

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

"IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM RESINAS TROCADORAS DE ÍONS E ESTUDO CINÉTICO DE INVERSÃO DA SACAROSE EM REATOR TUBULAR".

Eloízio Júlio Ribeiro  
Engenheiro Químico

ORIENTADORA:

Profª: Drª Iracema de Oliveira Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de "MESTRE" em Engenharia de Alimentos.

A meus pais  
e à minha esposa,  
dedico este trabalho.



	Pág.
III.1.2 - Resinas.....	22
III.1.3 - Produtos Químicos.....	23
III.1.4 - Vidraria de Laboratório.....	23
III.2 - Equipamentos Utilizados.....	23
III.3 - Métodos.....	24
III.3.1 - Determinação de Proteínas.....	24
III.3.2 - Método DNS de Dosagem de Açúcares Redutores	25
III.3.3 - Preparação de Tampões.....	27
III.3.4 - Determinação da Atividade Enzimática.....	27
III.3.5 - Determinação dos Parâmetros Cinéticos, Km e Vm da Enzima Livre.....	30
III.3.6 - Temperatura Ótima da Invertase Livre.....	30
III.3.7 - pH Ótimo da Invertase Livre.....	30
III.3.8 - Ativação das Resinas para Imobilização.....	31
III.3.8.1 - Ativação de Dowex 1 - X4 e Amberlite IRA - 400.....	31
III.3.8.2 - Ativação de Rexyn 101 (H).....	31
III.3.8.3 - Ativação de Duolite S-761.....	32
III.3.9 - Imobilização de Invertase.....	32
III.3.9.1 - Utilizando as Resinas Dowex 1 - X4 e Am- berlite IRA-400.....	32
III.3.9.2 - Utilizando a Resina Rexyn 101 (H).....	33
III.3.9.3 - Utilizando Duolite S-761.....	34
III.3.10 - Invertase Imobilizada em Duolite S-761, sem o uso de Glutaraldeído.....	35
III.3.10.1 - Determinação dos Parâmetros Cinéticos Km' e Vm'.....	35
III.3.10.2 - Temperatura Ótima.....	35
III.3.10.3 - pH Ótimo.....	35
III.3.11 - Preparação da Coluna de Invertase Imobiliza- da.....	36

III.3.12 - Estudo da Conversão em Função da Velocidade de Linear de Fluxo.....	38
III.3.13 - Estabilidade Enzimática na Coluna.....	38
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
IV.1 - Resultados.....	40
IV.1.1 - Resultados Relativos à Enzima Livre.....	40
IV.1.1.1 - Conteúdo Proteico.....	40
IV.1.1.2 - Parâmetros Cinéticos, Km e Vm.....	40
IV.1.1.3 - Temperatura Ótima.....	40
IV.1.1.4 - pH Ótimo.....	44
IV.1.2 - Retenção de Atividade na Imobilização.....	45
IV.1.2.1 - Com a Resina Dowex 1 - X4.....	45
IV.1.2.2 - Com a Resina Amberlite IRA - 400.....	45
IV.1.2.3 - Com a Resina Rexyn 101 (H).....	46
IV.1.2.4 - Com Duolite S-761.....	46
IV.1.3 - Resultados Relativos à Invertase Imobilizada em Duolite S-761 sem Uso de Glutaraldeído...	51
IV.1.3.1 - Parâmetros Cinéticos Km' e Vm'.....	51
IV.1.3.2 - Temperatura Ótima.....	53
IV.1.3.3 - pH Ótimo.....	53
IV.1.4 - Dados relativos à Coluna de Invertase Imobilizada em Duolite S-761 sem uso de Glutaraldeído.....	53
IV.1.4.1 - Preparação da Coluna.....	53
IV.1.4.2 - Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose na Coluna de Invertase Imobilizada.....	56
IV.1.5 - Estabilidade Enzimática.....	63
IV.2 - Discussão.....	65
V - CONCLUSÕES.....	70
VI - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71

	Pág.
VII - NOMENCLATURA.....	72
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
AGRADECIMENTOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E FOTOS

