

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

**Enzimas microbianas na conversão da sacarose em frutose e
ácido glicônico usando reatores descontínuo-alimentado e
contínuo com membrana.**

Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador:
Prof. Titular Michele Vitolo

São Paulo-SP
2010

Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

Enzimas microbianas na conversão da sacarose em frutose e ácido glicônico usando reatores descontínuo-alimentado e contínuo com membrana.

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Prof. Titular Michele Vitolo
Orientador/Presidente

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, Julho de 2010.

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a
oportunidade.”
[Albert Einstein]

Aos meus pais, Fadi e Suely,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela família maravilhosa que tenho e por todos os objetivos alcançados.

Agradeço aos meus pais, Fadi e Suely, por todo o apoio, carinho, amor e dedicação durante todos os anos de minha vida, os quais foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Charles, Chadi, Simon e Michelle pelo apoio incondicional.

À minha namorada, Diana, por todo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador, prof. Titular Michele Vitolo, pela atenção, pelos conselhos, pela amizade e por sua orientação durante a realização desse projeto.

À Ester, pela amizade e por todos os conhecimentos passados a mim, os quais foram de grande importância para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas e colegas de laboratório Diana e Aline, pela amizade, ajuda e troca de conhecimentos.

Aos funcionários, professores e amigos do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, os quais ajudaram de diferentes formas para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro durante a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enzimas	2
1.1.1. Invertase	2
1.1.2. Glicose oxidase (GOD)	3
1.1.3. Catalase	5
1.2. Produtos	5
1.3. Bioconversão	7
1.4. Sistema multienzimático	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
2.3. Atividade experimental.	11
3. METODOLOGIA	12
3.1. Materiais	12
3.1.1. <u>Enzimas</u>	12
3.1.2. <u>Substratos</u>	12
3.1.3. <u>Reagentes e Vidraria</u>	12
3.1.4. <u>Biorreator Contínuo e Membrana</u>	12
3.2. Equipamentos	12
3.3. Métodos	13
3.3.1. Caracterização da Invertase.	13
3.3.1.1. Efeito do pH na atividade da invertase.	13
3.3.1.2. Efeito da temperatura na atividade da invertase.	14
3.3.1.3. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{máx}$).	14
3.3.1.4. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase.	14
3.3.2. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD).	14

3.3.2.1. Determinação da atividade enzimática da GOD.	15
3.3.2.2. Efeito do pH na atividade da GOD.	15
3.3.2.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD.	15
3.3.2.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$).	15
3.3.2.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD.	15
3.3.3. Bioconversão da sacarose pela invertase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.	16
3.3.3.1. Estabelecimento da quantidade de invertase para a hidrólise de uma solução de 64 g/L de sacarose.	16
3.3.3.2. Testes de conversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.	16
3.3.4. Bioconversão da glicose pela glicose oxidase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.	17
3.3.4.1. Testes de conversão da glicose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.	18
3.3.5. Bioconversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente, usando: invertase, glicose oxidase e catalase.	19
3.3.6. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Caracterização da invertase.	20
4.1.1. Determinação da atividade enzimática da Invertase.	20
4.1.2. Efeito do pH na atividade da invertase.	20
4.1.3. Efeito da temperatura na atividade da invertase.	21
4.1.4. Efeito da concentração de sacarose na atividade da Invertase (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$).	23
4.1.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da Invertase.	25
4.2. Caracterização da Glicose Oxidase (GOD).	26
4.2.1. Determinação da atividade enzimática da GOD.	26
4.2.2. Efeito do pH na atividade da GOD.	27
4.2.3. Efeito da temperatura na atividade da GOD.	28
4.2.4. Efeito da concentração de glicose na atividade da GOD (determinação das constantes cinéticas: K_m e $V_{m\acute{a}x}$).	29
4.2.5. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da GOD.	31

