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

**Conversão Multienzimática da Sacarose em Frutose e
Ácido Glicônico usando Reatores Descontínuo e
Contínuo.**

Aline Ramos da Silva

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Michele Vitolo

São Paulo
2010

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

**Conversão Multienzimática da Sacarose em Frutose e
Ácido Glicônico usando Reatores Descontínuo e
Contínuo.**

Aline Ramos da Silva

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Michele Vitolo

São Paulo
2010

Aline Ramos da Silva

Conversão Multienzimática da Sacarose em Frutose e Ácido
Glicônico usando Reatores Descontínuo e Contínuo.

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Prof. Titular Michele Vitolo
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, 09 de Fevereiro de 2010.

**“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de
arrancar o que se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de
edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar,
e tempo de afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de
lançar fora;
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de
falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”
(Eclesiastes 3:1-8).**

Aos meus heróis, minha mãe e meu pai! Honrá-los nem precisava ser um mandamento bíblico, pois tudo o que sou, devo a vocês! Obrigada pelos maravilhosos irmãos que me deram, por todos os ensinamentos passados e pelo amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha força e minha fé, meu socorro sempre presente.

Ao Professor Titular Michele Vitolo, pelos ensinamentos como orientador, pela confiança em meu trabalho, pela valiosa amizade e por tornar este estudo possível.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório pela amizade e aprendizado conjunto: Ester Tomotani, Diana Andreotti e Fadi Taraboulsi.

Aos funcionários, professores e amigos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, por me ajudarem das mais diversas maneiras a realizar meu trabalho.

Aos meus pais, Luiz e Lurdinha, meus irmãos, Daniele e Raphael, e meus avós, Lázara e Benedito, por me apoiarem e se fazerem presentes em todos os momentos da minha vida. Que Deus os abençoe muito por tudo o que fazem e fizeram por mim.

Aos meus tios, Divaldo e Eliana, por toda a ajuda, atenção e apoio nesses 2 anos.

À minha amiga Meire Zanchetta, por ter me acolhido com muito carinho assim que cheguei em São Paulo.

Às minhas companheiras de vida, minhas queridas amigas-irmãs, dádivas de Deus para mim: Mariana Fonte Boa, Marta Lopes Lima e Milena Nakagawa.

Às minhas amigas e companheiras de apartamento, Gisele Medeiros e Carolina Cruz.

Aos meus queridos amigos e amigas que direta ou indiretamente foram importantes neste período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho.

Enfim, a todos que participaram deste momento tão especial da minha vida.

Muito obrigada.

Conversão Multienzimática da Sacarose em Frutose e Ácido Glicônico usando Reatores Descontínuo e Contínuo.

Aline Ramos da Silva

Resumo

A sacarose é uma matéria-prima, cuja produção é considerada ecologicamente correta, sendo o Brasil seu maior produtor e exportador. O dissacarídeo pode ser convertido, através de um processo multienzimático, em substâncias de maior valor agregado: frutose e ácido glicônico, as quais são importadas pelo Brasil, tendo amplo uso nos setores químico, farmacêutico e alimentício. A conversão foi feita através da ação da invertase, glicose oxidase e catalase, utilizando os reatores descontínuo e contínuo. No procedimento utilizando reator descontínuo, o tempo de residência é igual para reagentes, produtos e catalisador. Neste caso as enzimas foram adicionadas sequencialmente, em um primeiro momento, e na segunda etapa foram adicionadas simultaneamente. Os parâmetros de partida, a saber, concentração inicial de sacarose, pH, temperatura e atividades enzimáticas, foram testados em diferentes quantidades no intuito de encontrar a mistura inicial mais eficiente na conversão do substrato. No procedimento contínuo, utilizou-se reator com membrana, da marca MILLIPORE[®], que permite integrar em uma única etapa a conversão catalítica, a separação/concentração do produto e a recuperação do biocatalisador. A temperatura foi controlada por circulação de água, tendo acoplado uma bomba peristáltica (para controlar a vazão de alimentação do substrato) e um sistema de pressurização. O reator operou com membrana de ultrafiltração (corte molecular = 100 kDa) e foi mantido sob agitação constante. Os parâmetros de partida, neste reator, foram fixados de acordo com os valores otimizados no reator descontínuo com o emprego simultâneo das enzimas.

Palavras-chave: Invertase. Glicose oxidase. Catalase. Açúcar invertido. Ácido glicônico. Reatores descontínuo e contínuo.

Multienzyme Conversion of sucrose into fructose and gluconic acid in Discontinuous and Continuous Reactors.

Aline Ramos da Silva

ABSTRACT

Sucrose is produced in large amount in Brazil, being a worldwide commercialized commodity. However, it can be converted into more valuable products such as fructose and gluconic acid, both used largely in the chemical, pharmaceutical and food industry. Conversion occurred through the action of invertase, glucose oxidase and catalase, using the discontinuous and continuous reactors. In the batch reactor, the residence time is equal to the reactants, products and catalyst. In this case, enzymes were added sequentially, at first, and in the second step were added simultaneously. The parameters (initial sucrose concentration, pH, temperature and enzyme activities) were tested at different amounts in order to find the most efficient initial mixture to the conversion of the substrate. In continuous process, it was used a membrane reactor (MR), which allows for one-step catalytic conversion, the separation / concentration of the product and recovery of the biocatalyst. The substrate solution was fed into MR through a peristaltic pump and the overall operational system was maintained pressurized during the reaction course. The reactor was operated with ultrafiltration membrane (molecular cutoff = 100 kDa) and it was kept under constant agitation. The initial parameters in this reactor were set according to the values optimized in the batch reactor with the simultaneous use of enzymes.

Key words – Invertase. Glucose oxidase. Catalase. Invert sugar. Gluconic acid. Discontinuous and continuous reactors.

Lista de ilustrações

Figura 1. Variação da concentração de ART em função do tempo. A equação de regressão linear é: $y = 0,0573x + 0,0096$ ($r = 0,998$), na qual y é a concentração de ART em mg/mL e o x, tempo de reação.....	22
Figura 2. Efeito do pH sobre a atividade da invertase.....	22
Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade da Invertase, sendo o pH do meio reacional igual a 4,6. O tempo de reação foi fixado em 6 minutos. A equação de regressão linear é: $v_i = 0,0024T - 0,033$ ($r = 0,9995$).....	23
Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade da Invertase, sendo o pH do meio reacional igual a 5,0. O tempo de reação foi fixado em 6 minutos. A equação de regressão linear é: $v_i = 0,0023T - 0,029$ ($r = 0,995$).....	24
Figura 5. Gráfico convencional de Arrhenius para a determinação da energia de ativação (E_a) da hidrólise da sacarose pela invertase. A equação de regressão linear é: $\text{Log}v_i = -1767,8(1/T) + 4,454$ ($r = 0,990$).....	25
Figura 6. Atividade da invertase em função da concentração de sacarose.....	26
Figura 7. Gráfico seguindo o método convencional de Lineweaver-Burk para a determinação das constantes cinéticas da invertase. A equação de regressão linear é: $1/v_i = 387(1/s) + 13,6$ ($r = 0,997$).....	27
Figura 8. Porcentagem (%) de Conversão da Sacarose em ART no decorrer da reação, para as concentrações iniciais de sacarose iguais a: 2g/L(♦), 4g/L(■) e 8g/L(▲).....	28
Figura 9. Porcentagem (%) de Conversão da Sacarose em ART no decorrer da reação, para as concentrações iniciais de sacarose iguais a: 16g/L(◇), 32g/L(*) e 64g/L(○).....	28
Figura 10. Estabilidade da invertase mantida em pH 4,5 e 37°C por um período total de 30h.....	29
Figura 11. Variação da concentração de água oxigenada (mg/mL) em função do tempo. A equação de regressão linear é: $y = 0,0011x - 0,001$ ($r = 0,998$), na qual y é a concentração de água oxigenada e x, o tempo de reação.....	30
Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade da glicose oxidase.....	31
Figura 13. Atividade da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura, para um tempo de reação total de 60 minutos.....	32
Figura 14. Logaritmo da atividade da GOD em função do inverso da temperatura para o cálculo da Energia de Ativação (E_a), sendo a equação de regressão linear:	33

Log $v_{GOD} = -2447(1/T) + 5,02$ ($r = 0,98$).....	
Figura 15. Atividade da GOD em função da concentração de glicose.....	34
Figura 16. Inverso da atividade da GOD em função do inverso da concentração de glicose, conforme método de Lineweaver-Burk. A equação de regressão linear é: $(1/v_{GOD}) = 4198,9(1/S) + 207,23$ ($r = 0,994$).....	34
Figura 17. Estabilidade da GOD mantida em pH4,5 e 37°C por um período total de 30h.....	35
Figura 18. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 1mg de catalase em função do tempo, (pH 4,5 e 37°C).....	36
Figura 19. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 2mg de catalase em função do tempo, (pH 4,5 e 37°C).	37
Figura 20. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 10mg de catalase em função do tempo, (pH 4,5 e 37°C).	37
Figura 21. Absorção de luz em $\lambda=240nm$ pela catalase em função do tempo, em pH 4,5 e 37°C.	38
Figura 22. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 10mg de catalase em função do tempo, em pH 4,5 e 37°C. Adição de substrato e enzima a cada 5 minutos.....	39
Figura 23. Absorção de luz UV pela catalase em função do tempo, em pH 7,0 e 37°C.	39
Figura 24. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 10mg de catalase em função do tempo, em pH 7,0 e 37°C. Adição de substrato e enzima a cada 5 minutos.....	40
Figura 25. Consumo de glicose (medido como ART residual) em função do tempo, usando GOD e catalase. Solução de glicose: 1g/L ($\diamond$), 2g/L (*) e 4g/L($\bullet$).....	41
Figura 26. Consumo de glicose (medido como ART residual) em função do tempo, usando GOD e catalase. Solução de glicose: 8g/L ($\blacktriangle$) e 16g/L ($\square$).....	41
Figura 27. Água oxigenada residual resultante da ação da GOD e catalase sobre soluções de glicose: 1g/L ($\diamond$), 2g/L ($\blacksquare$) e 4g/L ($\blacktriangle$).....	42
Figura 28. Água oxigenada residual resultante da ação da GOD e catalase sobre soluções de glicose: 8g/L ($\blacklozenge$) e 16g/L ($\square$).....	42
Figura 29. Formação de ART em função do tempo devido à hidrólise da sacarose (32g/L) pela invertase.	44
Figura 30. Variação do percentual de ART, em função do tempo, presente no meio de reação, devido à ação da glicose oxidase sobre a glicose.	

resultou da hidrólise da sacarose pela invertase.	45
Figura 31. Concentração de água oxigenada residual acumulada no meio durante a reação.	45
Figura 32. Variação da concentração dos açúcares redutores totais em função do tempo para a conversão sacarose/(frutose + ácido glicônico) com o uso simultâneo das enzimas (invertase, glicose oxidase e catalase).....	46
Figura 33. Concentração de água oxigenada residual em função do tempo de reação decorrente da conversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico.	47
Figura 34. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste1).....	48
Figura 35. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste2).....	49
Figura 36. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste3).....	50
Figura 37. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste4)	50
Figura 38. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste5)	51
Figura 39. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste6)	52
Figura 40. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste7)	53
Figura 41. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste8)	54
Figura A. Curva-padrão média para padronização da dosagem de ART, cujo teor é expresso em mg de glicose. A equação de regressão linear da reta apresentada, onde 'y' e 'x' correspondem, respectivamente, às absorbâncias e ao teor de glicose (mg), é a seguinte: $y = 2,46x - 0,011$ ($r = 0,9996$).	62
Figura B. Curva-padrão para a dosagem de glicose, segundo o método de Somogyi-Nelson. A equação de regressão linear é: $y = 2,23x - 0,0081$ ($r = 0,9998$).	63
Figura C. Curva-padrão média para a padronização da dosagem de água oxigenada, cuja quantidade é expressa em mg de H_2O_2 . A equação de regressão linear da reta apresentada, onde 'y' e 'x' correspondem, respectivamente, às	64

absorbâncias e à quantidade de H_2O_2 (mg), é a seguinte: : $y = 1,655x + 0,00424$ ($r = 0,99998$).

Figura D. Curva-padrão média para a padronização da dosagem de proteína, cujo teor é expresso em μg de albumina. A equação de regressão linear da reta apresentada, onde 'y' e 'x' correspondem, respectivamente, às absorbâncias e ao teor de proteína (μg), é a seguinte: $y = 0,0061x + 0,0072$ ($r = 0,99998$)..... 65

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações de sacarose e atividades invertásicas específicas empregadas nos testes para a determinação da conversão total de sacarose em açúcar invertido (glicose e frutose).....	16
Tabela 2. Parâmetros utilizados nos testes utilizando GOD e catalase para a conversão total de glicose em ácido glicônico.	19
Tabela 3. Atividade enzimática da Invertase em função da variação de temperatura (pH 4,6 e pH5,0).....	24
Tabela 4. Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (Ea) da reação catalisada pela invertase.....	25
Tabela 5. Variação da atividade invertásica frente a diferentes concentrações iniciais de sacarose.....	26
Tabela 6. Atividade específica da invertase utilizada para de determinação da conversão total de sacarose em ART.....	27
Tabela 7. Porcentagem (%) de Conversão da Sacarose em ART no decorrer da reação.....	28
Tabela 8. Atividade invertásica residual, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.....	29
Tabela 9. Testes realizados para conversão da glicose em ácido glicônico pela GOD e formação de H ₂ O ₂ (pH 5,1 e 37°C).....	30
Tabela 10. Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação do pH; temperatura de 37°C.....	31
Tabela 11. Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura.....	32
Tabela 12. Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (Ea) da reação catalisada pela glicose oxidase.....	33
Tabela 13. Dados utilizados para o cálculo das constantes cinéticas da GOD, aplicando o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk.....	34
Tabela 14. Atividade residual da GOD , determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.....	35
Tabela 15. Quantidade de ART (mg em 150mL) e de H ₂ O ₂ (mg/mL) presente nas amostras da reação de oxidação da glicose em processo descontínuo.....	40
Tabela A. Volumes indicados para o método de Somogyi-Nelson.....	62

Tabela B. Volumes indicados para a determinação da H_2O_2	63
Tabela C. Volumes indicados para a determinação da quantidade de proteína solúvel.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enzimas	3
1.1.1. Invertase	3
1.1.2. Glicose oxidase (GOD)	4
1.1.3. Catalase	6
1.1.4. Produtos	6
1.1.5. Bioconversão	8
1.1.6. Sistema multienzimático	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. METODOLOGIA	13
3.1. Materiais	13
3.1.1. Enzimas	13
3.1.2. Substratos	13
3.1.3. Reagentes e Vidraria	13
3.1.4. Biorreator Contínuo e Membrana	13
3.2. Equipamentos	13
3.3. Métodos	13
3.3.4. Atividade experimental	14
3.3.5. Caracterização da Invertase	15
3.3.5.1. Efeito do pH na atividade da invertase	15
3.3.5.2. Efeito da temperatura na atividade da invertase	15
3.3.5.3. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase	15
(determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{máx}$)	
3.3.5.4. Determinação da conversão total de sacarose em ART	16
3.3.5.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase	16
3.3.6. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD)	16
3.3.6.1. Determinação da atividade enzimática da GOD	17
3.3.6.2. Efeito do pH na atividade da GOD	17
3.3.6.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD	17
3.3.6.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das	17

constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$)	
3.3.6.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD	17
3.3.7. Caracterização da Catalase	18
3.3.7.1. Efeito da concentração de Catalase	18
3.3.7.2. Efeito da concentração de Catalase (método modificado)	18
3.4. Bioconversão em reator descontínuo utilizando Glicose Oxidase e Catalase	19
3.5. Bioconversão em reator descontínuo (adição sequencial de enzimas)	19
utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase	
3.6. Bioconversão em reator descontínuo (adição simultânea de enzimas)	20
utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase	
3.7. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo	20
com membrana.	
3.7.1. Teste 1	20
3.7.2. Teste 2 (Aumento do tempo de residência)	21
3.7.3. Teste 3 (Redução da concentração de invertase)	21
3.7.4. Teste 4 (Redução da concentração de invertase)	21
3.7.5. Teste 5 (Redução da concentração de invertase)	21
3.7.6. Teste 6 (30°C)	21
3.7.7. Teste 7 (40°C)	21
3.7.8. Teste 8 (45°C)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Experimentos Realizados	21
4.1.1. Determinação da atividade enzimática da Invertase	21
4.1.2. Efeito do pH na atividade da invertase	22
4.1.2. Efeito da temperatura na atividade da invertase	23
4.1.3. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação	25
das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$)	
4.1.4. Determinação da conversão total de sacarose em ART	27
4.1.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase	29
4.2. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD)	30
4.2.1. Determinação da atividade enzimática da GOD	30
4.2.2. Efeito do pH na atividade da GOD	31
4.2.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD	31