FIGURAS

FIGURA III.1 - Curva padrão do Método DNS.....	26
FIGURA IV.1 - Velocidade de Reação em Função da Concentração de Sacarose.....	41
FIGURA IV.2 - Diagrama de Linewear-Burk para Invertase Solúvel.....	42
FIGURA IV.3 - Atividade Enzimática de Invertase Solúvel em Função da Temperatura.....	43
FIGURA IV.4 - Atividade Enzimática de Invertase Solúvel em Função do pH.....	44
FIGURA IV.5 - Diagrama de Lineweaver-Burk para Invertase Imobilizada.....	52
FIGURA IV.6 - Atividade Enzimática de Invertase Imobilizada em Função da Temperatura.....	54
FIGURA IV.7 - Atividade Enzimática de Invertase Imobilizada em Função do pH.....	55
FIGURA IV.8 - Conversões de Sacarose a Açúcar Invertido , em Função das Velocidades Lineares de Fluxo..	58
FIGURA IV.9 - Concentração do Produto, $S_0 \cdot \alpha$ em função de $\ln(1 - \alpha)$ .....	60
FIGURA IV.10 - Constante Aparente de Michaelis-Menten em Função das Velocidades Lineares de Fluxo....	61

FIGURA IV.11 - Velocidade Máxima de Reação Aparente, em Função das Velocidades Lineares de Fluxo.....	62
FIGURA IV.12 - Estabilidade Enzimática em Função do Tempo..	64

TABELAS

TABELA IV.1 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase Imobilizada em Amberlite IRA - 400, na Forma Cloreto, sem o uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	47
TABELA IV.2 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase, Imobilizada em Amberlite IRA-400 , na Forma Cloreto, com o Uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	48
TABELA IV.3 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase, Imobilizada em Rexyn 101 (H), na Forma Hidrogeniônica, sem o Uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	48
TABELA IV.4 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase, Imobilizada em Rexyn 101 (H), na Forma Sódica, sem o Uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	49
TABELA IV.5 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase, Imobilizada em Rexyn 101 (H), na Forma Sódica, com o Uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	49
TABELA IV.6 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase, Imobilizada em Duolite S-761, sem o Uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	50

TABELA IV.7 - Porcentagens de Retenção de Atividade de Invertase, Imobilizada em Duolite S-761, com o Uso de Glutaraldeído, em Função do pH.....	50
TABELA IV.8 - Análise Granulométrica da Resina Duolite S-761 - Cálculo do Diâmetro Médio das Partículas.....	56
TABELA IV.9 - Concentração de Açúcar Redutor no Produto , $S_{O.\alpha}$ , em Função de $\ln(1 - \alpha)$ .....	59

### FOTOS

FOTO III.1 - Controlador de Temperatura do Banho, para Reações em Batelada.....	29
FOTO III.2 - Sistema Montado, para Reações em Batelada....	29
FOTO III.3 - Reator de Leito Fixo de Invertase Imobilizada e Controles.....	37

## RESUMO

Invertase de levedura foi imobilizada ionicamente, usando como suportes Duolite S-761, Amberlite IRA-400, Rexyn 101 (H) e Dowex 1 - X4.

Foi estudada a influência do pH do meio na ligação da enzima ao suporte, bem como tempo de imobilização e proporção da enzima em relação à resina.

Foram determinados os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_m$  e estudados os fatores temperatura e pH, para a enzima livre e imobilizada.

A cinética de hidrólise de sacarose foi estudada, usando um reator de leito fixo com invertase imobilizada e testado o modelo proposto para o reator tubular ideal.

A resina que apresentou maior retenção de atividade foi Duolite S-761, com 70,43%, a um pH do meio de imobilização igual a 3,0. Os parâmetros cinéticos da invertase imobilizada diferiram daqueles da enzima livre. Em operação contínua, se mostraram dependentes da velocidade linear de fluxo na coluna.

## SUMMARY

Yeast invertase was ionically immobilized on carriers of Duolite S-761, Amberlite IRA-400, Rexyn 101 (H) and Dowex 1 - X4.

The pH of the medium influence on enzyme - carrier linkage, as well as the time of immobilization and the ratio enzyme/resin were studied.

The kinetic parameters,  $K_m$  and  $V_m$  were determined and the temperature and pH factors were studied for free and immobilized enzyme.