4.3. Bioconversão da sacarose pela invertase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.	32
4.3.1. Estabelecimento da quantidade de invertase para a hidrólise de uma solução de 64 g/L de sacarose.	32
4.3.2. Testes de conversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.	33
4.4. Bioconversão da glicose pela glicose oxidase, em reator descontínuo-alimentado, utilizando diferentes leis de alimentação do reator.	35
4.4.1. Testes de conversão da glicose por processo descontínuo-alimentado, usando diferentes leis de alimentação do reator.	35
4.5. Bioconversão da sacarose por processo descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente, usando: invertase, glicose oxidase e catalase.	38
4.6. Bioconversão da sacarose em frutose e ácido glicônico em reator contínuo com membrana.	39
5. CONCLUSÕES.	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ANEXO I - Métodos	49
8. ANEXO II - Gráficos de formação de água oxigenada durante conversão da glicose (32g/L) por processo descontínuo-alimentado, realizado com diferentes leis de alimentação do reator. (item 4.4.1.).	54
9. ANEXO III – Noção de Custo do processo contínuo (com relação à sacarose).	57
10. ANEXO IV – Demonstração das equações utilizadas para calcular os volumes adicionados para cada tipo de alimentação do reator.	58
11. ANEXO V – Resumos submetidos a eventos.	66
12. ANEXO VI – Trabalho completo publicado em anais de eventos.	68
13. ANEXO VII – Trabalho completo enviado para publicação (revista ANALYTICA, ISSN 1677-3055).	75
14. ANEXO VIII – Declaração.	89
15. ANEXO IX – Documentos.	90

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Variação da concentração de ART em função do tempo. A equação de regressão linear é: $y = 0,0353x - 0,0123$ ($r = 0,995$), na qual y é a concentração de ART em mg/mL e o x , tempo de reação (min). **20**
- Figura 2.** Efeito do pH sobre a atividade da invertase. **21**
- Figura 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade da Invertase, sendo o pH do meio reacional igual a 5,0. A equação de regressão linear é: $v = 0,0021T - 0,0358$ ($r = 0,990$). **21**
- Figura 4.** Logaritmo da atividade da invertase (v) em função do inverso da temperatura para o cálculo da Energia de Ativação (E_a), sendo a equação de regressão linear: $\ln v = -4360,1(1/T) + 10,831$ ($r = 0,990$). **22**
- Figura 5.** Atividade da invertase em função da concentração de sacarose. **24**
- Figura 6.** Inverso da atividade invertásica em função do inverso da concentração de sacarose, conforme o método de Lineweaver-Burk. A equação de regressão linear é: $1/v = 624,2(1/s) + 15,52$ ($r = 0,991$). **24**
- Figura 7.** Estabilidade da invertase à temperatura de 37°C em pH = 4,6 (▲) e 5,0 (■), por um tempo total de 30h. **25**
- Figura 8.** Variação da concentração de água oxigenada (mg/mL) em função do tempo. A equação de regressão linear é: $y = 0,00098x - 0,02049$ ($r = 0,997$), na qual y é a concentração de água oxigenada e x , o tempo de reação. **26**
- Figura 9.** Efeito do pH sobre a atividade da glicose oxidase. **27**
- Figura 10.** Atividade da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura, pH 5,1. A equação de regressão linear é: $v_{GOD} = 0,00007T - 0,00145$ ($r = 0,990$). **28**
- Figura 11.** Logaritmo da atividade da GOD em função do inverso da temperatura para o **29**

cálculo da Energia de Ativação (E_a), sendo a equação de regressão linear: $\ln v_{GOD} = -6315,1(1/T) + 13,422$ ($r= 0,990$).

Figura 12. Atividade da GOD em função da concentração de glicose. **30**

Figura 13. Inverso da atividade da GOD em função do inverso da concentração de glicose, conforme método de Lineweaver-Burk. A equação de regressão linear é: $(1/v_{GOD}) = 4584(1/S) + 293$ ($r= 0,997$).