4.2.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{máx}$)	33
4.2.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD	35
4.3. Caracterização da Catalase	35
4.3.1. Efeito da concentração de Catalase	36
4.3.2. Efeito da concentração de Catalase (método modificado)	37
4.4. Bioconversão em reator descontínuo utilizando Glicose Oxidase e Catalase	40
4.5. Bioconversão em reator descontínuo (adição seqüencial de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase	43
4.6. Bioconversão em reator descontínuo (adição simultânea de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase	45
4.7. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.	47
4.7.1. Teste 1	47
4.7.2. Teste 2 (Aumento do tempo de residência)	48
4.7.3. Teste 3 (Redução da concentração de invertase)	49
4.7.4. Teste 4 (Redução da concentração de invertase)	50
4.7.5. Teste 5 (Redução da concentração de invertase)	51
4.7.6. Teste 6 (30°C)	51
4.7.7. Teste 7 (40°C)	52
4.7.8. Teste 8 (45°C)	53
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7. ANEXO I	61
7.1. Padronização dos reagentes de Somogyi-Nelson	61
7.1.1. Preparação dos reagentes de Somogyi	61
7.1.2. Preparação das soluções de glicose	61
7.1.3 Estabelecimento da curva-padrão	61
7.1.4. Determinação do erro experimental.	62
7.2. Determinação da dosagem de água oxigenada (H_2O_2).	63
7.2.1. Determinação da curva-padrão.	63
7.2.2. Determinação do erro experimental.	63
7.3. Determinação da proteína solúvel	64

7.3.1. Determinação da curva-padrão	64
7.3.2. Determinação do erro experimental.	65
7.4. Quantificação de proteína na solução original de invertase.	65
7.5. Quantificação de proteína na GOD.	65
8. ANEXO II – Resumos submetidos a eventos	67
9. ANEXO III- Documento	74

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área plantada de 7 milhões de hectares e uma safra anual de cerca de 32,8 milhões de toneladas. Em consequência disso é, naturalmente, o mais importante produtor mundial de açúcar e de álcool. As projeções da OCDE (Organization for Economic Co-Operation And Development) e do FAPRI (Food and Agricultural Policy Research Institute) indicam que o Brasil será o país com maior poder na determinação dos futuros preços mundiais do açúcar, mantendo-se como líder em produtividade e em exportação do produto. Segundo o FAPRI (2008), o Brasil deverá aumentar a produção em 7 milhões de toneladas atingindo 40,76 milhões de toneladas em 2017/18. Portanto, o comércio de açúcar brasileiro deve aumentar em 20,6%. Se o Brasil e também a Índia, por serem grandes produtores de açúcar, elevarem os ganhos de produtividade e eficiência na produção, poderão induzir a redução de preços no mercado internacional, segundo o FAPRI (MAPA, 2009).

Ainda mais otimistas, as estimativas obtidas pela AGE (*Assessoria de Gestão Estratégica*) indicam uma taxa média anual de crescimento de 3,25% para a produção brasileira de açúcar no período 2008/2009 a 2018/2019. Isto deverá elevar a produção para 47,34 milhões de toneladas do produto ao final do período estimado, correspondendo a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação a 2007/2008. Nos próximos 11 anos, o consumo deve aumentar 1,84% ao ano, e as exportações, 4,08% ao ano, sendo que a projeção de exportação para 2018/2019 é de um volume de 32,64 milhões de toneladas (MAPA, 2009). O ciclo de produção de cana e o uso dos seus produtos representam hoje uma grande contribuição à redução das emissões globais de CO₂, principalmente pelo uso energético do etanol e bagaço na substituição de combustíveis fósseis (MACEDO, 2006). Ecológico, limpo e renovável, o etanol tem sido essencial para a autonomia energética do país (Fonte: Petrobrás, dados 2007).

Outro derivado é o açúcar (sacarose) que em 2003, segundo dados consolidados pela Secretaria de Produção e Comercialização (SPC), atingiu em suas exportações 12,9 milhões de toneladas, com receita de US\$ 2,1 bilhões, um resultado 2,2% superior ao registrado em 2002. A produção em 2003/2004 chegou a 24,8 milhões de toneladas de açúcar (Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dados 2007). Na safra atual (2008/09) serão produzidas cerca de 30,4 milhões de toneladas de açúcar (Fonte: Datagro, 2008). Estas cifras qualificam o Brasil como um dos maiores produtores mundiais de açúcar.

A sacarose (α -D-glicopiranosil β -D-frutofuranosídeo) é um dissacarídeo não redutor constituído por dois monossacarídeos unidos covalentemente entre si por uma ligação O-glicosídica (tipo α,β), formada quando o grupo hidroxila- α (em posição equatorial com respeito ao C1) de uma molécula de glicose (na forma cíclica) reage com a hidroxila- β (em posição axial com respeito ao C2) de uma molécula de frutose (na forma cíclica). A hidrólise é feita pela enzima invertase (sacarase), originando uma mistura equimolar de glicose e frutose (VITOLLO, 2004). A sacarose é encontrada em frutas e produtos alimentícios industrializados, como: sucos, geléias, extratos de tomate ou de batata, pães, biscoitos, sorvete, produtos de confeitaria, sobremesas, produtos de açúcar refinado (AEHLE, 2004).

O presente trabalho tem a intenção de converter a sacarose em produtos de maior valor agregado, como: frutose e ácido glicônico, importados pelo país e amplamente utilizados nos segmentos industriais, como: farmacêutico, químico e de alimentos (NEVES, 2006; TOMOTANI, 2006). A conversão, por via enzimática, dar-se-á pela utilização simultânea das enzimas: invertase, glicose oxidase e catalase. Este processo poderá colaborar na diversificação de produtos fabricados pelo setor sucro-alcooleiro nacional. Inclusive, na situação de baixa demanda mundial pelo açúcar, a sacarose em excesso poderia ser convertida em frutose e ácido glicônico, produtos de valor agregado superior e de mercado cativo. Desta maneira, seria evitado o armazenamento por longos períodos – indesejável por ocupar espaço dos armazéns, além dos custos envolvidos, e causar deterioração do produto, já que o mesmo é muito higroscópico - e/ou o prejuízo advindo da sua eventual conversão em etanol combustível.

A biocatálise é um processo rigorosamente controlado e conduzido - de modo descontínuo ou contínuo - em condições brandas de pH e temperatura, de forma que substâncias sensíveis a condições extremas de processo (muito comuns em processos químicos) possam ser transformadas com eficiência. Além disso, as enzimas são catalisadores altamente seletivos, possibilitam executar reações simultâneas, geram resíduos de baixa ou nenhuma toxicidade, além de poderem ser reciclados (sobretudo quando usados na forma imobilizada) (TOMOTANI, 2006).

Processos enzimáticos são uma alternativa vantajosa para a obtenção de produtos químicos orgânicos, alimentícios, farmacêuticos, como: hormônios, vitaminas e outros produtos de origem fermentativa. Em decorrência dos avanços da biotecnologia, os biocatalizadores tornaram-se disponíveis, o que aumentou a utilização dos mesmos em processos industriais. A aplicação da biocatálise é vantajosa em relação

aos processos tradicionais de extração (dependente de matéria-prima disponível e baixo rendimento do produto final), de fermentação (econômica somente em grandes volumes) e de síntese química (bastante poluente, alto consumo de energia e baixa enantioseletividade) (NEVES, 2006; TOMOTANI, 2006).

1.1. Enzimas

1.1.1. Invertase

A invertase (EC.3.2.1.26, β -fructofuranosídeo fructohidrolase) é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose, originando uma mistura em quantidades iguais de frutose e glicose. A mistura de monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar a luz plano polarizada no sentido anti-horário (levógiro), em contraposição à solução aquosa da sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrógiro). Ressalta-se que os componentes desta mistura não cristalizam e possui índice de dulçor superior ao da sacarose (NEVES, 2006).

A invertase é uma glicoproteína de 270 kDa de massa molar e possui cerca de 30 cadeias de manana por molécula de proteína. Sua principal fonte é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo encontrada na parede celular – mais precisamente no espaço periplásmico - deste microrganismo. Na levedura a invertase é achada tanto na forma não-glicosilada (citossol) quanto glicosilada (parede celular), sendo esta última a forma comercial da enzima (VITOLO, 2004).

A invertase possui estrutura quaternária formada por duas cadeias peptídicas, mas que podem se aglutinar formando agregados supramoleculares tetra, hexa e/ou octaméricos apresentando atividade catalítica e termoestabilidade crescentes. É estável a temperaturas entre 30 e 50°C e pH 3,5 – 5,5, sendo o pH ótimo igual a 4,6. A velocidade de reação da invertase diminui em concentrações de sacarose acima de 120g/L, devido ao aumento da viscosidade e/ou à diminuição da atividade de água do meio reacional (VITOLO, 2004).

A hidrólise enzimática da sacarose, executada em condições brandas de temperatura (37-40°C) e pH (4,5 – 5,0), serve de contraponto à hidrólise ácida – feita em reator contínuo operado em contracorrente à temperatura da ordem de 80°C e pH em torno de 2,0 - porque gera um xarope livre de produtos colaterais tóxicos (furfural, hidroximetilfurfural, por exemplo), prescindindo de purificação posterior. A hidrólise enzimática para deslocar em definitivo a hidrólise ácida do contexto industrial deve ser realizada de modo contínuo e de forma a recuperar a enzima no final do processo. Isto

pode ser conseguido quer imobilizando a enzima em suportes inertes insolúveis quer usando a enzima na forma solúvel, porém confinada em um reator com membrana (TOMOTANI, VITOLO, 2007).

Segundo VITOLO (2004), além de permitir a obtenção do açúcar invertido, a invertase encontra aplicação em confeitaria, na preparação do HTM (“High Test Molasses”, melaço no qual a sacarose não cristaliza), em biossensores, como enzima-modelo em testes de liofilização e congelamento/descongelamento. Ressalta-se o seu uso na avaliação da aplicabilidade de novos suportes inertes para a imobilização de enzimas (De QUEIROZ, et al., 2002).

1.1.2. Glicose oxidase (GOD)

A glicose oxidase (EC.1.1.3.4; β -D-glucose 1-oxidoreductase), usualmente obtida de *Aspergillus niger*, é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glicose com consumo de oxigênio formando gluconolactona (D-glicono δ -lactona) e peróxido de hidrogênio. Esta 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 pH entre 3,5 e 7,0. Atua bem em temperaturas entre 30 a 40°C, tornando-se instável acima de 50°C.

A ação da GOD se dá efetivamente em duas fases. Na primeira, que consiste na redução do grupo prostético FAD para $FADH_2$, dois átomos de hidrogênio são transferidos da glicose para o grupo prostético FAD, formando-se a δ -gluconolactona ($C_6H_{10}O_6$). Na segunda, que consiste na oxidação do $FADH_2$, a enzima transfere os dois átomos de hidrogênio diretamente para o oxigênio molecular (O_2) originando a H_2O_2 . A δ -gluconolactona reage com a água, espontaneamente, ou por ação da enzima gluconolactonase, formando o ácido glicônico ($C_6H_{12}O_7$). O peróxido de hidrogênio, devido ao seu potencial redox elevado, interfere na ação da GOD em alguma extensão, já que o mecanismo da enzima envolve a alternância entre os estados oxidado e reduzido de seu grupo prostético (WHITAKER, et al., 2002). Segundo TOMOTANI et al. (2005), a água oxigenada em concentração acima de 1,22 mM causa inibição reversível não competitiva da GOD, provavelmente por interferir no grau de oxidação do átomo de ferro existente em cada uma de suas cadeias peptídicas. A atividade da GOD é favorecida, quando os átomos de ferro da molécula encontram-se em seu menor grau de oxidação (Fe^{+2}). Por isso, torna-se importante o uso da catalase para decompor a H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Ressalta-se que a GOD comercial já vem “contaminada” com catalase, porém em quantidade insuficiente para decompor a água

oxigenada formada durante a oxidação da glicose, sendo necessária a sua adição no processo.

A glicose oxidase pode ser usada tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada, devido a sua alta especificidade pela glicose. Apresenta importância comercial considerável na indústria de alimentos, usada em associação com a catalase para a desglicosação de ovos e como agente estabilizador das propriedades organolépticas de alimentos em geral (PERALTA, 2004). Entre outras aplicações, é usada em associação com a peroxidase em kits enzimáticos para dosagem de glicose em solução e na presença de ortodianisidina como indicador colorimétrico (WOODWARD, SPOKANE, 1996; VASILEVA, GODJEVARGOVA, 2004); em medicamentos anticancerígenos, para produzir o radical livre peróxido ($\text{HOO}\bullet$) de forma a auxiliar na morte de células tumorais (RABA, MOTTOLA, 1995; SANTOS, 2001); em biossensores: na forma não associada (CRUEGER, CRUEGER, 1990) e na forma associada a outras enzimas, a complexos inorgânicos ou complexos orgânicos (VOJIVONIC, et al., 2005; LIU, et al., 2004; TRAU e RENNENBERG, 2003; FANG, et al., 2002); na remoção de oxigênio em refrigerantes e enlatados (ISIK et al., 2003); e na estimativa da transferência do oxigênio em processo fermentativo semi-sólido (ZHAO et al., 2002).

No caso do emprego da GOD para a conversão da glicose em ácido glicônico, dispõe-se de reatores de dimensões reduzidas para fins puramente analíticos (dosagem de glicose “on line”; acoplados a aparelhos analíticos ou diretamente ao reator principal) ou de maior porte. Dentre estes últimos, observa-se da literatura que os reatores usados são do tipo leito fixo em sua maioria, porém, quando claramente do tipo reator com membrana, a GOD acha-se unida à membrana (BRAHIM, et al., 2002; GIORNO e DRIOLI, 2000). Reatores do tipo leito fluidizado são também usados na conversão glicose/ácido glicônico, estando a GOD aprisionada dentro de polímeros (NAKAO et al., 1997) ou dentro de lipossomas ligados covalentemente à quitosana (YOSHIMOTO, et al., 2003). Recentemente, NEVES & VITOLO (2007) descreveram a oxidação da glicose em ácido glicônico pela GOD solubilizada no meio reacional, usando um reator com membrana unimodular, ao qual foi acoplada em sua base uma membrana de ultrafiltração de caráter hidrofílico e constituída por celulose regenerada. Esta mesma reação também foi executada usando-se a GOD imobilizada em resina trocadora de íons, a qual foi mantida em suspensão no meio reacional. Neste caso, o reator com membrana unimodular foi acoplado a uma membrana de microfiltração, permitindo

realizar a reação de modo contínuo e em regime permanente com tempo de residência menor (TOMOTANI, VITOLO, 2007a).

1.1.3. Catalase

A catalase (hidrogênio-peróxido oxidoredutase, EC 1.11.1.6) é extensamente distribuída na natureza. Encontrada em todos os microorganismos aeróbicos e em todas as células vegetais e animais. A reação da catalase em células de mamíferos varia, mas sua maior atividade é no fígado e nos rins. Por esta razão, a catalase utilizada comercialmente é retirada de fígado bovino. O pH ótimo é próximo de 7,0 e a temperatura é de 37 °C.

Na indústria de laticínios, a atividade da catalase detecta contaminação do leite por neutrófilos e granulócitos, além de ser usada para remover peróxido de hidrogênio do leite e em outros alimentos. Esta enzima também é largamente utilizada na remoção de oxigênio molecular de alimentos, como: ovo desidratado em pó, sucos de frutas, e vinhos, na prevenção do escurecimento enzimático por polifenol oxidase. Em menor escala, é utilizada na indústria têxtil para certificar que o material é livre de radicais livres (peróxido de hidrogênio), na limpeza de lentes de contato, e recentemente, em produtos estéticos para diminuir a oxidação celular da epiderme (WHITAKER, et al., 2002).

Neste trabalho, como já dito anteriormente, a catalase será utilizada como enzima auxiliar para decompor a água oxigenada, evitando seu efeito inibitório sobre a GOD. Além disso, o oxigênio gerado poderá servir de substrato para a GOD, permitindo reduzir ou até mesmo eliminar a necessidade de se insuflar ar no meio de reação. O fato de o oxigênio ser gerado no seio do meio reacional, o movimento de suas bolhas auxiliam a manter o sistema sob agitação, levando à economia de energia (menor potência de agitação mecânica) e à redução da turbulência interna do sistema, que acaba se traduzindo na formação de pouca espuma e na redução da intensidade das forças de cisalhamento, geralmente associadas ao fluxo fluídico turbulento. Lembra-se, que a presença de proteínas no meio reacional – sobretudo devido às enzimas utilizadas – diminui a tensão superficial, gerando a espuma. É fato sobejamente conhecido, que o excesso de espuma, pode causar extravasamento do conteúdo do reator e, por conseguinte, perda significativa de material, além de causar a inativação de enzimas.