Using a fixed-bed reactor of immobilized invertase, the kinetics of sucrose hydrolysis were studied, and a ideal tubular reactor model was developed and tested.

The resin presenting highest activity retention was Duolite S-761, with 70,43% at medium pH of 3,0. Kinetic parameters of immobilized invertase differed for those of the free invertase, and in continuous operation, shown to be dependent of the linear flow rate in the column.

## I - INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos, de natureza proteica, que participam de um grande número de reações que ocorrem nos seres. Ao contrário dos catalisadores químicos comuns, enzimas caracteristicamente tem a habilidade de catalisar reações sob condições muito brandas de temperatura e pressão, em soluções aquosas neutras, com uma especificidade muito alta.

Enzimas foram utilizadas pelo homem desde os tempos anteriores a era Cristã, como por exemplo, na manufatura de pães, manufatura do queijo, amaciamento de carnes e fabricação de bebidas fermentadas.

O uso de enzimas tem-se estendido gradualmente a vários campos, tais como na fabricação de bebidas, produção de alimentos, indústrias têxteis, transformações químicas, medicina e outros. Além do mais, devido ao recente desenvolvimento da bioquímica e da microbiologia aplicada ou biotecnologia, surgiram novas fontes de enzimas, contribuindo assim para aumentar as aplicações das mesmas. Todavia, as enzimas são produzidas por seres vivos, para suas próprias necessidades, e embora, sendo catalisadores altamente efetivos e eficientes, elas não são sempre ideais para aplicações práticas. Algumas vantagens das enzimas, podem mesmo ser desvantagens em uso prático como catalisadores, ou seja, elas são geralmente instáveis, não podem ser usadas em solventes orgânicos nem a temperaturas elevadas.

Convencionalmente, reações enzimáticas, tem sido realizadas

em processos descontínuos, incubando uma mistura de substrato e enzima solúvel. É tecnicamente, muito difícil recuperar enzima ativa da mistura após a reação, para reuso. Dessa forma, a enzima e outras proteínas contaminantes são geralmente removidas por desnaturação por pH ou tratamento térmico durante o isolamento do produto da mistura reacionante, o que não deixa de ser anti-econômico, já que a enzima é perdida após cada batelada.

Para eliminar as desvantagens do uso de enzimas como catalisadores, especialmente a impossibilidade de processamento contínuo, uma tentativa empregada é a técnica de imobilização de enzimas.

Classicamente, o termo enzima imobilizada vem sendo usado para descrever uma enzima que foi química ou fisicamente fixada em um suporte insolúvel em água, polimerizada em um gel insolúvel em água, entrelaçada dentro de uma matriz gel insolúvel ou mesmo dentro de microcápsulas insolúveis.

### OBJETIVOS

No presente trabalho, pretende-se estudar a imobilização de invertase, tendo-se como principais objetivos:

1. Estudar a imobilização de invertase em resinas trocadoras de íons, pelo método de ligação iônica, verificando a influência no meio de imobilização, dos fatores como pH, tempo de ligação e a quantidade de enzima a ser usada por grama de resina.
2. Estudar a cinética da inversão da sacarose por invertase imobilizada, em processo descontínuo.

3. Definida a resina que reteve maior atividade enzimática na imobilização, montar um reator de leito fixo com invertase imobilizada nessa resina.
4. Estudar a cinética da hidrólise de sacarose em processo contínuo, em reator de leito fixo.
5. Determinar a estabilidade da invertase imobilizada em relação ao tempo.

## II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1 - HISTÓRICO E USOS DE ENZIMAS IMOBILIZADAS

A primeira notícia que se tem sobre imobilização de enzimas data de 1916, quando NELSON e GRIFFIN verificaram que invertase de levedura adsorvida em carvão e em alumina (33) apresentavam atividade catalítica na inversão da sacarose.

Em 1921, NELSON e HITCHCOK (34) verificaram que a atividade de invertase sobre uma solução de sacarose em presença de adsorventes como carvão e alumina era menor do que na ausência dos mesmos.

A primeira tentativa de imobilização de enzimas com a finalidade de melhorar suas propriedades para um uso particular só ocorreu em 1953, quando Gruber e Schleith imobilizaram carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease usando resina de poliaminopoliestireno diazotado (10).

