1995.
- READY, V.A.; MALEY, F. Identification of na active-site residue in yeast invertase by affinity, labeling and site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.265, n.19, p.10817-10820, 1990.
- ROCHA FILHO, J.A.; VITOLO, M. **Enzimas no contexto da síntese orgânica.** São Paulo: Autores, 1998. p.43.
- SANTOS, C.A. **Radicais livres: aspectos químicos, biológicos, patológicos e preventivos.** Santo André: UNIABC, 2001. [Monografia de Conclusão de Curso].
- SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends in Food & Technology**, v.16, p.442-457, 2005.
- SANTUCCI, M., PORTACCIO, M., ELDIN, M.S.M., PAGLIUCA, N., ROSSI, S., BENCIVENGA, U., GAETA, F.S., MITA, D.G. Glucose determination by means of a new reactor/sensor system operating under non-isothermal conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.593-601, 2000.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., eds. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.** São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p.179.

- SCHOEMAKER, H.E.; MINK, D.; WUBBOLTS, M.G. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. **Science**, Washington, v.299, p.1694-1697, 2003.
- SEGEL, I.H. **Bioquímica**: teoria e problemas. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979. 527p.
- SENGUPTA, S.; MODAK, J.M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme processes. **Chem. Eng. Sci.**, Amsterdam, v.56, p.3315-3325, 2001.
- SHEU, D.C.; DUAN, K.J.; CHENG, C.Y.; BI, J.L.; CHEN, J.Y. Continuous production of high-content fructooligosaccharides by a complex cell system. **Biotechnol. Prog.**, Columbus, v.18, n.6, p.1282-1286, 2002.
- SHIN, H.S.; KANG, S.T. Characteristics and fates of soluble microbial products in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. **Water Res.**, Amsterdam, v.37, n.1, p.121-127, 2003.
- SLOMINSKA, L.; SZOSTEK, A.; GRZESKOWIAK, A. Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v.50, p.423-428, 2002.
- SMITH, J.E. **Biotechnology**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 236p.
- SOMOGYI, M. Notes in sugar determination. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.195, n.1, p.19-23, 1952.
- TOMOTANI, E.J. **Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo Dowex)**: seu uso na modificação da sacarose. São Paulo, 2002. 161p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TOMOTANI, E.J., VITOLO, M. Screening of Dowex® anion exchange resins for invertase immobilization. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.113-116, p.145-159, 2004.
- TOMOTANI, E.J., DAS NEVES, L. C., VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucoseoxidase in membrane bioreactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121-124, p. 149-162, 2005.
- TRAU, D.; RENNEBERG, R. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. **Biosens. Bioelectron.**, Amsterdam, v.1, p.1-9, 2003.

- TREVISAN, H.C. **Desenvolvimento de um método de produção de silica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas.** Campinas, 1993. 205p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.
- TSUKAMOTO, T., MORITA, S., OKADA, J. Oxidation of glucose on immobilized glucose oxidase: trickle bed reactor performance. **Chem. Pharm. Bull.**, v.31 (11), p.3785-3795, 1982.
- VASILEVA, N.; GODJEVARGOVA, T. Study on the behaviour of glucose oxidase immobilized on microfiltration polyamide membrane. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.239, n.2, p.157-161, 2004.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972. p.29.
- VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*).** São Paulo, 1979, 136p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- VITOLO, M. Reatores com enzimas imobilizadas. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A .M AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** V.2, São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda., cap.17, p.373-396, 2001.
- VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugar cane molasses. I. Steady-state continuous culture tests. **Biotechnol. Bioeng.**, Hoboken, v.27, n.8, p.1229-1235, 1985.
- VITOLO, M. Invertase. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R., eds. **Enzimas como agentes tecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412p.
- VOGEL, A.; BASSET, J., eds. **Vogel análise inorgânica quantitativa.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. p.131-133.
- VOGELBUSCH. 2000. Disponível em: www.vogelbusch.com/technology.htm. Acesso em: 10 nov. 2002.
- VOJINOVIC, V., CALADO, C.R., SILVA, A .I., MATEUS, M., CABRAL, J.M.S., FONSECA, L.P. Micro-analytical GO/HRP bioreactor for glucose determination and bioprocess monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, p.1955-1961, 2005.

- YOSHIMOTO, M.; WANG, S.; FUKUNAGA, K.; WALDE, P.; KUBOI, R.; NAKAO, K. Preparation and characterization of reactive and stable glucose oxidase-containing liposomes modulated with detergent. **Biotechnol. Bioeng.**, Hoboken, v.81, n.6, p.695-704, 2003.
- WANG, S.; ARIMATSU, Y.; KOUMATSU, K.; FURUMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Gas holdup, liquid circulating velocity and mass transfer properties in a mini-scale external loop airlift bubble column. **Chem. Eng. Sci.**, Amsterdam, v.58, p.3353-3360, 2003.
- WANG, S.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Optimal covalent immobilization of glucose oxidase-containing liposomes for highly stable biocatalyst in bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, Hoboken, v.83, n.4, p.444-453, 2003.
- WENKIN, M.; RUIZ, P.; DELMON, B.; DEVILLERS, M. The role of bismuth as promoter in Pd-Bi catalysts for the selective oxidation of glucose to gluconate. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, Amsterdam, v.180, n.1/2, p.141-159, 2002.
- WILLNER, I. Biomaterials for sensors, fuel cells, and circuitry. **Science**, Washington, v.298, p.2407-2408, 2002.
- WINTGENS, T.; ROSEN, J.; MELIN, T.; BREPOLLS, C.; DRENSLA, K.; ENGELHARDT, N. Modelling of a membrane bioreactor system for municipal wastewater treatment. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.216, n.1/2, p.55-65, 2003.
- ZHANG, Y.; HIDAJAT, K.; RAY, A.K. Optimal design and operation of SMB bioreactor: production of high fructose syrup by isomerization of glucose. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v.21, p.111-121, 2004.
- ZHAO, H.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LI, Z. Use of the glucose oxidase system for estimation of oxygen transfer rate in a solid-state bioreactor. **Enzyme Microb. Technol.**, Amsterdam, v.30, n.7, p.843-846, 2002.