1.1.4. Produtos

O produto da reação da glicose oxidase sobre a glicose, o ácido glicônico, é obtido através da via fermentativa ou através da catálise química homogênea e/ou

heterogênea. O processo fermentativo tradicional é executado usando o *Aspergillus niger* (mais comum em escala industrial), *Gluconobacter suboxydans* ou *Acetobacter methanolicus* (NEVES, 2006). ERZINGER e VITOLO (2006) demonstraram a capacidade biocatalítica da bactéria *Zymomonas mobilis* – através da ação da glicose-frutose-oxidoreductase, enzima localizada na parede celular do microrganismo – em transformar a glicose em ácido glicônico. Segundo RAMACHANDRAN (2006), apesar do processo fermentativo ser o mais comum na produção deste ácido, há um processo enzimático aprovado pelo FDA no qual não se usa o microrganismo, e sim, esporos de *Aspergillus niger*. Os esporos, apesar de serem considerados metabolicamente inertes, são carregados de enzimas e espera-se que sejam um método promissor de realizar catálises, já que, são resistentes a ambientes extremos, suportam altas temperaturas e pressão, além de serem tolerantes a compostos tóxicos.

Os processos químicos de catálise homogênea e heterogênea apresentam desvantagens em relação à produção biotecnológica, pois o rendimento é baixo, formam-se subprodutos indesejáveis, além de poluir o meio ambiente com agentes oxidantes e devido ao alto grau de pureza da glicose para ser convertida (ERZINGER, 1996). BIELLA et al. (2002) e WENKIN et al. (2002) postularam uma via química de obtenção do ácido glicônico através da imobilização de metais em carvão ativo. Porém, no final da reação não obtiveram o ácido glicônico livre – tal como ocorre na via enzimática -, mas na forma de sal, que traz como desvantagem a necessidade de se incluir uma operação unitária adicional, qual seja a neutralização do produto final.

De acordo com NEVES (2006), o ácido glicônico tem alta capacidade quelante de íons metálicos. Este ácido e seus sais de cálcio, potássio, ferro e zinco são muito utilizados na indústria alimentícia, na produção de: acidulantes para sorvetes, balas, refrescos, xaropes; aditivos para carnes; removedores de metais e calcário na fabricação de bebidas. Na indústria farmacêutica, os sais de cálcio e ferro têm utilidade na terapia de reposição destes íons, além do sal de magnésio servir como padrão na dosagem deste íon no soro. Na indústria têxtil são usados como branqueadores e, na indústria química, tanto o ácido como o gliconato de sódio são usados para limpar superfícies metálicas, no intuito de remover óxidos, hidróxidos e carbonatos de cátions polivalentes.

A frutose é uma cetohexose que ocorre no mel e em frutos, por isso sua denominação, e unida à glicose dá origem à sacarose. É sempre encontrada na forma D-frutose e é levógira. Até a década de setenta, era produzida a partir do açúcar invertido e separada na forma de frutonato de cálcio. Depois deste período, passou a ser produzida

em escala industrial a partir do açúcar invertido, passando a matéria prima por colunas cromatográficas empacotadas com resinas de troca iônica (CRUEGER e CRUEGER, 1984). Também pode ser produzida pela isomerização da glicose (proveniente da hidrólise do amido), usando a enzima glicoseisomerase. O produto final é um xarope constituído por quantidades quase iguais de frutose e glicose, e que se submetido a um procedimento cromatográfico, resulta um xarope contendo um percentual de frutose entre 55% e 80% (BENTLEY e WILLIAMS, 1996).

Os xaropes de frutose, mistura de alta viscosidade de frutose e glicose, são muito utilizados na indústria alimentícia por serem parecidos com o mel e produzidos a partir de hidrolisados de amido do milho. A sacarose é geralmente substituída por este tipo de xarope por ter menor poder adoçante e pela frutose apresentar melhores propriedades funcionais, o que confere aspecto e estabilidade mais adequados ao produto final (FERNANDES e SOARES, 2006; NEVES, 2006). Neste trabalho, a frutose resulta como produto da hidrólise da sacarose, possibilitando a obtenção de um xarope com alto teor em frutose – após a separação do ácido glicônico formado pela oxidação da glicose catalisada pela GOD (NEVES, 2006).

1.1.5. Bioconversão

As biocatálises, citadas acima, são possíveis e eficientes dependendo do biocatalisador e do biorreator utilizados. Biorreatores são reatores químicos onde ocorrem reações no qual um agente de natureza biológica é utilizado para transformar um determinado substrato em produto. O biocatalizador pode ser uma enzima, célula, organela celular ou anticorpo. Em termos operacionais, os biorreatores podem ser descontínuos ou contínuos (NEVES, 2006).

O biorreator descontínuo, no qual o tempo de residência é igual para reagentes, produtos e catalisador (solúvel ou insolúvel), é preferido nos casos em que o biocatalisador é barato ou possui meia-vida curta (TOMOTANI, 2006). Apesar de ser o tipo mais simples para modelar e operar, além de, ter aplicabilidade múltipla – pode ser usado desde como um tanque de armazenamento, um simples misturador (para preparar soluções), um decantador, dentre outros usos, tem o inconveniente de dificultar a proteção do biocatalisador – uma enzima, por exemplo – contra efeitos inibitórios causados pelo substrato ou produtos, quando estes estiverem acima de determinada concentração no meio reacional. Neste caso, passa a ser importante o chamado processo descontínuo-alimentado, no qual o substrato pode ser adicionado paulatinamente, fazendo com que sua concentração não alcance o limite inibitório. Além disso, este

processo acopla o enchimento do reator com a ocorrência da reação, que se bem acoplados, levam à coincidência do enchimento total do reator com o final da reação. Este procedimento elimina o “tempo morto” do processo, correspondente ao período durante o qual o reator está sendo carregado com o meio reacional. O tempo morto poderá ser significativo no caso em que o biorreator for de grande capacidade.

O biorreator contínuo surgiu como um prolongamento do uso 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, como 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 ou pistonada (reator de leito fluidizado).

Uma variante para manter o biocatalisador imobilizado em suspensão é o biorreator de tanque continuamente agitado (CSTR, na sigla em inglês), cuja configuração básica seria a de um reator descontínuo, ao qual se adaptou um sistema contínuo de introdução e de retirada de material (PÉREZ-TERRAZAS, et al., 2008). 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.

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 particular, podendo, inclusive, ser usado na configuração descontínua ou descontínua-alimentada).

No contexto dos biorreatores contínuos, merece atenção o biorreator com membrana (BM), que pode ser configurado de dois modos distintos, sendo 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 tipo de BM é chamado de “hollow fiber reactor (HFR)”, e tem sido usado em reações catalisadas por células íntegras (animais ou microbianas), “lodo ativado” – no tratamento de águas residuais -, ou simplesmente como sistema de ultrafiltração para sanitizar a água para uso humano (TOMOTANI, 2006; NAKLA, et al., 2006).

Em um reator 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 – 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) -, a qual atua tanto como sítio de catálise quanto como unidade de separação. Quanto ao arranjo membrana/reator, há duas possibilidades: aquele em que a membrana encontra-se em um módulo acoplado em série ao CSTR (BM-bimodular) e aquele em que a membrana faz parte da base do CSTR (BM-unimodular; tipo célula de ultrafiltração).

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. 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. Acrescentam-se a sua utilidade em escala laboratorial no monitoramento contínuo da atividade de enzimas, avaliando-se a desativação pelo pH e/ou pela temperatura ou elucidando mecanismos de inibição em condições operacionais.

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, et al., 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). Este último padrão de operação do BM é o mais indicado para evitar o fenômeno da polarização da membrana.

Atualmente o custo das membranas – microfiltração (diâmetro dos poros: 0,1-0,5 μ), ultrafiltração (diâmetro dos poros: 0,001-0,1 μ) e nanofiltração (espaçamento intercadas: < 2 nm), as quais têm características hidrofílicas, hidrofóbicas, neutras ou carregadas com grupos iônicos, sendo constituídas por materiais de diferentes naturezas (polisulfonas, celulose, acetato de celulose, politetrafluoretileno) (SHIN, KANG, 2003) – não afeta significativamente o custo global do reator, porque são bastante estáveis e podem ser regeneradas várias vezes. Por isso, usa-se como estratégia fornecer área de membrana suficiente para otimizar o tempo de operação de um BM, ao invés de minimizar a área da membrana para um determinado fluxo.

O sucesso do BM configurado como CSTR (uni ou bi-modular) se reflete no grande número de processos que o utilizam. Segundo TOMOTANI (2006), uma ampla diversidade de produtos têm sido obtidos com o BM, alguns exemplos, ciclodextrinas, frutoligossacarídeos, catecol, hidrolisados de caseína e de hemoglobina, síntese de ésteres e deslactosação enzimática do soro e/ou de leite integral.

Até o momento, são poucos os exemplos de processos descritos na literatura que empregam biorreatores com membrana, a maior parte deles envolve o emprego de uma só enzima para catalisar a conversão do substrato em produto. No entanto, o design do BM tornam-no adequado para o uso simultâneo de várias enzimas. Aproveitando esta característica do BM, tenciona-se – neste projeto – aplicá-lo na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em uma única etapa, usando o sistema multi-enzimático formado pela invertase, GOD e catalase. Espera-se, assim, contribuir para a difusão do uso de sistemas multienzimáticos aplicáveis às indústrias química, químico-farmacêutica e de alimentos.

1.1.6. Sistema multienzimático

Nas indústrias química, químico-farmacêutica e de alimentos, a síntese de complexos orgânicos envolve uma série de procedimentos. O desenvolvimento de novos sistemas de biotransformação viabiliza métodos no qual em um único procedimento ocorre uma série de reações, uma sequência de conversões enzimáticas interligadas, sendo uma cascata formada pela ação de diferentes enzimas. Este sistema é conhecido como multienzimático, de forma que tende a tornar o procedimento

simplificado, melhorando o desempenho das sínteses orgânicas com muitas etapas (PANKE, 2005).

Para a indústria alimentícia foi desenvolvido um sistema que, utilizando mais de uma enzima no mesmo meio reacional em presença de sacarose (β -frutofuranidase, glicose oxidase e catalase), produziu-se com alto rendimento frutoligossacarídeos (FOS) e ácido glicônico, precipitado em sal pela adição de CaCO_3 na reação (SHEU et al, 2001).

Alguns sistemas têm utilizado mais de uma enzima ao mesmo tempo, são os chamados biossensores. As reações enzimáticas podem ser usadas para a determinação de sacarose através de um biossensor construído com enzimas imobilizadas, como: glicose oxidase (GOD), invertase e mutarotase (conversão de α -D-glicose para β -D-glicose), de forma que este sensor é acoplado a um eletrodo de oxigênio. Através do consumo de oxigênio, a concentração de glicose é determinada no meio (KENNEDY et al, 2007). Outro tipo de biossensor, também, é utilizado para a mesma função, entretanto, funciona através de um sistema de camadas, onde as enzimas ficam presas a um gel e separadas do meio reacional por papel celofane. Para medir o consumo dos substratos, este biossensor conta com um eletrodo que mede a oxidação da H_2O_2 formada (CSÓKA et al, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar em reatores descontínuo e contínuo a conversão direta da sacarose em frutose e ácido glicônico pela ação conjunta das enzimas invertase, glicose oxidase e catalase.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Caracterização cinética da invertase;
- b) Caracterização cinética da glicose oxidase;
- c) Estabelecer a correlação atividade da catalase/decomposição da água oxigenada;
- d) Conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico pela adição sequencial de invertase e da mistura glicose oxidase e catalase;
- e) Conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico pela adição simultânea das enzimas. Determinação do menor tempo para esta conversão, que será tomado como base para fixar o tempo de residência inicial para operar o BM-unimodular;
- f) Avaliar o emprego do reator contínuo com membrana (BM-unimodular) na conversão multi-enzimática da sacarose.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

- Invertase (EC.3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* (Quest-Internacional®);
- Glicose Oxidase (EC.1.1.3.4) de *Aspergillus niger* (SIGMA®); [1g = 5000U; 1U = 1μmol de β-D-glicose em D-gliconolactona e H₂O₂/min].
- Catalase (EC 1.11.1.6) de fígado bovino (SIGMA®); [1mg = 2950U; 1U = 1μmol H₂O₂/min].

3.1.2. Substratos

- Sacarose (Merck® Lote K29959887 218);
- Glicose (Synth® Lote 10941);
- Água Oxigenada (grau farmacêutico 10 volumes);
- Albumina bovina (SIGMA®).

3.1.3. Reagentes e Vidraria

Todos os reagentes empregados eram de grau pA. Foi utilizada vidraria comum de laboratório.

3.1.4. Biorreator Contínuo e Membrana

Os testes contínuos foram realizados em Reator CSTR (BM-unimodular, célula de ultrafiltração da Millipore®) e com membrana de celulose regenerada de corte molecular 100kDa (Millipore®).

3.2. Equipamentos

- Agitador Fisaton (Modelo 713D);
- Balança Analítica Shimadzu (Modelo AUW220D);
- Banho Termoestatizado Fanem (Modelo 145);
- Espectrofotômetro Beckman-Coulter (Modelo DU 640);
- Freezer Eletrolux (Modelo FFE 24);
- Oxímetro Digimed (Modelo DM-4)
- pHmetro Tecnal (Modelo Tech 3MP);
- Refrigerador Brastemp (Modelo B/X/PRF36).

3.3. Métodos

Os métodos analíticos empregados neste trabalho, a saber: padronização, preparação, estabelecimento da curva padrão e erro experimental referentes aos reagentes de Somogyi-Nelson; determinação da dosagem e da curva padrão de água oxigenada (H₂O₂); determinação da proteína solúvel (curva-padrão e quantificação de

proteína nas soluções originais das enzimas principais: invertase e glicose oxidase); estão descritos no Anexo I.

3.3.4. Atividade experimental.

- Determinação do erro experimental da técnica de dosagem de glicose (Somogyi-Nelson);
- Determinação do erro experimental da técnica de dosagem de H_2O_2 ;
- Determinação do erro experimental da técnica de dosagem proteína (albumina);
- Quantificação de proteína na solução original de invertase;
- Caracterização da invertase (determinação da atividade enzimática frente ao pH e temperatura, determinação da Entalpia (ΔH) e da Energia de Ativação; testes para definição de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, em função da concentração de sacarose; efeito do pH e temperatura na estabilidade da Invertase);
- Teste de bioconversão em reator descontínuo, utilizando a invertase para a conversão total da sacarose em açúcar invertido (glicose e frutose);
- Caracterização da Glicose Oxidase (determinação da atividade enzimática frente ao pH e temperatura, determinação da Entalpia (ΔH) e da Energia de Ativação; testes para definição de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, em função da concentração de glicose; testes para conversão total de glicose em ácido glicônico; efeito do pH e temperatura na estabilidade da GOD);
- Caracterização da Catalase (testes para verificação de pH e concentração enzimática frente às concentrações de H_2O_2).
- Testes de bioconversão em reator descontínuo, utilizando as enzimas Glicose Oxidase e Catalase para conversão total de glicose em ácido glicônico.
- Testes de bioconversão em reator descontínuo (adição seqüencial de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase para conversão total da sacarose em frutose e ácido glicônico.
- Teste de bioconversão em reator descontínuo (adição simultânea de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase para conversão total da sacarose em frutose e ácido glicônico.
- Teste de bioconversão em reator contínuo com membrana (adição simultânea de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase para conversão total da sacarose em frutose e ácido glicônico.

3.3.5. Caracterização da Invertase.

Colocou-se em um Becker, com capacidade de 250mL, 108mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH4,6) em banho-maria a 37°C. Após 10 minutos, dissolveu-se sob agitação ($\approx 100\text{rpm}$) 12g de sacarose. Após 5 minutos exatos, adicionou-se 12mL de solução aquosa de invertase (1,11 U/mg de proteína). Disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 0,5mL do meio reacional a intervalos de 1 minuto até completar o tempo total de reação de 6 minutos. Imediatamente antes de adicionar-se a enzima, tomou-se uma alíquota de 0,5mL da solução de sacarose para medir o ART inicial (tempo zero). Um tubo branco foi feito com 1 mL de água destilada.

As alíquotas foram colocadas em tubos de Folin-Wu contendo 0,5mL de água e 1 mL de mistura reativa de Somogyi (de acordo com o item 3.3.1.3), sendo, em seguida, imersos em banho-fervente por exatos 10 minutos. Resfriaram-se, a seguir, em banho de gelo. Adicionaram-se 2,0mL do reagente Somogyi III aos tubos, que foram agitados para expelir os gases. Completou-se com água destilada até a marca de 25mL. Homogeneizou-se bem e após 20 minutos em repouso, as amostras foram lidas a 540nm. O ART formado foi calculado através da curva padrão descrita no Anexo I (item 7.1.4). A unidade de atividade da invertase foi definida como sendo a quantidade em miligramas de ART formados por minuto por mL de meio reacional nas condições de ensaio.

3.3.5.1. Efeito do pH na atividade da invertase.

De acordo com o método descrito em 3.3.5., realizaram-se testes em pH: 3,5; 4,0; 4,6; 5,0; 5,5 ou 6,0.