Segundo CHIBATA (10), nos anos 50, menos de dez trabalhos foram publicados na área de enzimas imobilizadas, tendo ocorrido nos anos 60, um progresso muito significativo, quando muitos trabalhos foram publicados e extensivas pesquisas foram realizadas a respeito de novas técnicas de imobilização e estudos das propriedades físicas, químicas e físico-químicas de enzimas imobilizadas.

Em 1969, CHIBATA et alii (11) montaram o primeiro processo

industrial, usando aminoacilase fúngica imobilizada, para a resolução de DL-aminoácidos, em processo contínuo.

Nos anos 70, surgiram novos métodos e variações de métodos de imobilização já estabelecidos, novos suportes foram desenvolvidos, havendo um grande avanço na área (10).

Segundo BASTA (4), a partir de 1971, iniciou-se nos Estados Unidos a produção de xarope de alto teor de frutose, partindo do amido de milho, utilizando tecnologia de enzima imobilizada, e, a partir dessa data, a produção por esse processo tem aumentado bastante, novas fábricas tem sido montadas, conseguindo-se aumentar o teor de frutose no xarope.

Segundo o autor anteriormente citado, em 1980, entrou em funcionamento na Alemanha Ocidental uma fábrica de xarope de alto teor de frutose, usando também um processo com enzima imobilizada. Em 1982, entrou em funcionamento nos Estados Unidos uma planta para produção de adoçantes e uma outra para produzir glicose e galactose, ambas partindo de soro de leite e utilizando tecnologia de enzimas imobilizadas.

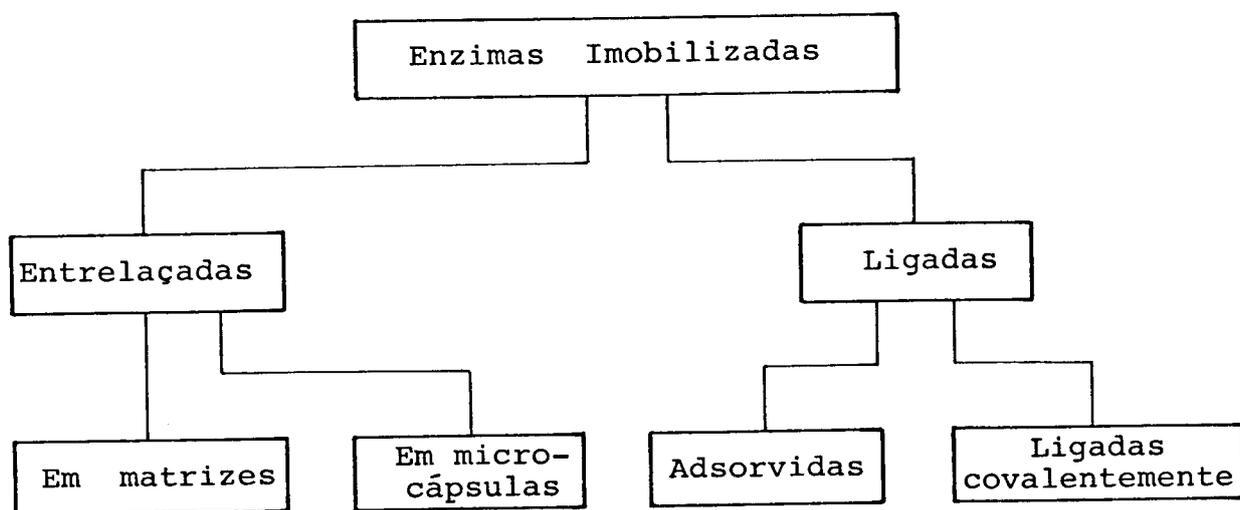
Enzimas e células imobilizadas tem larga aplicação em vários campos, tais como processos químicos, análises, tratamento médico, processamento de alimentos, afinidade cromatográfica, eletrodos enzimáticos e outros (10).