Figura 14. Estabilidade da GOD mantida em pH 5,0 e 37°C por um período total de 30h. **32**

Figura 15. Conversão total de sacarose (64g/L) em ART em função do tempo. **33**

Figura 16. Formação de açúcares redutores durante processo descontínuo-alimentado, no qual a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo a lei constante. **33**

Figura 17. Formação de açúcares redutores durante processos descontínuo-alimentados, nos quais a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo as leis: linear decrescente (■); exponencial decrescente(▲).

Figura 18. Formação de açúcares redutores durante processos descontínuo-alimentados, nos quais a solução de sacarose (64g/L) foi adicionada segundo as leis: linear crescente (■) e exponencial crescente (▲).

Figura 19. Desempenho da conversão de glicose em processo descontínuo-alimentado, no qual a solução substrato (32g/L) foi adicionada de acordo com a lei constante. **35**

Figura 20. Desempenho da conversão de glicose em processo descontínuo-alimentado, no qual a solução substrato (32g/L) foi adicionada de acordo com as leis: linear decrescente (■) e exponencial decrescente(▲). **36**

Figura 21. Desempenho da conversão de glicose em processo descontínuo-alimentado, no qual a solução substrato (32g/L) foi adicionada de acordo com as leis: linear crescente (■) e exponencial crescente(▲). **36**

- Figura 22.** 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). **38**
- Figura 23.** Formação de água oxigenada durante a conversão multienzimática da sacarose, em processo descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente. **39**
- Figura 24.** Formação de ART (■) e H₂O₂ (▲) durante o teste 2, realizado com solução de 64g/L de sacarose. **40**
- Figura 25.** Formação de ART (■) e H₂O₂ (▲) durante o teste 5, realizado com solução de 100g/L de sacarose. **41**
- Figura 26.** Formação de ART (■) e H₂O₂ (▲) durante o teste 6, realizado com solução de 150g/L de sacarose. **42**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Leis de adição das soluções de sacarose (64g/L) nos testes descontínuo-alimentados.	17
Tabela 2. Atividade enzimática da Invertase em função da variação de temperatura (pH= 5,0).	22
Tabela 3. Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (Ea) da reação catalisada pela invertase.	23
Tabela 4. Dados utilizados para o cálculo das constantes cinéticas da invertase, aplicando o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk.	23
Tabela 5. Atividade invertásica residual, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.	25
Tabela 6. Testes realizados para conversão da glicose em ácido glicônico pela GOD e formação de H ₂ O ₂ (pH 5,1 e 37°C).	26
Tabela 7. Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação do pH; temperatura de 37°C.	27
Tabela 8. Atividade enzimática da Glicose Oxidase em função da variação da temperatura, pH 5,1.	28
Tabela 9. Dados utilizados para a determinação da Energia de Ativação (Ea) da reação catalisada pela glicose oxidase.	29
Tabela 10. Dados utilizados para o cálculo das constantes cinéticas da GOD, aplicando o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk.	30
Tabela 11. Atividade residual da GOD, determinada de tempo em tempo, até perfazer um total de exposição de 30h.	32
Tabela 12. Atividades hidrolíticas médias e respectivos rendimentos dos processos	35

descontínuo-alimentados com sacarose, executados sob diferentes leis de adição.

Tabela 13. Atividades hidrolíticas médias e respectivos rendimentos dos processos descontínuo-alimentados com glicose, executados sob diferentes leis de adição. **37**

Tabela 14. Condições e respectivos rendimentos dos testes contínuos. **39**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.