3.3.5.2. Efeito da temperatura na atividade da invertase.

De acordo com o método descrito em 3.3.5., realizaram-se testes variando a temperatura, sendo os testes realizados em pH 4,6 e 5,0, por serem os que proporcionaram as melhores atividades enzimáticas da invertase. As temperaturas utilizadas foram: 30°C, 37°C, 40°C e 45°C.

3.3.5.3. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$).

Para o cálculo das constantes cinéticas, variou-se a concentração de sacarose no intervalo de 4,0-50,0 mM, sendo as condições de ensaio idênticas às descritas em 3.3.5.

3.3.5.4. Determinação da conversão total de sacarose em ART.

Estes testes foram realizados para definir a quantidade de invertase necessária para converter totalmente uma certa concentração de sacarose em ART. Devido a isto, o volume de solução-tampão acetato 0,01M (pH4,6) e solução de invertase variaram conforme a necessidade, totalizando sempre 120 mL de meio reacional. As concentrações de sacarose também foram variadas: 2, 4, 8, 16, 32 e 64 g/L (Tabela 1).

Foram retiradas alíquotas de 0,5 mL nos tempos: 0 (imediatamente antes da adição de invertase), 20, 40 e 60 minutos; de forma que, o desejado foi a conversão total de sacarose em até 1 hora de reação. As amostras foram colocadas em banho-fervente para a inativação enzimática e, posteriormente, seguiu-se o método de Somogyi-Nelson, para a determinação dos açúcares redutores totais (Item 7.1. do Anexo I).

Tabela 1. Concentrações de sacarose e atividades invertásicas específicas empregadas nos testes para a determinação da conversão total de sacarose em açúcar invertido (glicose e frutose).

<i>Concentração de sacarose (g/L)</i>	<i>Sacarose (mg)</i>	<i>Solução-tampão (mL)</i>	<i>Solução de invertase (mL)</i>	<i>Atividade específica (U/mg de proteína)</i>
2	240	108	12	1,11
4	480	96	24	4,44
8	960	96	24	8,88
16	1920	96	24	17,8
32	3840	96	24	17,8
64	7680	107	13	35,6

3.3.5.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase.

Para avaliar a estabilidade da invertase em pH 4,5 e 37°C, condições ótimas para a sua atividade catalítica, deixaram-se soluções da enzima nestas condições por um período máximo de 30h. Preparou-se 6 recipientes contendo 12 mL de solução de invertase diluída 5000 vezes (0,185 U/mg de proteína), em solução-tampão acetato 0,01 M e pH 4,5. Após os tempos: 0 (zero); 0,5h; 1h; 10h; 20h e 30h, dosou-se a atividade enzimática residual, nas condições do ensaio-padrão (item 3.3.5.). As soluções enzimáticas ficaram em banho-maria aquecido a 37° C durante o tempo necessário para o início de cada teste.

3.3.6. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD).

Colocou-se em um Becker, com capacidade de 250mL, 125mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH 5,1) em banho-maria a 37°C. Do início ao fim dos testes foi borbulhado ar, já que a glicose oxidase necessita de O₂ para realizar a catálise. Uma

alíquota de 1 mL foi retirada para ser usada como o branco. Após 10 minutos, dissolveu-se sob agitação (100rpm) 0,15g de glicose. Imediatamente antes de adicionar-se a enzima, tomou-se uma alíquota de 1mL da solução de glicose para medir a H_2O_2 inicial (tempo zero). Após 5 minutos exatos, adicionou-se 25mL de solução aquosa de glicose oxidase (Sigma®, Lote 010k37761: 180U). Disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 1mL do meio reacional a intervalos de 10 minutos até completar o tempo total de reação de 60 minutos (1h). As alíquotas, assim que retiradas, foram colocadas em banho-fervente para bloquear a reação. Ao final do teste, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm para determinar a H_2O_2 formada. A unidade de atividade da glicose oxidase (v_{GOD}) foi definida como sendo a quantidade em miligramas de H_2O_2 formada por minuto por mL de meio reacional nas condições de ensaio (Anexo 7.2.).

O O_2 dissolvido, da ordem de 4mg/L, foi lido com oxímetro em cada um dos tempos de retirada de alíquota.

3.3.6.1. Determinação da atividade enzimática da GOD.

De acordo com método descrito em 3.3.6, o teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental.

3.3.6.2. Efeito do pH na atividade da GOD.

De acordo com método descrito em 3.3.6., realizaram-se testes em pH: 4,0; 4,5; 5,0; 5,1 ou 5,5.

3.3.6.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD.

De acordo com o método descrito em 3.3.6., realizaram-se testes variando a temperatura, mantendo-se o pH 5,1. As temperaturas utilizadas foram: 30°C, 37°C, 40°C e 45°C.

3.3.6.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$).

Para o cálculo das constantes cinéticas, variou-se a concentração de glicose no intervalo de 4-20 mM, sendo as condições de ensaio idênticas às descritas em 3.3.6.

3.3.6.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD.

Preparou-se 6 balões de 25ml de solução de GOD (180U), em solução-tampão acetato 0,01M e pH 4,5. Após os tempos: 0 (zero); 0,5h; 1h; 10h; 20h e 30h, foram realizados testes para a dosagem da atividade enzimática residual, nas condições do ensaio-padrão (item 3.3.6.). As soluções enzimáticas ficaram em banho-maria aquecido a 37°C durante o tempo necessário para o início de cada teste.

3.3.7. Caracterização da Catalase.

3.3.7.1. Efeito da concentração de Catalase.

Os primeiros testes foram realizados para verificar qual era a melhor concentração de catalase a ser utilizada na degradação da água oxigenada. Estes consistiram em colocar em um Becker, com capacidade de 250mL, 100mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH4,5) em banho-maria a 37°C. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para ser usada como o branco. Uma solução de 30 mL de H₂O₂ (6,12g/L) foi adicionada ao meio reacional no tempo zero. Após 5 minutos, retirou-se uma alíquota de 1mL do meio (concentração inicial de H₂O₂). Adicionou-se 20 mL de solução de catalase (1mg, 2mg e 10mg, respectivamente em cada teste) e disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 1mL do meio reacional a intervalos de 5 minutos até completar o tempo total de reação de 30 minutos. As alíquotas, assim que retiradas, foram colocadas em banho-fervente para bloquear a reação. Ao final do teste, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm para determinar a H₂O₂ consumida.

3.3.7.2. Efeito da concentração de Catalase (método modificado).

Frente à baixa conversão de água oxigenada em água e oxigênio, realizaram-se testes com o procedimento modificado. Os testes consistiram em se colocar em um Becker, com capacidade de 250mL, 100mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH4,5) em banho-maria a 37°C. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para ser usada como branco. Uma alíquota de 6mL de uma solução de 30 mL de H₂O₂ (6,12g/L) foi adicionada ao meio reacional no tempo zero. A cada 5 minutos foram adicionadas alíquotas de 6mL até que em 20 minutos, todo o conteúdo de 30mL havia sido adicionado ao meio. O mesmo foi feito com a catalase, sendo 10mg diluídos em 20 mL (alíquotas de 4mL adicionadas a cada 5 minutos). Após a primeira adição de catalase, disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 1mL do meio reacional a intervalos de 5 minutos até completar o tempo total de reação de 30 minutos. As alíquotas, assim que retiradas, foram colocadas em banho-fervente para bloquear a reação. Ao final do teste, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm para determinar a H₂O₂ consumida.

Um experimento servindo como branco também foi realizado e consistiu em se usar apenas a catalase, sem o substrato, retirando e tratando as alíquotas da mesma forma que o ensaio anterior, para verificar a possível absorção de luz UV por parte da enzima.

3.4. Bioconversão em reator descontínuo utilizando Glicose Oxidase e Catalase.

Os testes consistiram em se colocar em um Becker, com capacidade de 250mL, um volume determinado de solução-tampão acetato 0,01M (pH4,5) em banho-maria a 37°C. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para ser usada como branco. Dissolveu-se a glicose (1, 2, 4, 8 ou 16g/L) e retirou-se uma alíquota de 1mL, sendo o tempo zero. Adicionou-se a GOD diluída em 10mL de tampão e disparou-se o cronômetro, passando-se a retirar alíquotas de 1mL do meio reacional a intervalos de 20 minutos até completar o tempo total de reação de 120 minutos. Imediatamente após a adição de GOD, foram adicionados 2mg de catalase (10mg diluídos em 10mL de tampão divididos em 5 frações de 2mL e adicionadas a cada 20 minutos). As alíquotas, assim que retiradas, foram colocadas em banho-fervente para bloquear a reação. Ao final do teste, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm para determinar a H₂O₂ residual e em seguida, as alíquotas foram submetidas ao teste de Somogyi-Nelson e lidas a 540nm para determinar o consumo de ART. Os parâmetros utilizados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros utilizados nos testes utilizando GOD e catalase para a conversão total de glicose em ácido glicônico.

<i>Concentração de glicose (g/L)</i>	<i>Solução-tampão</i>	<i>GOD (U / volume diluído em mL)</i>	<i>Catalase (mg / volume diluído em mL)</i>	<i>Volume final (mL)</i>
1	105	1000 / 25	10 / 20	150
2	55	1000 / 10	10 / 10	75
4	55	1000 / 10	10 / 10	75
8	55	1000 / 10	10 / 10	75
16	55	2000 / 10	10 / 10	75

Também foram realizados testes utilizando os mesmos parâmetros acima, entretanto, sem adição do substrato, com a finalidade de avaliar a interferência das enzimas nas leituras em 240nm e 540nm.

3.5. Bioconversão em reator descontínuo (adição sequencial de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase.

Colocou-se em um béquer, com capacidade de 250 mL, 96mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH 4,6), o qual foi deixado em banho-maria a 37°C. A seguir, dissolveu-se, sob agitação (100rpm), 3,84 g de sacarose, perfazendo a concentração inicial de 32g/L. Após 5 minutos exatos, adicionaram-se 24 mL de solução aquosa de invertase (88,7 U/mg de proteína). Um cronômetro foi acionado e, a cada 10 minutos, 1mL de meio foi retirado para fins analíticos (dosagem dos açúcares redutores totais

formados). O tempo total de reação foi de 30min, o suficiente para a hidrólise total da sacarose. Imediatamente antes da adição da enzima, no tempo zero da reação, tomou-se uma alíquota de 1mL para verificar a quantidade inicial de açúcares redutores totais (ART).

A seguir, tomaram-se 55mL do hidrolisado, que foram colocados em um Becker de 250mL de capacidade. Adicionaram-se 20mL de uma solução contendo glicose oxidase (2000 U) e catalase (393 U). A cada 20 minutos foram retiradas alíquotas de 1mL para fins analíticos (dosagem de ART e de água oxigenada). O tempo total de reação foi de 120 minutos.

3.6. Bioconversão em reator descontínuo (adição simultânea de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase.

Colocou-se em um Becker, com capacidade de 250 mL, 61mL de uma solução-tampão 0,01M (pH 4,6) e deixou-se em banho-maria a 37°C. Após 5 minutos, dissolveu-se, sob agitação (100rpm), 3,84g de sacarose, perfazendo a concentração inicial de 32g/L. Após 5 minutos exatos, adicionou-se 59mL de solução tamponada das enzimas [invertase (88,7 U/mg de proteína), glicose oxidase (2000 U) e catalase (786 U)] e acionou-se um cronômetro. A cada 20 minutos foi tomada alíquota de 1mL de meio, até completar o tempo total de reação de 120 minutos, para fins analíticos. O tempo zero da reação, consistiu em se tomar alíquota de 1mL imediatamente antes da adição da solução contendo as enzimas.

3.7. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.

Os testes contínuos foram realizados em Reator CSTR (BM-unimodular, célula de ultrafiltração da Millipore®) no qual uma membrana de corte molecular de 100 kDa foi fixada na base do reator. O sistema contou com entrada de ar e o volume do meio reacional foi fixado em 300 mL. As enzimas foram adicionadas simultaneamente e o volume de saída foi recolhido de hora em hora em frascos de Erlenmeyer. Foram usadas 80mg de catalase e 8000U de GOD em todos os testes, entretanto, a quantidade de invertase foi variada, bem como a temperatura (30°C, 37°C, 40°C e 45°C). Foram analisadas a quantidade de água oxigenada residual (em 240nm) e a concentração de ART (540nm) das amostras retiradas.

3.7.1. Teste 1

O teste inicial foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 88,7 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C.

3.7.2. Teste 2 (Aumento do tempo de residência)

O segundo teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 88,7 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C. A vazão de alimentação e de saída foram reduzidas para promover o aumento do tempo de residência.

3.7.3. Teste 3 (Redução da concentração de invertase)

O terceiro teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 44,4 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C.

3.7.4. Teste 4 (Redução da concentração de invertase)

O quarto teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 22,2 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C.

3.7.5. Teste 5 (Redução da concentração de invertase)

O quinto teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 11,1 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C.

3.7.6. Teste 6 (30°C)

O sexto teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 11,1 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 30°C.

3.7.7. Teste 7 (40°C)

O sétimo teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 11,1 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 40°C.

3.7.8. Teste 8 (45°C)

O oitavo teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 11,1 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 45°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimentos Realizados.

4.1.1. Determinação da atividade enzimática da Invertase.

O teste foi realizado em quintuplicata a fim de se avaliar o erro experimental, de acordo com o item 3.3.5. A atividade enzimática é definida pela inclinação da reta (a) em $y = ax + b$, de forma que a atividade encontrada (v_1) foi de 0,0573mg de ART formado por minuto e por mL de meio reacional (Figura 5). Considerando a diluição final da enzima (50.000 vezes), a atividade específica foi de 924,2 mg de ART formados/mL.min.mg de proteína. O desvio-padrão encontrado foi de 0,00323 mg/min.mL de ART e o coeficiente de variação, 5,6%.

Figura 1. Variação da concentração de ART em função do tempo. A equação de regressão linear é: $y = 0,0573x + 0,0096$ ($r = 0,998$), na qual y é a concentração de ART em mg/mL e o x , tempo de reação.

4.1.2. Efeito do pH na atividade da invertase.

Através da Figura 2, pode-se notar que o pH 5,0 foi o que proporcionou a melhor atividade invertásica a 37°C. Entretanto, o pH ótimo descrito na literatura para a invertase é 4,6 (VITOLO, 2004), pH 4,5 e 5,0 para invertase solúvel e imobilizada, respectivamente (MILOVANOVIĆ, et al., 2007). Por isso, nos testes variando a temperatura utilizaram-se os dois valores de pH, 4,6 e 5,0.

Figura 2. Efeito do pH sobre a atividade da invertase.

A atividade da invertase solúvel (Bioinvert da Quest International®) foi superior em pH 4,5, sendo que foram realizados testes variando o pH de 3,0 a 6,5 (0,5 em 0,5

unidades de pH). Entretanto, utilizando a invertase insolúvel (imobilizada) o pH ótimo estaria em torno de 5,0 (TOMOTANI, 2002).

4.1.2. Efeito da temperatura na atividade da invertase.

Nas Figuras 3 e 4, apresentam-se a variação da atividade invertásica frente à temperatura nos valores de pH 4,6 e 5,0, respectivamente. Em ambas as situações, observa-se que a atividade invertásica variou linearmente com o aumento da temperatura. De acordo com MILOVANOVIĆ et al. (2007), a temperatura ótima para invertase solúvel foi de 60°C, e para DIZGE et al. (2008), foi de 55 °C. Entretanto, neste trabalho, escolheu-se 37°C para compatibilizar com a termoestabilidade da GOD e catalase, visando ao uso simultâneo das enzimas.

O comportamento de aumento da atividade invertásica, com o aumento da temperatura, deve-se ao fato das enzimas industriais (caso da Quest International®) terem em sua composição substâncias coadjuvantes (por exemplo: polietilenoglicol), que conferem maior termorresistência (TOMOTANI, 2002).

Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade da Invertase, sendo o pH do meio reacional igual a 4,6. O tempo de reação foi fixado em 6 minutos. A equação de regressão linear é: $v_i = 0,0024T - 0,033$ ($r=0,9995$).

Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade da Invertase, sendo o pH do meio reacional igual a 5,0. O tempo de reação foi fixado em 6 minutos. A equação de regressão linear é: $v_I = 0,0023T - 0,029$ ($r=0,995$).

Da Tabela 3, observa-se, claramente, que no intervalo 30 °C - 45 °C não ocorreu a possível interrelação pH-temperatura e nem o pH causou qualquer tipo de interferência na atividade invertásica.

Tabela 3. Atividade enzimática da Invertase em função da variação de temperatura (pH 4,6 e pH5,0).

Temperatura	v_I^* (pH4,6)	v_I^* (pH5,0)
30	0,0403	0,0418
37	0,0573	0,0551
40	0,0655	0,0645
45	0,0768	0,0763

*mg de ART/min.mL

Para calcular a energia de ativação (E_a) e a Entalpia de reação (ΔH), utilizou-se o método convencional de Arrhenius, representado pelas Equações:

$$\text{Log } v_I = \frac{E_a}{2,303 \times R} \times \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\Delta H = E_a - R \times T \quad (\text{Eq. 2})$$

Os dados utilizados são mostrados na Tabela 4 e a correspondente reta de regressão, apresentada na Figura 5.