## II.2 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

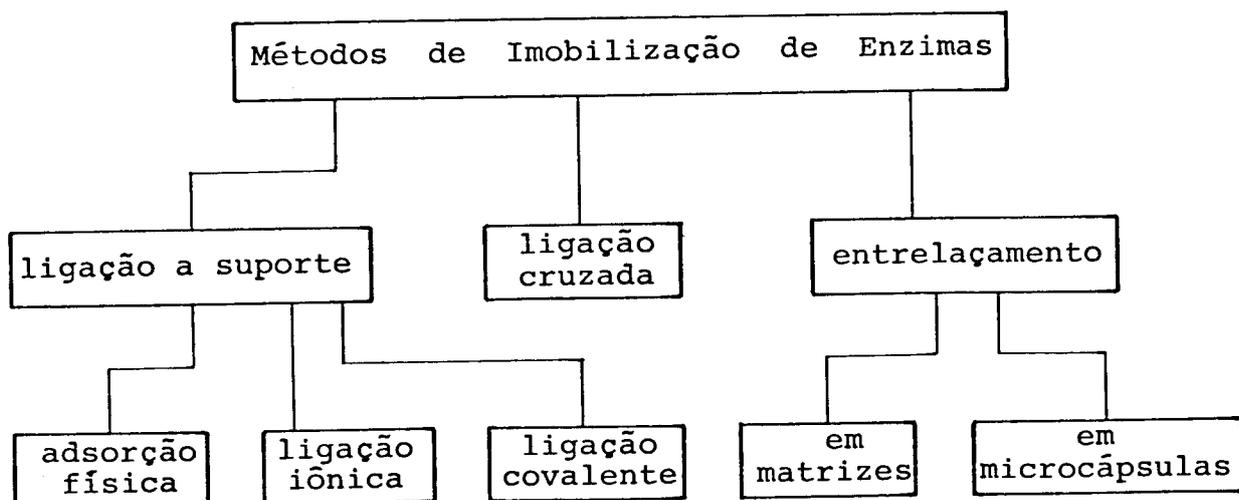
### II.2.1 - CLASSIFICAÇÃO

O termo enzima imobilizada foi recomendado na primeira conferência sobre "Engenharia de Enzimas", realizada em 1971, com a finalidade de uniformizar o tratamento dado ao assunto. Nessa conferência, enzimas imobilizadas foram definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente (10).

Na conferência anteriormente citada, foi proposta uma classificação para enzimas imobilizadas, como ilustra o esquema a seguir (47):



CHIBATA (10) classifica os métodos de imobilização de enzimas, da seguinte forma:



ZABORSKY (49) classifica os métodos de imobilização de enzimas em físicos e químicos. Métodos químicos são aqueles dependentes da formação de ligações covalentes, tais como: ligação covalente da enzima ao suporte, incorporação da enzima à cadeia de um polímero em crescimento e a ligação cruzada da enzima com um reagente multifuncional de baixo peso molecular. Os métodos físicos independem da formação de ligação covalente, tais como: adsorção, entrelaçamento dentro de matrizes insolúveis em água, entrelaçamento dentro de microcápsulas semi-permeáveis e contenção da enzima por membranas semi-permeáveis.

## II.2.2 - DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

### II.2.2.1 - ADSORÇÃO FÍSICA

Este é o mais antigo e provavelmente o menos entendido método de imobilizar enzimas. Originalmente, esse método foi usado por Nelson e Griffin em 1916 e desde então enzimas tem sido adsorvidas a polímeros orgânicos, vidros, sais minerais, óxidos metálicos e vários materiais silicosos, tais como bentonita e sílica coloidal (46).

A adsorção frequentemente causa pouca ou nenhuma mudança de conformação da enzima ou destruição de seu centro ativo. Se o suporte é adequado, esse método é simples e efetivo, tendo todavia a desvantagem de que a enzima adsorvida pode desprender do suporte durante a utilização, porque a força de ligação entre a enzima e o suporte é fraca (10).

### II.2.2.2 - LIGAÇÃO IÔNICA

Esse método é baseado na ligação iônica da proteína enzimática a suportes insolúveis em água, contendo resíduos trocadores de íons. Em alguns casos, não somente ligação iônica, mas também adsorção física tomam parte na ligação (10).

Esse método de imobilização de enzimas é simples e barato e foi o primeiro uso industrial bem sucedido de enzimas imobilizadas (46).

Segundo MAEDA e SUZUKI (25), imobilizar enzimas por processo iônico é simples e tem sido usados como suportes trocadores de íons, principalmente os derivados de DEAA-celulose.