- ART - Açúcares Redutores Totais
- Abs - absorvância
- °C – graus Celsius
- Δ Abs - diferença de absorvância
- E_a - Energia de ativação ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- ΔH – Entalpia ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- GOD - Glicose oxidase
- g - grama
- g/L – gramas por litro
- h – hora
- J - Joule
- K - temperatura absoluta (Kelvin)
- kJ - quilojoule
- K_m - Constante de Michaelis-Menten
- Ln - Logaritmo neperiano
- M – molaridade (mol/L)
- μg – micrograma
- mL – mililitros
- mM - milimolar
- min – minutos
- nm – nanômetros
- pH – potencial hidrogeniônico
- R = constante universal dos gases ($8,3144 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$)
- r – coeficiente de correlação linear
- rpm - rotações por minuto
- U – unidade de atividade enzimática
- $V_{\text{máx}}$ - velocidade máxima
- ϕ = vazão de alimentação (L/h)
- ϕ_0 = vazão de alimentação inicial (L/h)
- k = constante de adição linear (L/h^2)
- k' = constante de adição exponencial (h^{-1})

- t = tempo de adição (h)
- V = volume final
- V_0 = volume inicial

ENZIMAS MICROBIANAS NA CONVERSÃO DA SACAROSE EM FRUTOSE E ÁCIDO GLICÔNICO USANDO REATORES DESCONTÍNUO-ALIMENTADO E CONTÍNUO COM MEMBRANA.

Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

RESUMO

A sacarose é uma matéria-prima em franca expansão de produção no Brasil, seu maior produtor e exportador. Essa molécula pode ser convertida, através de um processo multienzimático, em produtos de maior valor agregado: frutose e ácido glicônico, os quais são importados pelo país, e amplamente utilizados em indústrias químicas, de produção de fármacos e setores alimentícios. Neste estudo, avaliou-se a hidrólise da sacarose pela invertase assim como a conversão da glicose em ácido glicônico, pela ação da glicose oxidase, ambas em processo descontínuo-alimentado. A solução de substrato (64g/L-sacarose; 32g/L-glicose) foi adicionada segundo as seguintes leis: constante, linear crescente, linear decrescente, exponencial crescente e exponencial decrescente. No caso da glicose, foi necessária a utilização de enzima auxiliar, a catalase, para degradar a água oxigenada formada durante a conversão da glicose. Mediante os resultados dos testes com os dois substratos, realizou-se teste de conversão direta da sacarose em frutose e ácido glicônico, utilizando-se invertase, glicose oxidase e catalase em regime descontínuo-alimentado, com alimentação linear decrescente (melhor resultado para ambos os substratos). No procedimento contínuo, alvo principal do trabalho, utilizou-se reator com membrana, da marca MILLIPORE[®], integrando 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 foram, a princípio, fixados de acordo com os valores otimizados no reator descontínuo-alimentado com o emprego simultâneo das enzimas.

Palavras-chave: Invertase, glicose oxidase, catalase, ácido glicônico, frutose, reator descontínuo-alimentado, reator contínuo.

Conversion of sucrose into fructose and gluconic acid by microbial enzymes using fed-batch and membrane continuous reactors

Fadi Antoine Taraboulsi Júnior

ABSTRACT

Sucrose is a commodity largely produced in Brazil and one of the most used and commercialized product in food industry. It can be converted through a multienzyme process in fructose and gluconic acid, which have commercial values higher than sucrose. Both products are imported by Brazil, being largely employed in the chemical, food and pharmaceutical industry. This work dealt with the hydrolysis of sucrose by invertase into fructose and glucose, and the oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase and catalase. Catalase was added in order to decompose the hydrogen peroxide – an inhibitor of glucose oxidase – formed as by-product of the oxidation. Two processes were employed. Fed-batch – in which the hydrolysis and oxidation reactions were carried out separately by adding invertase followed by glucose oxidase and catalase – was conducted by adding the solution of substrate according to a constant, increasing linear, decreasing linear, increasing exponential or decreasing exponential mode. The best fed-batch performance was attained through the decreasing linear addition of sucrose (64g/L) and glucose (32g/L). Setting this kind of addition and using all enzymes simultaneously, the direct conversion of sucrose to fructose and gluconic acid occurred at a yield of 72%. The continuous process was carried out in a cell-type membrane reactor (membrane cut off = 100 kDa), in which the sucrose conversion was made by using all enzymes simultaneously, leading to a final yield of about 76%.

Keywords: Invertase, glucose oxidase, catalase, gluconic acid, fructose, fed-batch, membrane reactor.