Figura 5. Gráfico convencional de Arrhenius para a determinação da energia de ativação (E_a) da hidrólise da sacarose pela invertase. A equação de regressão linear é:

$$\text{Log} v_i = -1767,8(1/T) + 4,454 \quad (r = 0,990).$$

Tabela 4. Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (E_a) da reação catalisada pela invertase.

T (°C)	T (K)	v_i (mgART/min.mL)	$1/T$ (K ⁻¹)	$\text{Log } v$
30	303	0,0403	0,0033	-1,395
37	310	0,0573	0,00323	-1,241
40	313	0,0655	0,0032	-1,184
45	318	0,0768	0,00314	-1,115

Os valores calculados para Entalpia e a Energia de Ativação foram: $\Delta H = 33,8$ kJ/mol e $E_a = 31,3$ kJ/mol. Estes estão de acordo com os descritos na literatura. TOMOTANI (2002), por exemplo, determinou estes parâmetros para invertase de fabricantes diferentes: Bioinvert® e Fluka®. Os valores encontrados foram: $\Delta H = 35$ kJ/mol e $E_a = 37$ kJ/mol; e $\Delta H = 55,2$ kJ/mol e $E_a = 34,99$ kJ/mol, respectivamente. MILOVANOVIĆ (2007) determinou a E_a para invertase de parede de levedura como sendo igual a 32 kJ/mol.

4.1.3. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\text{áx}}$).

As atividades invertásicas, frente a cada concentração de sacarose, são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Variação da atividade invertásica frente a diferentes concentrações iniciais de sacarose.

Sacarose (mM)	v_I (mgART/mL.min)	$1/[substrato]$	$1/v_I$
4	0,00910	0,250	110
5	0,0108	0,200	92,6
6	0,0125	0,167	80,0
8	0,0173	0,125	57,8
10	0,0194	0,100	51,6
15	0,0248	0,0667	40,3
20	0,0325	0,0500	30,8
30	0,0317	0,0333	31,6
40	0,0438	0,0250	22,8
50	0,0502	0,0200	19,9

Figura 6. Atividade da invertase em função da concentração de sacarose.

Na Figura 6 apresenta-se a variação da atividade invertásica com a concentração de sacarose. O perfil hiperbólico da curva obtida confirma que a cinética da invertase, segue o modelo de Briggs-Haldane.

Elaborando-se um gráfico do tipo $1/v_I = f(1/S)$, obtém-se uma reta, da qual as constantes cinéticas são calculadas (Figura 7).

Figura 7. Gráfico seguindo o método convencional de Lineweaver-Burk para a determinação das constantes cinéticas da invertase. A equação de regressão linear é:

$$1/v_i = 387(1/s) + 13,6 \quad (r = 0,997).$$

Da equação da reta mostrada na Figura 7, calcula-se para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ os valores 28,5mM e 0,074 mg de ART/min.mL de meio reacional, respectivamente. O valor de K_m encontrado é compatível com os valores descritos na literatura, os quais se situam entre 26mM e 40mM para invertase (VITOLO, 2004; TOMOTANI, 2002; MILOVANOVIĆ et al. (2007); e DIZGE et al. (2008).

4.1.4. Determinação da conversão total de sacarose em ART.

Pela Tabela 6, pode-se constatar que quanto maior a concentração de sacarose usada, maior a quantidade de enzima foi necessária para a conversão total em ART.

Tabela 6. Atividade específica da invertase utilizada para de determinação da conversão total de sacarose em ART.

Concentração de sacarose (g/L)	Atividade específica (U/mg de proteína)
2	1,11
4	4,44
8	8,88
16	17,8
32	17,8
64	35,6

De acordo com a tabela 7 e as Figuras 8 e 9, pode-se observar que em 40 minutos de reação toda a sacarose foi convertida em ART, exceto na concentração de 2g/L que atingiu no mesmo tempo uma conversão superior a 80%. Porém, a conversão completa ocorreu após 1 hora de reação (Fig. 8).

Tabela 7. Porcentagem (%) de Conversão da Sacarose em ART no decorrer da reação.

Tempo (min)	2g/L	4g/L	8g/L	16g/L	32g/L	64g/L
0	0	0	0	0	0	0
20	52,90	75,60	91,50	99,80	87,2	75,2
40	84,70	100	100	100	100	100
60	100	100	100	100	100	100

Figura 8. Porcentagem (%) de Conversão da Sacarose em ART no decorrer da reação, para as concentrações iniciais de sacarose iguais a: 2g/L(◆), 4g/L(■) e 8g/L(▲).

Figura 9. Porcentagem (%) de Conversão da Sacarose em ART no decorrer da reação, para as concentrações iniciais de sacarose iguais a: 16g/L(◇), 32g/L(*) e 64g/L(○).

Do exposto, depreende-se que as condições de hidrólise descritas no item 3.3.5.4, permitiram alcançar o objetivo de se realizar a reação em até 1 hora. Este tempo total de reação foi escolhido com base no fato da invertase ser usada junto com a glicose

oxidase e catalase (enzima auxiliar para decompor H_2O_2). Como a glicose oxidase é susceptível à inibição pela água oxigenada (TOMOTANI et al., 2005) - um dos produtos resultantes da oxidação da glicose - e a catalase precisa de um tempo para decompô-la, então a reação de hidrólise deve ser controlada.

4.1.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase.

Estes testes foram realizados para avaliar a estabilidade da invertase em pH 4,5 e 37°C, condições ótimas para a sua atividade catalítica. Para isso, deixaram-se soluções da enzima nestas condições por um período máximo de 30h. Os resultados são apresentados na Figura 10 e na Tabela 8.

Figura 10. Estabilidade da invertase mantida em pH 4,5 e 37°C por um período total de 30h.

Tabela 8. Atividade invertásica residual, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.

<i>Testes (h)</i>	<i>v_i residual (mg ART/mL.min)</i>
0	7,55
0,5	7,65
1	7,50
10	7,62
20	5,56
30	5,64

Da Figura 10, observa-se que a atividade invertásica permaneceu praticamente estável até 10h. Após este tempo, observa-se uma diminuição da ordem de 26% (Tabela 9). Este comportamento parece estar relacionado com o fato das moléculas de invertase se agregarem em estruturas supramoleculares com atividades catalíticas diferentes,

quando em solução. A diminuição brusca da atividade residual seria devido à desagregação das referidas estruturas (De QUEIROZ et al, 1996).

4.2. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD).

4.2.1. Determinação da atividade enzimática da GOD.

O teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 9. A atividade enzimática é definida pela inclinação da reta (a) em $y = ax + b$, de forma que a atividade encontrada foi de 0,0011 mg de H_2O_2 formada por minuto e por mL de meio reacional (Figura 11). O desvio-padrão encontrado foi de $7,483 \cdot 10^{-5}$ mg de H_2O_2 /min.mL e o coeficiente de variação, 2,7%.

Figura 11. Variação da concentração de água oxigenada (mg/mL) em função do tempo.

A equação de regressão linear é: $y = 0,0011x - 0,001$ ($r = 0,998$), na qual y é a concentração de água oxigenada e x , o tempo de reação.

Tabela 9. Testes realizados para conversão da glicose em ácido glicônico pela GOD e formação de H_2O_2 (pH 5,1 e 37°C).

Tempo (min)	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Média
0	0	0	0	0	0	0
10	0,0085	0,0066	0,0127	0,0081	0,0094	0,0090
20	0,0157	0,0197	0,0219	0,0224	0,0228	0,0205
30	0,0324	0,0265	0,0339	0,0358	0,0356	0,0328
40	0,0423	0,0405	0,0452	0,0473	0,0548	0,0460
50	0,0528	0,0514	0,0542	0,0598	0,0604	0,0557
60	0,0627	0,0604	0,0633	0,0710	0,0710	0,0657

4.2.2. Efeito do pH na atividade da GOD.

Na Figura 12, apresentam-se os dados referentes à variação da atividade da GOD frente ao pH do meio reacional.

Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade da glicose oxidase.

Tabela 10. Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação do pH; temperatura de 37°C.

pH	v_{GOD} (mg H_2O_2 /mL.min)
4,0	0,0011
4,5	0,0016
5,0	0,0011
5,1	0,0011
5,5	0,0010

Através dos resultados apresentados na Tabela 10 e na Figura 12, pode-se observar que o pH que proporcionou a melhor atividade da glicose oxidase foi 4,5. Como se objetiva uma bioconversão multienzimática, quanto mais próximos forem os pH ótimos das enzimas principais (invertase e glicose oxidase), tanto maior será o rendimento do processo. Na literatura, porém, os valores de pH ótimo atribuídos à GOD são superiores a 4,6. Assim sendo, BAO et al. (2001) e SIMPSON et al. (2007) determinaram como pH ótimo para a GOD, respectivamente, 5,0 e 6,0-8,0.

4.2.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD.

A Figura 13 apresenta os dados encontrados para os testes em pH 5,1 realizados nas temperaturas: 30°C, 37°C, 40°C e 45°C.

Figura 13. Atividade da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura, para um tempo de reação total de 60 minutos.

Tabela 11. Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura.

<i>Temperatura</i>	<i>v_{GOD} (mg H_2O_2/mL.min)</i>
30	0,0009
37	0,0011
40	0,0017
45	0,0021

Assim como ocorrido com a invertase, o aumento da temperatura proporcionou um aumento da atividade enzimática. Apesar de aos 45°C ter ocorrido a maior atividade enzimática, testes com temperaturas superiores não foram realizados, para evitar a desnaturação térmica das enzimas. Lembra-se que a invertase tem sua atividade catalítica diminuída após permanecer por 30 horas a 37 °C (Fig. 10).

Para calcular a energia de ativação (E_a) e a entalpia de reação (ΔH), utilizou-se as equações 1 e 2, respectivamente.

Os dados utilizados são mostrados na Tabela 12 e a correspondente reta de regressão, apresentada na Figura 14.

Figura 14. Logaritmo da atividade da GOD em função do inverso da temperatura para o cálculo da Energia de Ativação (E_a), sendo a equação de regressão linear:

$$\text{Log } v_{\text{GOD}} = -2447(1/T) + 5,02 \quad (r = 0,98).$$

Tabela 12. Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (E_a) da reação catalisada pela glicose oxidase.

$T (^{\circ}\text{C})$	$T(\text{K})$	$v \text{ (U/mL)}$	$1/T \text{ (K}^{-1}\text{)}$	$\text{Log } v$
30	303	0,0009	0,0033	-3,0458
37	310	0,0012	0,0032	-2,9208
40	313	0,0017	0,0032	-2,7696
45	318	0,0021	0,0031	-2,6778

Os valores calculados para E_a e ΔH foram iguais a 44,3 kJ/mol e 46,9 kJ/mol, respectivamente.

4.2.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{\text{máx}}$).

Para a determinação das constantes cinéticas (K_m e $V_{\text{máx}}$) da GOD, executou-se o ensaio-padrão frente a concentrações iniciais de glicose situadas entre 4,0mM e 25,0mM. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13 e Figura 15.

O perfil hiperbólico, da curva da Figura 15, é uma indicação clara que o perfil cinético da GOD segue o modelo de Briggs-Haldane.

Através do método convencional de Lineweaver-Burk (Figura 16), determinaram-se o K_m e o $V_{\text{máx}}$, respectivamente, iguais a 20,3mM e 0,005 mg de H_2O_2 formada/min.mL. O valor de K_m determinado para a GOD situa-se dentro da faixa 18-32mM, descrito na literatura (SIMPSON et al., 2007; HOSHI et al., 2007).

Figura 15. Atividade da GOD em função da concentração de glicose.

Tabela 13. Dados utilizados para o cálculo das constantes cinéticas da GOD, aplicando o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk.

Glicose (mM)	Atividade enzimática (mg/ml.min) $\times 10^{-4}$	1/[substrato]	1/atividade
4	8,00	0,250	1250
8	13,0	0,125	769
10	16,0	0,100	625
15	23,0	0,067	435
20	25,0	0,050	400
25	24,0	0,040	417

Figura 16. Inverso da atividade da GOD em função do inverso da concentração de glicose, conforme método de Lineweaver-Burk. A equação de regressão linear é:

$$(1/v_{GOD}) = 4198,9(1/S) + 207,23 \quad (r = 0,994).$$

4.2.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD.

Da Figura 17, observa-se que a GOD, entre 0 e 30 horas, tem atividade aumentada em cerca de 24% (Figura 17 e Tabela 14). Essa oscilação seria causada por mudanças não profundas da estrutura molecular da enzima. Por exemplo, além das mudanças conformacionais das duas cadeias peptídicas, a ocorrência de óxido-redução do íon ferroso/férrico e do grupo prostético FAD/FADH₂. A oscilação após 0,5h proviria de alguma mudança estrutural reversível mais brusca. Este dado é interessante, pois se for preciso realizar um teste de várias horas de duração, a enzima ainda manterá sua atividade e realizará a conversão eficientemente. Nos estudos de SIMPSON et al. (2007) a GOD utilizada, de *Penicillium sp*, foi estável a 25°C por no mínimo 10 horas, com uma meia-vida de 30 minutos a 37°C sem qualquer estabilização prévia.

Figura 17. Estabilidade da GOD mantida em pH4,5 e 37°C por um período total de 30h.

Tabela 14. Atividade residual da GOD, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.

Testes (h)	v_{GOD} residual (mg de H_2O_2 formado/ min.mL)
0	0,14
0,5	0,12
1	0,13
10	0,13
20	0,15
30	0,17

4.3. Caracterização da Catalase.

Na reação de conversão da glicose em ácido glicônico ocorre, também, a formação de H₂O₂, que em concentração superior a 1,22mM (0,0415mg/mL) inibe a ação da glicose oxidase (TOMOTANI, 2005). Por esta razão, a catalase é utilizada no

processo para degradar o peróxido de hidrogênio (água oxigenada) em H_2O e O_2 , de forma que assim a reação prossegue, tendo, ainda, como vantagem a oxigenação necessária para o desempenho catalítico da GOD.

Os valores das absorbâncias encontradas foram colocados na equação da reta de padronização da H_2O_2 (de acordo com o item 3.3.2.2.): $y = 1,65530x + 0,00424$ ($r = 0,99998$).

4.3.1. Efeito da concentração de Catalase.

Os primeiros testes foram realizados para verificar qual era melhor concentração de catalase a ser utilizada na degradação da água oxigenada. No teste utilizando 1mg de catalase para a degradação de 6,12 g/L de água oxigenada, a concentração de H_2O_2 manteve-se elevada (Figura 18), acima do limite desejado (0,0415 mg/mL ou 6,23 mg em 150mL). Por isso, outros testes foram feitos com concentrações mais elevadas da enzima.

Figura 18. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 1mg de catalase em função do tempo, (pH 4,5 e 37°C).

No teste utilizando 2mg de catalase para a degradação de 6,12g/L de água oxigenada, a concentração de H_2O_2 ainda manteve-se elevada (Figura 19), razão pela qual se utilizou 10mg de catalase no teste seguinte.

Figura 19. Degradação da H₂O₂ (6,12g/L) com 2mg de catalase em função do tempo, (pH 4,5 e 37°C).

Como apresentado na Figura 20, mesmo utilizando-se a concentração de 10mg de catalase, ou seja, cinco vezes mais catalase, a concentração residual de água oxigenada foi elevada, havendo a necessidade de se modificar convenientemente o procedimento. Por isso, um novo método foi formulado e descrito em 4.3.2.

Figura 20. Degradação da H₂O₂ (6,12g/L) com 10mg de catalase em função do tempo, (pH 4,5 e 37°C).

4.3.2. Efeito da concentração de Catalase (método modificado).

Conforme dados da literatura (SCOTT, 1975), a catalase sofre auto-inativação, quando a água oxigenada está em excesso no meio reacional, e possui íon metálico em sua estrutura. Este último fato permite prever que a enzima pode absorver luz na faixa

do ultravioleta, inclusive a 240nm, que é o comprimento de onda para leitura direta da concentração de água oxigenada.

Nas Figuras 21 e 23 são mostradas as curvas de absorção a 240nm da solução tamponada (pH=4,5 e pH=7,0), contendo 10mg de catalase, enquanto que nas Figuras 22 e 24 são apresentadas as concentrações de água oxigenada após o desconto da absorção devida à catalase.

Do exposto, nota-se claramente que o procedimento modificado – descrito em 3.3.7.2. – foi adequado para corrigir o efeito de absorção promovido pela catalase. Diante disso, estabeleceu-se que para todo ensaio multienzimático, exceto no caso do processo contínuo, fosse feito um “branco” – só com catalase – para corrigir a absorbância lida a 240nm referente à água oxigenada.

Figura 21. Absorção de luz em $\lambda=240\text{nm}$ pela catalase em função do tempo, em pH 4,5 e 37°C.

Figura 22. Degradação da H_2O_2 (6,12g/L) com 10mg de catalase em função do tempo, em pH 4,5 e 37°C. Adição de substrato e enzima a cada 5 minutos.

Figura 23. Absorção de luz UV pela catalase em função do tempo, em pH 7,0 e 37°C.