Entre os métodos de preparar enzimas imobilizadas, o da ligação iônica a um suporte inerte tem algumas vantagens, incluindo facilidade de preparação e a possibilidade de reusar o suporte (31).

#### II.2.2.3 - MÉTODO DE LIGAÇÃO COVALENTE

Baseia-se na ligação de enzimas a suportes insolúveis em água por meio de ligações covalentes, através de grupos  $\alpha$  ou  $\epsilon$  amino, grupo carboxil, grupo  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  sulfidril, grupo hidroxil, grupo imidazol e grupo fenólico na molécula da enzima. Nas reações de ligação, esses grupos funcionais reagem com suportes contendo grupos reativos, tais como diazônio, azida ácida, isocianatos e haletos. As condições de reação requeridas para formação dessas ligações são relativamente complicadas e normalmente não brandas. Em alguns casos, a ligação covalente altera a estrutura conformacional e o centro ativo da enzima, resultando em diminuição de atividade e/ou mudanças de especificidade de

substrato. Todavia, a força de ligação entre enzima e suporte é forte e não ocorre perda da enzima (10).

WEETALL (46) afirma que a ligação covalente de uma enzima a um suporte é o método mais permanente de imobilização.

Segundo FILBERT e PITCHER (17), ligação covalente é comumente usada porque é um método muito versátil para imobilizar enzimas, produzindo derivados imobilizados estáveis.

Os métodos para conectar proteínas a suportes insolúveis em água por ligações covalentes são de grande interesse, sendo necessário todavia, que esses métodos não danifiquem extensivamente a matriz, nem inative a proteína (1).

A ligação de enzimas a suportes insolúveis por ligações covalentes, deveria ser realizada via grupos funcionais na proteína, que não sejam essenciais para sua atividade catalítica. A reação deveria ser, obviamente, realizada sob condições que não causem desnaturação (21).

#### II.2.2.4 - MÉTODO DA LIGAÇÃO CRUZADA

Esse método de imobilização é baseado na formação de ligações químicas, mas sem usar suportes insolúveis em água. A imobilização é realizada pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas da enzima por meio de reagentes bi ou multifuncionais, tais como glutaraldeído, derivados do isocianato, bisdiazobenzidina, N, N'-polimetileno bisiodoacetamida e N, N'-etilenobismaleimida. As reações de formação das ligações cruzadas são realizadas sob condições relativamente severas, afetando em al-

guns casos a conformação do centro ativo da enzima, levando a significantes perdas de atividade (10).

O agente de ligação cruzada é escolhido para ligar especificamente a grupos funcionais na proteína não envolvidos no sítio ativo, a concentrações adequadas ou para agregação com retenção de solubilidade ou completa insolubilização, com retenção de atividade (30).

O aspecto mais favorável para usar reagentes multifuncionais como agentes de insolubilização é que um reagente pode ser utilizado para preparar tipos bastante diferentes de derivados enzimáticos, tais como géis enzimáticos entrecruzados, membranas enzimáticas, derivados adsorvidos em monocamadas e conjugados insolúveis em água, ligados a polímeros. A preparação de um derivativo enzimático insolúvel em água, usando um reagente multifuncional é simples e dá derivados que são proteínas quase puras. Entre as desvantagens desse método estão a necessidade de controle rígido de pH, concentrações, etc, para atingir insolubilização eficiente; necessidade de uma grande quantidade de proteína ou coproteína; a frequente e inevitável inativação da enzima, causada por modificação química e a natureza gelatinosa desses derivativos enzimáticos tornando difícil usá-los em alguma operação em coluna (49).

WEETALL (46) também afirma serem as enzimas imobilizadas por ligações cruzadas geralmente gelatinosas e difíceis de manusear.

#### II.2.2.5 - ENTRELAÇAMENTO

## a). Entrelaçamento em Matrizes

O método de entrelaçamento em matrizes envolve a retenção de enzimas dentro dos espaços intersticiais de polímeros entrecruzados insolúveis em água, tais como poliacrilamida, álcool polivinílico e outros (10).

As moléculas de enzimas são fisicamente entrelaçadas dentro de uma matriz polimérica e não podem sair, mas moléculas de substrato e produto de tamanhos apropriados podem se transferir através e dentro dessa rede para assegurar uma transformação contínua (49).