Figura 24. Degradação da H₂O₂ (6,12g/L) com 10mg de catalase em função do tempo, em pH 7,0 e 37°C. Adição de substrato e enzima a cada 5 minutos.

4.4. Bioconversão em reator descontínuo utilizando Glicose Oxidase e Catalase.

Neste estudo, procurou-se estabelecer e otimizar a oxidação da glicose (1g/L, 2g/L, 4g/L, 8g/L e 16g/L) em ácido glicônico, usando a GOD e a catalase simultaneamente. O procedimento está descrito no item 3.4.

Na Tabela 15 são mostrados os teores de ART e de água oxigenada nas amostras retiradas de 20 em 20 minutos, até completar 120 minutos de reação total.

Tabela 15. Quantidade de ART (mg em 150mL) e de H₂O₂ (mg/mL) presente nas amostras da reação de oxidação da glicose em processo descontínuo.

Tempo(min)	Concentração da solução de sacarose				
	1g/L	2g/L	4g/L	8g/L	16g/L
0	154/0	127/0	313/0	564/0	1,15 x10 ³ /0
20	129/0,0254	56,5/9,0x10 ⁻³	215/0,0720	318/0,163	401,2/0,183
40	94,6/0,0400	30,1/5,0 x10 ⁻³	84,3/0,0900	165/0,200	178/0,265
60	59,0/0,0452	19,8/1,0 x10 ⁻³	8,5/0,0990	135/0,225	74,3/0,400
80	35,6/0,0424	0/0	0/0,100	98,6/0,253	54,0/0,451
100	28,0/0,0125	0/0	0/0,0800	61,0/0,265	43,0/0,456
120	5,0/0	0/0	0/0,0400	21,2/0,266	0/0,450

*O primeiro e o segundo números correspondem aos teores de ART e H₂O₂, respectivamente.

Os dados da Tabela 15 foram lançados em gráficos, relacionando a concentração da espécie (ART e H₂O₂) com o tempo de reação, resultando as Figuras 25-28.

Figura 25. Consumo de glicose (medido como ART residual) em função do tempo, usando GOD e catalase. Solução de glicose: 1g/L (◇), 2g/L (*) e 4g/L(●).

Figura 26. Consumo de glicose (medido como ART residual) em função do tempo, usando GOD e catalase. Solução de glicose: 8g/L (▲) e 16g/L (□).

Figura 27. Água oxigenada residual resultante da ação da GOD e catalase sobre soluções de glicose: 1g/L (◇), 2g/L (■) e 4g/L (▲).

Figura 28. Água oxigenada residual resultante da ação da GOD e catalase sobre soluções de glicose: 8g/L (◆) e 16g/L (□).

Frente aos resultados apresentados, observa-se que o sistema GOD/catalase foi eficiente na oxidação da glicose, uma vez que a quantidade de ART residual após 120 minutos ficou entre 0 e 3,5% da quantidade existente no começo da reação. A concentração de água oxigenada residual após 120 minutos de reação dependeu da concentração inicial da solução de glicose utilizada, ficando no intervalo de 0 a 13mM.

Considerando que o limite superior do intervalo citado é cerca de dez vezes maior que a concentração inibitória da água oxigenada sobre a GOD – 1,22mM,

segundo TOMOTANI et al. (2005) – dever-se-ia esperar um menor grau de oxidação da glicose à medida que a concentração inicial de glicose aumentasse. Claramente, isto não foi observado, uma vez que o consumo de ART foi total, quando se usou a solução de glicose de concentração inicial igual a 16g/L, e a concentração de água oxigenada residual foi de 0,45 mg/mL (13mM) (Figuras 26 e 28).

Observou-se, no decorrer deste estudo, que o emprego do processo descontínuo para converter concentrações iniciais de glicose superiores a 16g/L, usando o sistema GOD/catalase, não era adequado. A razão técnica mais notória foi a de lidar com a intensa espuma formada durante a reação. O sistema reacional, do modo como foi concebido, propicia tal fenômeno, haja vista o teor de proteínas do meio ser alto – por causa das enzimas GOD e catalase – e a aeração, agitação e geração de oxigênio contínuos. Espera-se contornar essa limitação através do emprego de processos descontínuo-alimentado e contínuo. O primeiro facilitaria o controle da formação de espuma, pelo fato da solução de substrato ser adicionada paulatinamente, de acordo com uma lei de adição pré-fixada. No caso contínuo, além da adição paulatina, há saída de produto concomitante à reação.

4.5. Bioconversão em reator descontínuo (adição seqüencial de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase.

Através dos testes realizados para a conversão total de sacarose em glicose e frutose pela invertase e, para a conversão de glicose em ácido glicônico pela GOD e decomposição da água oxigenada pela catalase, formulou-se um teste que, ao utilizar a sacarose como substrato e adicionando sequencialmente as enzimas, houvesse a formação dos produtos de interesse. Após os 30 minutos do teste, toda a sacarose foi convertida em ART (Figura 29).

Figura 29. Formação de ART em função do tempo devido à hidrólise da sacarose (32g/L) pela invertase.

Assim que a ação da invertase foi finalizada, parte do meio reacional foi utilizado para dar continuidade à conversão da glicose em ácido glicônico. O meio reacional foi então utilizado conforme o item descrito em 3.4., com a diferença que, neste caso, este meio reacional já representava a solução-tampão e o substrato dissolvido. Conforme apresentado na Figura 30, toda a glicose presente no meio reacional foi convertida em ácido glicônico próximo dos 80 minutos de reação com GOD e catalase. A concentração final em ART, da ordem de 50%, foi devida à presença da frutose na solução após concluída a reação de oxidação.

Considerando a relação: $Y = 100 - (X - 50)$, onde Y é a conversão percentual da glicose em ácido glicônico e X é o ART devido à somatória das quantidades de glicose residual e frutose, pode-se avaliar a conversão glicose/ácido glicônico, que neste caso foi 100%, uma vez que $X = 50\%$.

Figura 30. Variação do percentual de ART, em função do tempo, presente no meio de reação, devido à ação da glicose oxidase sobre a glicose. A glicose resultou da hidrólise da sacarose pela invertase.

A concentração de água oxigenada residual ficou dentro do limite não inibitório (1,22mM ou 0,042mg/mL) durante todo o período de reação (Figura 31).

Figura 31. Concentração de água oxigenada residual acumulada no meio durante a reação.

4.6. Bioconversão em reator descontínuo (adição simultânea de enzimas) utilizando: Invertase, Glicose Oxidase e Catalase.

Os resultados deste estudo – conduzido conforme descrito no item 3.6. – mostraram que o rendimento da oxidação da glicose foi da ordem de 85% (Figura 32),

ao passo que a água oxigenada residual, presente no meio reacional, foi mantida, aproximadamente, dentro do limite não inibitório sobre a GOD (Figura 33).

Figura 32. Variação da concentração dos açúcares redutores totais em função do tempo para a conversão sacarose/(frutose + ácido glicônico) com o uso simultâneo das enzimas (invertase, glicose oxidase e catalase).

Observa-se da Figura 32 que a quantidade de ART se acumula no meio reacional até completados 20 minutos de reação, diminuindo a seguir. Este fato demonstra que a hidrólise da sacarose não é etapa limitante do processo. É provável que, o ajuste das atividades (glicose oxidase + catalase) constitua o parâmetro de processo a ser otimizado.

Comparando os protocolos de adição simultânea e sequencial das enzimas, conclui-se que o modo sequencial foi o mais efetivo do que o simultâneo na conversão direta da sacarose em frutose e ácido glicônico. Quando as três enzimas atuam ao mesmo tempo, há a necessidade de se ajustar as quantidades de cada enzima, de modo que a hidrólise da sacarose, a oxidação da glicose e a decomposição da água oxigenada ocorram em velocidades compatíveis. Como se pretende converter soluções de sacarose com concentrações acima de 32g/L, decidiu-se deixar o ajuste fino das atividades de cada enzima para os processos descontínuo-alimentado e contínuo, uma vez que há um limite operacional para o processo descontínuo multienzimático, como já salientado.

Figura 33. Concentração de água oxigenada residual em função do tempo de reação decorrente da conversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico.

4.7. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.

Os testes foram realizados conforme descritos no item 3.7. A quantidade de invertase foi variada, bem como a temperatura (30°C, 37°C, 40°C e 45°C). Foram realizados ao todo oito testes, os quais serão apresentados a seguir.

4.7.1. Teste 1

O teste inicial foi realizado com atividade específica da invertase de acordo com os valores utilizados nas bioconversões descontínuas (seqüencial e simultânea), ou seja, 45,2U/mg de proteína. Entretanto, houve baixa conversão da glicose em ácido glicônico (Figura 34). A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 76,7% de ART (50% frutose + 26,7% de glicose, sendo 23,4% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de apenas 46,7%. A vazão média de saída foi de 216mL/h e a taxa de alimentação (D) foi de 0,72 h⁻¹. Em função do baixo rendimento de ácido glicônico, realizou-se o Teste 2 onde o tempo de residência foi aumentado para que o substrato pudesse ficar mais tempo em contato com as enzimas e, assim, lograr uma conversão maior.

Figura 34. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 1).

4.7.2. Teste 2 (Aumento do tempo de residência)

O segundo teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 45,2 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C. A vazão de alimentação e de saída foram reduzidas para promover o aumento do tempo de residência. A média da porcentagem de ART (tempo de 1 hora a 15 horas) foi de 83,7% de ART (50% frutose + 33,7% de glicose, sendo 16,3% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de apenas 32,6% (Figura 35). A vazão média de saída foi de 96mL/h e o $D=0,32\text{ h}^{-1}$. Mesmo com um tempo de residência aumentado, o rendimento foi inferior ao encontrado no Teste 1. Portanto, ficou evidente que o parâmetro a ser modificado não era o tempo de residência, mas a quantidade de enzimas.

Figura 35. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 2).

4.7.3. Teste 3 (Redução da concentração de invertase)

O terceiro teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 22,6 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C. A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 63,6% de ART (50% frutose + 13,6% de glicose, sendo 36,45% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de 72,9% (Figura 36). A vazão média de saída foi de 160mL/h e o $D=0,53h^{-1}$. Comparado ao teste 2, o teste 3 apresentou rendimento superior. Provavelmente, a conversão executada com maior atividade invertásica, faria com que a sacarose, ao ser hidrolisada com maior velocidade, gerasse uma quantidade de glicose muito elevada, frente à qual a atividade da GOD presente era insuficiente para executar a reação de oxidação com eficiência.

Figura 36. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 3).

4.7.4. Teste 4 (Redução da concentração de invertase)

O quarto teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 11,3 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C. A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 60,7% de ART (50% frutose + 10,7% de glicose, sendo 39,3% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de 78,6% (Figura 37). A vazão média de saída foi de 134mL/h e o $D= 0,44 \text{ h}^{-1}$. A conversão de glicose em ácido glicônico aumentou, em relação ao teste anterior, demonstrando que a redução na concentração de invertase favoreceu o processo. Portanto, no Teste 5, a concentração desta enzima foi reduzida à metade novamente.

Figura 37. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 4).

4.7.5. Teste 5 (Redução da concentração de invertase)

O quinto teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 5,65 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 37°C. A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 58,3% de ART (50% frutose + 8,3% de glicose, sendo 41,7% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de 83,4% (Figura 38). A vazão média de saída foi de 107mL/h e o $D=0,36\text{ h}^{-1}$. A conversão de glicose em ácido glicônico aumentou consideravelmente neste teste, pois passou dos 80% de rendimento. Por ser considerada uma alta taxa de conversão, a atividade de 5,65U/mg de proteína foi mantida nos testes seguintes, realizados a 30°C (teste 6), 40°C (teste 7) e 45°C (teste8).

Figura 38. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 5).

4.7.6. Teste 6 (30°C)

O sexto teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 5,65 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 30°C. A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 66% de ART (50% frutose + 16,0% de glicose, sendo 34,0% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de 68,1% (Figura 39). A vazão média de saída foi de 120mL/h e o $D=0,4\text{ h}^{-1}$. Neste caso, como a temperatura foi reduzida, houve uma queda do rendimento, pois as temperaturas ótimas das enzimas em questão são maiores que 30 °C.

Figura 39. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 6).

4.7.7. Teste 7 (40°C)

O sétimo teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 5,65 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 40°C. A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 63,5% de ART (50% frutose + 13,5% de glicose, sendo 36,5% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de 73,0% (Figura 40). A vazão média de saída foi de 126mL/h e o $D = 0,42 \text{ h}^{-1}$. Apesar do teste ter sido realizado com temperatura superior, e nos testes preliminares o aumento de temperatura aumentava a catálise dos substratos, no caso do reator contínuo, a conversão muito rápida dos reagentes pode levar a uma saturação de substratos para as enzimas seguintes. Uma elevada concentração de glicose, para a quantidade de GOD utilizada, pode saturar a enzima e com isso, ocorre perda de glicose que passa pela membrana, junto com os outros produtos, e não é convertida em ácido glicônico, reduzindo o rendimento do processo. O não estabelecimento do regime estacionário seria consequência do aspecto ressaltado.

Figura 40. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 7).

4.7.8. Teste 8 (45°C)

O oitavo teste foi realizado de acordo com o item 3.7. A atividade específica de invertase utilizada foi de 5,65 U/mg de proteína e a temperatura fixada em 45°C. A média da porcentagem de ART (tempo de 2 horas a 15 horas) foi de 72% de ART (50% frutose + 22% de glicose, sendo 28% de ácido glicônico), ou seja, um rendimento de 56% (Figura 41). A vazão média de saída foi de 122mL/h e o $D = 0,41 \text{ h}^{-1}$. Este teste teve resultado similar ao anterior, pois o aumento de temperatura deve ter acelerado a conversão da sacarose em açúcar invertido, deixando o meio reacional saturado de glicose, acima da capacidade de conversão da GOD. Observa-se o não estabelecimento do estado estacionário (Figura 41).

Figura 41. Percentual de ART na solução de saída do reator com membrana (teste 8).

5. CONCLUSÕES

A invertase e a glicose oxidase apresentaram como pH ótimos 4,6 e 4,5, respectivamente, de forma que pelos valores serem próximos, o pH 4,5 foi adotado para a bioconversão multienzimática, já que a invertase possui uma faixa maior de pH a ser utilizado proporcionando uma boa atividade enzimática.

A temperatura padrão foi mantida em 37°C. Apesar de temperaturas superiores terem sido utilizadas, já que aumentavam as atividades enzimáticas da invertase e da GOD, constatou-se que, no reator contínuo com membrana, temperaturas mais elevadas não foram as que proporcionaram uma maior taxa de rendimento nos produtos de interesse.

Conforme observado nos testes de estabilidade, as reações podem durar até 10 horas sem perda da atividade de ambas as enzimas principais (invertase e GOD).

Apesar de o pH 7,0 proporcionar uma melhor ação catalítica da catalase, por ser seu pH ótimo, esta enzima foi apenas auxiliar, evitando que a GOD fosse inibida pela presença de água oxigenada. Portanto, o pH utilizado respeitou a melhor conversão por parte da invertase e da glicose oxidase.

A catalase e a GOD, como demonstrado, absorvem luz UV em comprimento de onda de 240nm. Portanto, quando foi realizada a medição de H₂O₂, neste mesmo comprimento de onda, subtraiu-se a absorbância correspondente ao que a enzima absorveu, para não houvesse um falso positivo de presença de água oxigenada.

A bioconversão descontínua com adição seqüencial de enzimas mostrou-se capaz de converter 32g/L de sacarose em 16g/L de glicose e, todo este açúcar em ácido glicônico de forma eficiente. A bioconversão descontínua com adição simultânea de enzimas não teve 100% de rendimento.

A bioconversão contínua em reator com membrana (teste 5) apresentou rendimentos superiores a 80%, mostrando-se eficiente na obtenção dos produtos de interesse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEHLE, W. **Enzymes in Industry – Production and Applications**. Wiley-VCH, Weinheim, 2004. 320p.
- ARRUDA, L.M.O., VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.81, p.23-33, 1999.
- BAO, J.; FURUMOTO, K.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. **Biochemical Engineering Journal** 8 (2001) 91–102.
- BENTLEY, I.S., WILLIAMS, E.C. Starch conversion. In: GODFREY, T., WEST, S., Eds. **Industrial Enzymology**. 2nd Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, 1996. p. 339-356.
- BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. 3rd Ed. Weinheim, Berlin, Verlag Chemie, 1984. v.2, 539p.
- BIELLA, S.; PRATI, L.; ROSSI, M. Seletive oxidation of D-glucose on gold catalyst. **J. Catal.**, v.206, p.242-247, 2002.
- 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.**, v.18, n (1/3), p.69-80, 2002
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Balanço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Produção e Agroenergia – Brasília: MAPA/SPAEE, 2007.
- BORZANI, W. Cinética de Reações Enzimáticas. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial – Fundamentos**. 4 vols. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. V. 1, pp. 197-216.
- 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**. Weinheim, Verlag Chemie, 1984. v.6.
- CRUEGER, A; CRUEGER, W. Glucose transforming enzymes. In: FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and Biotechnology**. 2.ed. London, UK, Elsevier Applied Science, 1990.
- CSÓKA, B.; KOVÁCS, B.; NAGY, G. Scanning Eletrochemical Microscopy inside the Biocatalytic Layer of Biosensors, Investigation of a Double Fuction Complex Multienzyme Reaction Layer. **Electroanalysis** 2003, 15, No. 15-16 1 2003 WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim DOI: 10.1002/elan.200302819.

- CURCIO, S., CALABRÒ, V., IORIO, G. Monitoring and control of TMP and feed flow rate pulsatile operations during ultrafiltration in a membrane module. **Desalination**, v.146, p. 217-222, 2002.
- DATAGRO. In: Agrofolha, Caderno Especial do Jornal Folha de São Paulo, de 02/12/2008, p. B12.
- DE QUEIROZ, A.A.A.; VITOLO, M.; DE OLIVEIRA, R.C.; HIGA, O.Z. Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. **Radiation Physics and Chemistry**, Volume 47, Issue 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.**, v.84, p.767-777, 2002.
- DIZGE, N.; GUNAYDIN, O.; YILMAZ, F.; TANRISEVEN, A. Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matrix. **Biochemical Engineering Journal**. Volume 40, Issue 1, Pages 64-71 (2008).
- 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.**, v.12, n.1, p.22-24, 1996.
- ERZINGER, G.S., VITOLO, M. *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.129, p.787-794, 2006.
- FANG, M., GRANT, P.S., McSHANE, M.J., LVOV, Y.M. Magnetic bio/nanoreactor with multilayer shells of glucose oxidase and inorganic nanoparticles. **Langmuir**, v.18, n.16, p.6338-6344, 2002.
- FERNANDES, F.A.N., SOARES, A.B. Modeling of methane steam reforming in a palladium membrane reactor. **Latin American Applied Research**, v.36, n.3, p.155-161, 2006.
- GIORNO, L., DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends Biotechnol.**, v.18, n.8, p.339-349, 2000.
- HOSHI, T.; SAGAE, N.; DAIKUHARA, K.; TAKAHARA, K.; ANZAI, J. Multilayer membranes via layer-by-layer deposition of glucose oxidase and Au nanoparticles on a Pt electrode for glucose sensing. **Materials Science and Engineering: C**. Volume 27, Issue 4, Pages 890-894, (2007).
- ISIK, S., ALKAN, S., TOPPARE, L., CIANGA, I. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methyl-2-(-3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, v.39, p.2375-2381, 2003.

- KENNEDY, J.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L. Sucrose biosensor as an alternative tool for sugarcane Field samples. **J Sci Food Agric** **87:2266–2271** (2007).
- 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. Bioelectronic**, v.19, p. 823-834, 2004.
- MACEDO, I.C. O Ciclo da Cana-de-Açúcar e reduções adicionais nas emissões de CO₂ através do uso como combustível da palha da Cana. **Ministério da Ciência e Tecnologia**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 2006.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em fevereiro de 2009.
- MILOVANOVIC, A.; BOŽIĆ, N.; VUJČIĆ, Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. **Food Chemistry**. Volume 104, Issue 1, Pages 81-86 (2007).
- NAKAO, K., KIEFNER, A., FURUMOTO, K., HARADA, T. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. **Chem. Eng. Sci.**, v.52, p.4127-4133, 1997.
- 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.
- NEVES, L. C. M. **Emprego de Reator com Membrana na obtenção de Frutose e Ácido Glicônico a partir da Sacarose**. São Paulo, 2006. 165p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- NEVES, L.C.M., VITOLO, M. Use of glucose oxidase in a membrane reactor for gluconic acid production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.136, p.161-170, 2007.
- PANKE, S.; WUBBOLTS, M.G. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. **Current Opin. Chem. Biol.** 9:188-194 (2005).
- PERALTA, M.R., MARQUES, DE SOUZA, C., BÔER, C.G. As principais oxidorredutases de uso industrial. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Eds. **Enzimas como agents tecnológicos**. Ribeirão Preto, SP, Legis Summa, 2004. 412p.
- PÉREZ-TERRAZAS, J. E.; IBARRA-JUNQUERA, V.; ROSU, H. C.; Cellular automata modeling of continuous stirred tank reactors. *Korean J. Chem. Eng.*, **25(3)**, 461-465 (2008).
- PETROBRÁS. Disponível em: <http://www2.petrobras.com.br/portal/frame.asp?pagina=/minisite/bioenergia/terra/in dex.asp&lang=pt&area=bioenergia> . Acesso em: 20 agosto2007.
- RABA, J., MOTTOLA, H.A. Glucose oxidase as an analytical reagent. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 25, n.1, p.1-42, 1995.

- SANTOS, C.A. **Radicais livres: aspectos químicos, biológicos, patológicos e preventivos**. Santo André, SP, UNIABC, 2001. [Monografia de conclusão de Curso]
- SEGEL, I.H. **Bioquímica: teoria e problemas**. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1979. 527p.
- SCOTT, D. Oxidorredutases. In: **Enzymes in Food Processing**. Reed, G. Ed., Academic Press, New York, 1975, p. 219-254.
- SHIN, H.S., KANG, S.T. Characteristics and fates of soluble microbial products in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. **Water Res.**, v.37, n.1, p.121-127, 2003.
- SILVA, D.P., PESSOA-Jr, A., ROBERTO, I.C., VITOLO, M. Effect of k_{La} on the production of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* grown by fermentation process. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.98, p.205-213, 2002.
- SIMPSON, C.; JORDAAN, J.; GARDINER, N. S.; WHITELEY, C. Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH. **Protein Expression and Purification**. Volume 51, Issue 2, Pages 260-266 (2007)
- SOMOGYI, M. Notes in sugar determination. **J. Biol. Chem.**, 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. p.161. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TOMOTANI, E.J., NEVES, L.C.M., VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucoseoxidase in membrane bioreactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.121, p.149-162, 2005.
- TOMOTANI, E.J. **Bioconversão de Sacarose em Ácido Glicônico e Frutose usando Reator de Membrana**. São Paulo, 2006. 102p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TOMOTANI, E.J., VITOLO, M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. **Journal of food Engineering**, v.80, p.662-667, 2007.
- TOMOTANI, E.J., VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1020-1025, 2007a.

- TRAU, D., RENNEBERG, R. Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. **Biosens. Bioelectron.**, v.1, p.1-9, 2003.
- VASILEVA, N., GODJEVARGOVA, T. Study on the behavior of glucose oxidase immobilized on microfiltration polyamide membrane. **J. Membr. Sci.**, v.239, n.2, p.157-161, 2004.
- VITOLO, M., DURANTI, M.A., PELLEGRIM, M.B. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells grown in sugarcane blackstrap molasses. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.75-79, 1995.
- VITOLO, M. . Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: Eugênio Aquarone; Walter Borzani; Willibaldo Schmidell; Urgel de Almeida Lima. (Org.). **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, v. 4, p. 387-420.
- VITOLO, M. Invertase. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Eds. **Enzimas como agentes tecnológicos**. Ribeirão Preto, SP, Legis Summa, 2004. 412p.
- VOJINOVIC, V., CALADO, C.R., SILVA, A.I., MATEUS, M. Micro-analytical GO/HRP bioreactor for glucose determination and bioprocess monitoring. **Biosens. Bioelectronics**, v.20, p.1955-1961, 2005.
- YOSHIMOTO, M., WANG, S., FUKUNAGA, K., WALDE, P., NAKAO, K. Preparation and characterization of reactive and stable glucose oxidase-containing liposomes modulated with detergent. **Biotechnol. Bioeng.**, v.81, n.6, p.695-704, 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.**, v.180, n.1/2, p.141-159, 2002.
- WHITAKER, J.R.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. (org). **Handbook of Food Enzymology**. Marcel Dekker, New York, 2002, 1128p.
- WOODWARD, J.R., SPOKANE, R.B. Analytical enzymes biosensors. In: GODFREY, T., WEST, S., Eds. **Industrial Enzymology**. 2nd Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, 1996. p. 49-59.
- ZHAO, H.; ZHANG, X.; ZHOU, X.; LI, Z. Use of the glucose oxidase system for the estimation of the oxygen transfer rate in a solid-state bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, n.7, p.843-846, 2002.

7. ANEXO I – Métodos

7.1. Padronização dos reagentes de Somogyi-Nelson

A padronização do método foi feita utilizando-se o método de Somogyi-Nelson, segundo adaptação feita por TOMOTANI (2002).

7.1.1. Preparação dos reagentes de Somogyi

- Solução Alcalina (Somogyi I)

Dissolveram-se os seguintes sais em 1000 mL de água destilada:

NaHCO₃.....20,0g

NaKC₂H₄O₆.....15,0g

Na₂CO₃.....30,0g

Na₂SO₄.....180,0g

- Solução alcalino-cúprica (Somogyi II)

Dissolveu-se 46,0g de Na₂SO₄ em 100mL de uma solução de CuSO₄.5H₂O de 40g/L e completou-se o volume da dissolução a 200mL.

- Solução arseno-molibdica (Somogyi III)

Dissolveu-se 25g de molibdato de amônio em 400mL de água destilada e 3g de arseniato de sódio em 25mL de água destilada. Adicionou-se, a seguir, o ácido sulfúrico à solução de molibdato de amônio e, a seguir, juntou-se à solução de arseniato. Completou-se o volume da solução final à 475mL.

7.1.2. Preparação das soluções de glicose

Dissolveu-se 0,1g de glicose P.A. em 100mL de água destilada. Tomou-se 20 mL da solução e completou-se essa alíquota com 100mL de água destilada, obtendo-se uma solução final com concentração de 0,2mg/mL.

7.1.3 Estabelecimento da curva-padrão

Em tubos de folin-wu colocou-se os volumes indicados na Tabela A, sendo a mistura reativa constituída de 4 partes de Somogyi I e 1 parte de Somogyi II. A seguir, colocou-se os tubos em banho fervente por 10 min, retirando-os em seguida e os alocando em banho de gelo. Após o resfriamento, adicionou-se 2,0 mL de Somogyi III em cada tubo, agitando-os para remover os gases formados pela reação. Homogeneizaram-se os tubos e a cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro a 540nm, após repouso de 20 min. O procedimento foi repetido mais quatro vezes.

Tabela A. Volumes indicados para o método de Somogyi-Nelson.

<i>Tubo (nº)</i>	<i>Solução de glicose (mL)</i>	<i>H₂O (mL)</i>	<i>Mistura Reativa (mL)</i>	<i>Somogyi III (mL)</i>
Branco	-	1,0	1,0	2,0
1	0,2	0,8	1,0	2,0
2	0,4	0,6	1,0	2,0
3	0,6	0,4	1,0	2,0
4	0,8	0,2	1,0	2,0
5	1,0	-	1,0	2,0

7.1.4. Determinação do erro experimental.

O teste de Somogyi-Nelson foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental do método.

Figura A. Curva-padrão média para padronização da dosagem de ART, cujo teor é expresso em mg de glicose. A equação de regressão linear da reta apresentada, onde ‘y’ e ‘x’ correspondem, respectivamente, às absorbâncias e ao teor de glicose (mg), é a seguinte: $y = 2,46x - 0,011$ ($r = 0,9996$).

Para esta determinação o desvio-padrão e o coeficiente de variação foram iguais a: 0,0022 mg de glicose e 1,75%, respectivamente.

Quando algum dos reagentes de Somogyi-Nelson chega ao fim, confecciona-se o novo reagente e novamente deve-se fazer uma curva para determinar a nova equação a ser usada. Para tanto, nos testes realizados a partir do item 4.1.3. utilizou-se a equação de regressão linear da reta mostrada na figura B.

Figura B. Curva-padrão para a dosagem de glicose, segundo o método de Somogyi-Nelson. A equação de regressão linear é: $y = 2,23x - 0,0081$ ($r = 0,9998$).

7.2. Determinação da dosagem de água oxigenada (H_2O_2).

7.2.1. Determinação da curva-padrão.

Diluiu-se uma solução de água oxigenada 10V 50 vezes (misturou-se 1mL de H_2O_2 de 10V em 49mL de água destilada). Solução diluída com 0,608mg/ml de H_2O_2 .

Tabela B. Volumes indicados para a determinação da H_2O_2 .

Tubos	H_2O_2 (mL)	H_2O (mL)	H_2O_2 (mg)
B	-	1	0
1	0,1	0,9	0,0608
2	0,2	0,8	0,122
3	0,3	0,7	0,182
4	0,4	0,6	0,243
5	0,5	0,5	0,304
6	0,6	0,4	0,365
7	0,7	0,3	0,426
8	0,8	0,2	0,486
9	0,9	0,1	0,547
10	1	-	0,608

Mediu-se cada diluição a 240 nm em um espectrofotômetro.

7.2.2. Determinação do erro experimental.

O teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental do procedimento.

Figura C. Curva-padrão média para a padronização da dosagem de água oxigenada, cuja quantidade é expressa em mg de H₂O₂. A equação de regressão linear da reta apresentada, onde ‘y’ e ‘x’ correspondem, respectivamente, às absorbâncias e à quantidade de H₂O₂ (mg), é a seguinte: $y = 1,655x + 0,00424$ ($r = 0,99998$).

Para esta determinação o desvio-padrão e o coeficiente de variação foram iguais a: 0,01365 mg de H₂O₂ e 4,7%, respectivamente.

7.3. Determinação da proteína solúvel

7.3.1. Determinação da curva-padrão

Preparou-se 5 soluções de albumina (0,1 mg/mL), pesando-se 0,01g da proteína e acrescentando-se 5mL de solução de NaOH 5mM. Completou-se o volume com 100mL de água destilada. Na Tabela C, são indicadas as diluições que foram realizadas na própria cubeta do espectrofotômetro:

Tabela C. Volumes indicados para a determinação da quantidade de proteína solúvel.

<i>Tubo (nº)</i>	<i>Solução de albumina (mL)</i>	<i>H₂O (mL)</i>	<i>Massa de albumina (µg)</i>
Branco	-	1,0	-
1	0,1	0,9	10
2	0,2	0,8	20
3	0,3	0,7	30
4	0,4	0,6	40
5	0,5	0,5	50
6	0,6	0,4	60
7	0,7	0,3	70
8	0,8	0,2	80
9	0,9	0,1	90
10	1,0	-	100

Mediu-se as absorvâncias de cada diluição a 215nm e 225nm em espectrofotômetro. Para efeito de determinação da concentração de proteína, utilizou-se a diferença entre as absorvâncias medidas.

7.3.2. Determinação do erro experimental.

O teste foi realizado em quintuplicata a fim de se determinar o erro experimental do procedimento.

Figura D. Curva-padrão média para a padronização da dosagem de proteína, cujo teor é expresso em µg de albumina. A equação de regressão linear da reta apresentada, onde ‘y’ e ‘x’ correspondem, respectivamente, às absorvâncias e ao teor de proteína (µg), é a seguinte: $y = 0,0061x + 0,0072$ ($r = 0,99998$).

Para esta determinação o desvio-padrão e o coeficiente de variação foram iguais a: 0,00426 µg de proteína e 6,60%, respectivamente.

7.4. Quantificação de proteína na solução original de invertase.

Diluiu-se 1mL de invertase em 49mL de água destilada (diluição 1:50) em um balão volumétrico de 50 mL. Mediu-se a absorvância da amostra nos comprimentos de onda 215nm e 225nm, conforme descrito no item 7.3.1. A concentração de proteína na amostra original de invertase era 3,10 mg/mL, sendo que cada mL de invertase continha uma atividade específica de 924,2 U/mg de proteína (ou mgART/min.mLmeio.mg de proteína).

7.5. Quantificação de proteína na GOD.

Diluiu-se 180U (0,0306g) de glicose oxidase em 25mL de água destilada (diluição 1:25) em um balão volumétrico de 25 mL. Mediu-se a absorvância da amostra nos comprimentos de onda 215nm e 225nm, conforme descrito no item 7.3.1. A

concentração de proteína na amostra original de GOD era 0,0248 mg de proteína/mg de sólido, sendo que cada grama de GOD continha uma atividade específica de 3530 U/mg de sólido ou $1,4 \times 10^8$ U/mg de proteína (ou mgH_2O_2 formados/min.mLmeio.mg de proteína).

8. ANEXO II – Resumos submetidos a eventos

XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, São Paulo-SP, 2008

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA INVERTASE (EC.3.2.1.26)

ALINE RAMOS DA SILVA (PG), ESTER JUNKO TOMOTANI (PD), MICHELE VITOLO.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, FCF/USP.

Introdução e Objetivo: A invertase (EC.3.2.1.26) é uma enzima usada na hidrólise da sacarose (produção do açúcar invertido), em confeitaria (confeção de bombons licorosos), na preparação do "High Test Molasses" (melaço parcialmente hidrolisado), em biossensores e como enzima-modelo em métodos de imobilização e em testes de liofilização e congelamento/descongelamento. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a cinética da invertase para posterior uso em biorreatores.