Na oclusão de enzimas em matrizes poliméricas, ocorre a reação de polimerização dos monômeros em uma solução aquosa contendo a enzima. O bloco resultante do gel enzimico polimerizado, pode ser mecanicamente disperso em partículas de tamanho definido, que pode ser liofilizado. O método do entrelaçamento impõe o mínimo retraimento na enzima imobilizada e não envolve a formação de ligação covalente com a matriz suporte (21).

As vantagens do método de imobilizar enzimas por entrelaçamento em matrizes incluem sua simplicidade experimental, a necessidade de mínimas quantidades de enzima na imobilização e o fato de ser um processo físico. Nenhuma modificação química e nenhuma mudanças nas propriedades intrínsecas da enzima são esperadas. O método permite uma considerável variação de suportes e os derivados enzimicos obtidos poderão ser de formas físicas bastante diversas. Como principais desvantagens do entrelaçamento em matrizes, podem ser citadas a dificuldade de controle dos fatores experimentais para uma boa imobilização, inativação quími

ca e térmica da enzima durante a formação do gel, perda de enzima dos interstícios, devido principalmente à formação de grandes poros e a limitação de uso apenas a substratos de baixo peso molecular (49).

b). Entrelaçamento em Microcápsulas

Proteínas e outros materiais podem ser imobilizados dentro de microcápsulas preparadas de polímeros orgânicos, de tal modo que a macromolécula entrelaçada não possa escapar, mas compostos de baixo peso molecular podem entrar e sair das cápsulas por difusão através da membrana (30).

Para a preparação de microcápsulas enzimáticas são requeridas condições extremamente bem controladas em comparação com a microencapsulação de outros produtos químicos (10).

As cápsulas de enzimas imobilizadas podem ser preparadas desde tamanhos menores que  $1\mu$ , até vários microns. A membrana previne a perda da enzima, permitindo que substratos de moléculas pequenas alcancem a enzima (46).

II.2.2.6 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Segundo FILBERT e PITCHER (17), não há um suporte nem um método universal para imobilizar enzimas, e nenhum reator perfeito que possa ser recomendado para todos os sistemas enzimáticos imobilizados. Somente quando a aplicação ou o uso dos mesmos forem claramente definidos, pode o suporte, o método de ligação e o projeto do reator serem propriamente escolhidos.

CHIBATA (10) apresenta o seguinte resumo geral relativo aos métodos de imobilização de enzimas:

Característica	MÉTODO DE LIGAÇÃO				
	adsorção física	ligação iônica	ligação covalente	ligação cruzada	entrelaçamento
Preparação	fácil	fácil	difícil	difícil	difícil
Atividade enzimática	baixa	alta	alta	moderada	alta
Especificidade de substrato	imutável	imutável	mutável	mutável	imutável
Força ligação	fraca	moderada	forte	forte	forte
Regeneração	possível	possível	impossível	impossível	impossível
Aplicabilidade geral	baixa	moderada	moderada	baixa	alta
Custo imobilização	baixo	baixo	alto	moderado	baixo

O suporte escolhido deverá ser estável em solução e não deteriorar sob as condições operacionais, químicas e físico-químicas da solução. Também não deverá mudar de forma ou tamanho durante o uso, ser mecanicamente rígido e apresentar pouca compactação em operações contínuas com alto fluxo em reatores de leito fixo (17).

Um grande número de suportes são atualmente usados para imobilizar enzimas. A escolha do suporte é determinada pelas condições sob as quais a enzima será usada e pelo método de ligação envolvido (5).

## II.3 - INVERTASE

### II.3.1 - INTRODUÇÃO

Invertase, sacarase ou  $\beta$ -frutofuranosidase, é uma das mais antigas enzimas conhecidas, sendo encontrada em muitas plantas e microrganismos. Ela rompe a ligação  $\beta$ -frutofuranosídica, liberando  $\beta$ -frutose (22).