Material e Métodos: Em um béquer de 250mL, contendo 108 mL de tampão acetato 0,01 M (pH 4,6) mantido a 37°C, dissolveram-se 12g de sacarose sob agitação (100 rpm). Após 5 minutos, adicionaram-se 12 mL de solução aquosa de invertase (Quest-International®). Retiraram-se alíquotas de 0,5 mL a intervalos de 1 minuto até completar 6 min de reação. Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson ($\lambda = 540\text{nm}$). A inclinação do trecho linear do gráfico $\text{ART} = f(t)$ correspondeu à atividade invertásica (v), cuja unidade (U) foi definida como sendo a quantidade de ART (mg) formado por minuto por mL do meio reacional.

Resultados e Conclusão: A atividade da invertase medida através do ensaio-padrão foi igual a $(0,0286 \pm 0,0023)$ mg ART/min.mL. Pela variação do pH (3,5-6,0), temperatura (30°C-45°C) e concentração da sacarose (4,0-50mM) do ensaio-padrão determinaram-se o $\text{pH}_{\text{ótimo}} = 4,6$, $T_{\text{ótima}} = 45^\circ\text{C}$ ($v = 0,0384\text{mg ART/min.mL}$) e as constantes cinéticas ($K_m = 26,4\text{mM}$ e $V_{\text{max}} = 0,035$ mg ART/min.mL). As condições reacionais brandas (pH 4,6 e 45°C) para a hidrólise enzimática contrastam com as da hidrólise ácida (pH 2,0 e 70-85°C), tornando a via enzimática uma alternativa mais econômica em termos de gasto energético e de custo dos equipamentos (menor desgaste por corrosão).

Apoio financeiro / Bolsa: FAPESP.

Apresentação: Poster.

UEM

Universidade Estadual de Maringá
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

IX SHEB

IX SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

Maringá, 23 a 27 de novembro de 2009

CONVERSÃO MULTIZENZIMÁTICA DA SACAROSE EM FRUTOSE E ÁCIDO GLICÔNICO USANDO REATOR DESCONTÍNUO.

Aline Ramos da Silva*, Ester Junko Tomotani e Michele Vitolo.
Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Depto. de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica. Av Prof. Lineu Prestes, 580,
Bloco 16, 05508-900, Cidade Universitária, Butantã - São Paulo – SP.
Email: aliners@usp.br

RESUMO

A sacarose é produzida em grande quantidade no Brasil, sendo uma commodity amplamente comercializada. Pode ser, todavia, convertida em derivados de maior valor agregado, como frutose e ácido glicônico, ambos usados nos setores químico, farmacêutico e alimentício. Estudou-se a conversão sacarose/(frutose/ácido glicônico) em reator descontínuo com a adição simultânea ou seqüencial das enzimas invertase (137 U), glicose oxidase (26 U) e catalase (786 U). A reação foi efetuada sob agitação de 100rpm a 37°C e pH 4,6 por 30min ou 120min. A concentração inicial de sacarose foi de 32g/L. No processo realizado com a adição seqüencial das enzimas obteve-se conversão total da sacarose, enquanto que naquele com adição simultânea a conversão foi da ordem de 85%.

PALAVRAS-CHAVE: Invertase, glicose oxidase, catalase, açúcar invertido, ácido glicônico, reator descontínuo.

ABSTRACT

Sucrose is produced in large scale in Brazil, it's a widely commercialized commodity. However, it can be converted into products of higher added value, such as fructose and gluconic acid, both used in the chemical, pharmaceutical and food processing. This study looked for the conversion of sucrose (fructose and gluconic acid) in batch reactor with the simultaneous or sequential addition of invertase (137 U), glucose oxidase (26 U) and catalase (786 U). The reaction was carried out under agitation of 100 rpm at 37 ° C and pH 4.6 for 30min or 120min. The initial concentration of sucrose was 32 g/L. In the process performed with the sequential addition of enzymes was obtained complete conversion of sucrose, while the conversion was about 85% at the simultaneous addition.

KEY WORDS - Invertase, glucose oxidase, catalase, invert sugar, gluconic acid, batch reactor.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área plantada de 7 milhões de hectares e uma safra anual de cerca de 33 milhões de toneladas. Como consequência, é o mais importante produtor mundial de açúcar e de álcool (MAPA, 2009).

Sucedee que o mercado mundial de açúcar, embora muito grande, é muito concorrido, estando sujeito a oscilações imprevistas. No caso brasileiro, o açúcar pode ser desviado para a produção do etanol, produto de grande demanda mundial, sobretudo, como combustível ou aditivo de combustíveis. No entanto, esta mudança de produção só é economicamente viável, quando a cana, ainda, não foi processada em açúcar refinado. Porém, quando a crise do mercado se instala, é muito comum os armazéns estarem abarrotados com açúcar, o qual, se não receber uma destinação apropriada, acaba se deteriorando. Uma saída consiste em se destinar o excesso de açúcar para a produção de etanol, caso a demanda por esta commodity não esteja, também, desaquecida. Este procedimento, no entanto, leva ao prejuízo já que o valor agregado do açúcar é maior ou da mesma ordem do etanol. Por isso, o setor sucroalcooleiro deveria dispor de processos alternativos para destinar o excedente de açúcar, visando evitar perdas financeiras ou auferir a lucros extras com outros derivados.

Uma alternativa para obter derivados da sacarose com valor comercial, seria convertê-la, por exemplo, em frutose e ácido glicônico, produtos de maior valor agregado, muito usados nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia e importados pelo Brasil em grande parte (NEVES, 2006). A referida conversão consiste em se hidrolisar a sacarose em frutose e glicose, seguida da oxidação da glicose em ácido glicônico. O processo pode ser mono ou bifásico. Neste último, a hidrólise da sacarose pode ser feita com ácido clorídrico (pH 2,0 e 75-85°C) ou com invertase (EC.3.2.1.26) (pH 4,5-5,0, 35-40°C) e a oxidação da glicose com catalisadores químicos (carvão ativo enriquecido com bismuto, paládio, platina ou ouro, em meio alcalino) ou com glicose oxidase (EC.1.1.3.4) (VITOLLO, 2004; BAO et al., 2001; TOMOTANI, VITOLLO, 2007). O processo bifásico, apesar de poder ser efetuado com catalisadores químicos, apresentará maior rendimento se feito com enzimas, haja vista não ser necessário purificar o hidrolisado, a fim de remover derivados aromáticos da glicose e frutose, e nem proceder a ajuste do pH. Por outro lado, o processo monofásico só é possível empregando-se enzimas.

Neste trabalho, estudou-se a conversão enzimática da sacarose em frutose e ácido glicônico por processo monofásico (adição simultânea da invertase, glicose oxidase e catalase) e bifásico (hidrólise e oxidação feitas separadamente, pela adição sucessiva da invertase e da mistura glicose oxidase e catalase). A catalase é adicionada para decompor a água oxigenada resultante da oxidação da glicose, a qual em concentração acima de 1,22mM inibe a ação da glicose oxidase (TOMOTANI, et al., 2005). O objetivo do estudo de ambos os processos foi o de possibilitar maior versatilidade em se obter derivados comerciais da sacarose. O processo feito por etapas permitiria obter o açúcar invertido, um produto comercial “per se” (usado como adoçante em formulações alimentícias e medicamentosas ou como fonte de carbono em meios de cultura) ou servir de matéria-prima para obter glicose e frutose puras. O monofásico permitiria obter diretamente a frutose e o ácido glicônico desprovidos de quaisquer contaminantes. Ressalta-se, que qualquer que seja o

tipo de processo, formar-se-á sempre a frutose, a qual é separada na forma de xarope com alto índice de dulçor (teor em frutose acima de 95%), tornando-se um produto competidor dos chamados HFCS (xaropes de frutose obtidos pela isomerização da glicose – proveniente da hidrólise do amido de milho - com a glicose isomerase). Inclusive, dispor de uma via alternativa para obter o xarope de frutose, poderá se tornar importante para o mercado de adoçantes, haja vista a tendência atual de se desviar o amido do milho para a produção de etanol combustível.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A invertase de *Saccharomyces cerevisiae* foi adquirida da Quest International[®]. A glicose oxidase e a catalase foram adquiridas da SIGMA[®]. Os demais reagentes empregados (grau PA) foram de marcas tradicionais.

2.2. Métodos

2.2.1. Bioconversão em Reator Descontínuo

2.2.1.1. Adição seqüencial de enzimas

Colocou-se em um béquer, com capacidade de 250 mL, 96mL de uma solução-tampão acetato 0,01M (pH 4,6), o qual foi deixado em banho-maria a 37°C por 5min. A seguir, dissolveu-se, sob agitação (100rpm), 3,84 g de sacarose, perfazendo a concentração inicial de 32g/L. Após 5min exatos, adicionaram-se 24 mL de solução aquosa de invertase (137 U). Um cronômetro foi acionado e, a cada 10min, 1mL de meio foi retirado para fins analíticos (dosagem dos açúcares redutores totais formados). O tempo total de reação foi de 30min, o suficiente para a hidrólise total da sacarose. Imediatamente antes da adição da enzima, no tempo zero da reação, tomou-se uma alíquota de 1mL para verificar a quantidade inicial de açúcares redutores totais (ART).

A seguir, tomaram-se 55mL do hidrolisado, que foram colocados em um béquer de 250mL de capacidade. Adicionaram-se 20mL de uma solução contendo glicose oxidase (266 U) e catalase (393 U). A cada 20min foram retiradas alíquotas de 1mL para fins analíticos (dosagem de ART e de água oxigenada). O tempo total de reação foi de 120min.

2.2.1.2. Adição simultânea de enzimas

Colocaram-se em um béquer, com capacidade de 250 mL, 61mL de uma solução-tampão 0,01M (pH 4,6) e deixou-se em banho-maria a 37°C. Após 5min, dissolveram-se, sob agitação (100rpm), 3,84g de sacarose, perfazendo a concentração inicial de 32g/L. Após 5min exatos, adicionaram-se 59mL de solução tamponada das enzimas [invertase (137 U), glicose oxidase (26 U) e catalase (786 U)] e acionou-se um cronômetro. A cada 20min foi tomada alíquota de 1mL de meio, até completar o tempo total de reação de 120min, para fins analíticos. No tempo zero da reação, uma alíquota de 1mL foi recolhida, imediatamente antes da adição da solução contendo as enzimas.

2.2.2. Métodos Analíticos

2.2.2.1. Dosagem dos açúcares redutores totais (ART)

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson, adaptado por TOMOTANI (2002). A curva-padrão foi feita usando soluções de glicose PA (0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2 mg/mL).

2.2.2.2. Dosagem da água oxigenada

Em uma cubeta de espectrofotômetro de 1mL de capacidade e 1cm de caminho óptico colocou-se 1mL da amostra e procedeu-se à leitura a 240nm. A curva-padrão foi feita usando solução de água oxigenada (grau farmacêutico) na concentração de: 0,0608 a 0,608 mg/mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Bioconversão em Reator Descontínuo

3.1.1. Adição seqüencial de enzimas

3.1.1.1. Enzima Inicial: Invertase

Da Figura 1, observa-se que após 30min de reação toda a sacarose inicial (32g/L) foi hidrolisada pela invertase.

Figura 1. Formação de açúcares redutores totais (ART) em função do tempo através da ação da invertase sobre a sacarose (32g/L).

Um volume de 55mL de hidrolisado foi separado e colocado em outro recipiente, no qual foram adicionadas a glicose oxidase e a catalase, conduzindo-se a oxidação da glicose em ácido glicônico, conforme descrito em materiais e métodos. O consumo de glicose foi acompanhado por um tempo total de 120min (Figura 2).

Conforme se depreende da Figura 2, toda a glicose foi oxidada após 80min de reação, restando no meio, apenas, a frutose, a qual responde totalmente pelos 50% de ART, ainda, presentes. A separação da frutose desse meio não foi realizada neste trabalho, mas pode ser obtida segundo trabalho BAO et al, 2001, permitindo a obtenção de um xarope com 100% de frutose, produto altamente competitivo no mercado dos HFCS ("High Fructose Corn Syrup").

Figura 2. Variação da concentração dos açúcares redutores totais em função do tempo para a conversão da glicose, presente no hidrolisado da sacarose (açúcar invertido), em ácido glicônico, catalisada pela glicose oxidase.

3.1.2. Adição simultânea de enzimas

A Figura 3 mostra que, após 120min de reação catalisada pelas três enzimas, ainda, restam no meio 65% de açúcares redutores, dos quais 50% correspondem à frutose e 15% à glicose não oxidada. Por conseguinte, o rendimento em ácido glicônico pode ser estimado como sendo da ordem de 70%. Apesar da conversão sacarose/(frutose + ácido glicônico) com o uso simultâneo das enzimas, ainda, carecer de otimização, a separação da mistura resultante, permitiu obter um xarope com teor de frutose da ordem de 85%, o qual constitui-se em produto com valor comercial no mercado de adoçantes (TOMOTANI & VITOLO, 2005). A solução aquosa, após a separação das hexoses, continha ácido glicônico em quantidade suficiente para ser comercializado, haja vista este reagente ser encontrado no mercado na forma de solução aquosa a 50% (p/p) (TOMOTANI et al, 2005). Observa-se, ainda, da Figura 3 que a quantidade de ART se acumula no meio reacional até completados 20min de reação, diminuindo, a seguir. Este fato reflete que a hidrólise da sacarose não é a etapa limitante do processo. Seguramente o ajuste das atividades (glicose oxidase + catalase) constitui o parâmetro de processo a ser otimizado.

Figura 3. Variação da concentração dos açúcares redutores totais em função do tempo para a conversão sacarose/(frutose + ácido glicônico) com o uso simultâneo das enzimas (invertase, glicose oxidase e catalase).

4. CONCLUSÕES

A bioconversão descontínua com adição seqüencial de enzimas mostrou-se capaz de converter a solução de sacarose (32g/L) em frutose e ácido glicônico com 100% de rendimento. No caso do processo descontínuo com adição simultânea de enzimas foram obtidos rendimentos da ordem de 85% e 70% em frutose e ácido glicônico, respectivamente.

5. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP), Universidade de São Paulo (USP).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAO, J. FURUMOTO, K. FUKUNAGA, K. NAKAO, K. A Kinetic study on air oxidation of glucose catalized by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. *Biochemical Engineering Journal*, V.8, p. 91-102, 2001.
- BENTLEY, I.S., WILLIAMS, E.C. Starch conversion. In: GODFREY, T., WEST, S., Eds. *Industrial Enzymology*. 2nd Edition, London, UK, MacMillan Press LTD, 1996. p. 339-356.
- 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*. Weinheim, Verlag Chemie, 1984. v.6.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em fevereiro de 2009.
- NEVES, L. C. M. *Emprego de Reator com Membrana na obtenção de Frutose e Ácido Glicônico a partir da Sacarose*. São Paulo, 2006. 165p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TOMOTANI, E.J. *Imobilização da Invertase em resina de troca iônica (tipo Dowex®): seu uso na modificação da sacarose*. São Paulo, 2002. p.161. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TOMOTANI, E. J. ; Neves, L.C.M. ; VITOLO, M. . Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in a membrane bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Estados Unidos, v. 121, p. 149-162, 2005.
- TOMOTANI, E.J. *Bioconversão de Sacarose em Ácido Glicônico e Frutose usando Reator de Membrana*. São Paulo, 2006. 102p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- TOMOTANI, E. J. ; VITOLO, M. . Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1020-1025, 2007.
- VITOLO, M. Invertase. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Eds. *Enzimas como agentes tecnológicos*. Ribeirão Preto, SP, Legis Summa, 2004. 412p.

9. ANEXO III- Documento

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Histórico escolar de pós-graduação

Ficha Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9134 - 6327583/1 - Aline Ramos da Silva

Email:	aliners@usp.br
Data de Nascimento:	22/06/1984
Cédula de Identidade:	RG - 43.478.853-3 - SP
Local Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:	Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data da Matrícula:	14/02/2008
Início da Contagem de Prazo:	14/02/2008
Data Limite:	14/08/2010
Orientador(es):	Prof(a). Michele Vitolo - 14/02/2008 a -- E.Mail: michenzi@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 14/02/2008
Exame de Qualificação:	Aprovado em 24/08/2009
Data do Depósito do Trabalho:	
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 14/02/2008 Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2009

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBT5733-4	Uso Industrial de Enzimas	18/02/2008	20/04/2008	90	6	100.00	A	N	Concluída
FBT5729-5	Liofilização e suas Aplicações a Alimentos e à Medicamentos	26/03/2008	27/05/2008	90	6	100.00	A	N	Concluída
FBT5770-5	Aplicações de Enzimas na Área Químico-Farmacêutica	15/04/2008	19/05/2008	75	5	100.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	07/10/2008	03/11/2008	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBT5715-6	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	03/03/2009	27/04/2009	120	8	95.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	29
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		29

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

<p>Conceito até 31/12/1996:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.</p> <p>Conceito a partir de 02/01/1997:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.</p> <p>Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.</p>

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2009

Impresso em: 02/12/09 00:33:46