Segundo WISEMAN e WOODWARD (48), invertase obtida a partir de levedura, catalisa a hidrólise de sacarose a uma mistura equimolar de glicose e frutose (açúcar invertido). O princípio ativo, causador da inversão, foi descoberto em 1833 e isolado em 1860 por Berthelot. Obtem-se duas formas de invertase de levedura, a extracelular, com cerca de 80% do total da célula e a forma intracelular. A forma extracelular é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a intracelular é destituída dos mesmos.

A invertase encontra aplicações na produção de uma variedade de chocolates e produtos de confeitaria e na produção de açúcar invertido (48). É muito utilizada na indústria de alimentos porque a hidrólise enzimática de soluções concentradas de sacarose dá origem a xaropes mais doces, além de formar monossacarídeos mais solúveis e mais difíceis de se cristalizarem (16).

As duas formas de invertase, a intra e a extracelular apresentam atividades específicas similares e a atividade ótima se encontra na faixa de pH entre 3,5 e 5,5, quando hidrolisam soluções de sacarose de concentração de 1 a 15%. A temperatura ótima de ação dessa enzima depende do grau de purificação da mesma

e da concentração do substrato, tendo sido encontrados valores entre 23°C e 55°C (16).

### II.3.2 - IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE

#### II.3.2.1 - INTRODUÇÃO

Invertase pode ser imobilizada por vários métodos, sendo os inicialmente usados a adsorção em carvão e em hidróxido de alumínio, com retenção de parte de sua atividade catalítica relativa a sacarose (33, 34).

Nos últimos anos vários métodos de imobilização e vários suportes diferentes tem sido utilizados para imobilizar essa enzima (27). Foi covalentemente ligada a vidro poroso (28, 37), copolimerizada com acrilamida (22), entrelaçada em fibras (15, 27), covalentemente ligada a hornblenda por ligação com metal (19, 43), adsorvida em quitina (42), entrelaçada em matrizes de gel de manana (26), além da imobilização em resinas.

#### II.3.2.2 - INVERTASE IMOBILIZADA EM RESINAS E SUAS CARACTERÍSTICAS

SUZUKI et alii (41) imobilizaram invertase de levedura por ligação iônica a DEAE-celulose, tendo conseguido retenção de cerca de 50% da atividade correspondente à forma livre. Encontrou um pH ótimo de 5,5 para a enzima livre e 3,4 para a forma imobilizada.

BOUDRANT e CHEFTEL (6) estudaram a imobilização de invertase em resinas trocadoras de íons. Nesse estudo, verificaram a

influência do pH na imobilização, observando que aliado a adsorção física, ocorreu um processo de ligação iônica, conseguindo retenção de atividade de até metade daquela da enzima livre. Verificaram que os complexos invertase-resina catiônica apresentaram valores de pH ótimo deslocado para o lado básico, relativo ao da enzima livre e os complexos invertase-resina aniônica apresentaram pH ótimo deslocado para a faixa ácida, quando comparados com o da forma solúvel da enzima. Esses autores estudaram a hidrólise de uma solução de sacarose com invertase ligada a Amberlite IRA-93, em reator tubular, observando a não desativação da coluna após oito dias de processamento contínuo.

DICKENSHEETS et alii (14) estudaram a imobilização de invertase de Candida utilis, ligada ionicamente a celulose porosa, encontrando máxima atividade a valores de pH entre 4,0 e 5,4, com a temperatura em torno de 65°C.

Usando resina trocadora de íons, tipo poliamina, KOBAYASHI e MOO-YOUNG (23) imobilizaram invertase covalentemente e a utilizaram em um reator de leito fixo. Nesse reator, estudaram a cinética do processo, constatando que os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten não foram constantes, verificando uma diminuição nos mesmos com o aumento da taxa de fluxo.

USAMI, NODA e GOTO (45) estudaram a invertase ligada ionicamente a DEAE-celulose, constatando que esta reteve 31% da atividade catalítica da forma solúvel e uma temperatura ótima menor, ou seja, cerca de 50°C para a última (forma solúvel) e 35°C para o complexo imobilizado. Em processo contínuo de inversão de solução de sacarose, as constantes de velocidade de reação se mostraram dependentes da taxa de fluxo, diminuindo com o aumen-

to da mesma.

OOSHIMA et alii (36) ligaram invertase por processo iônico à resina catiônica, Amberlite IRA-94, observando que nesse processo de ligação, o complexo enzima-resina apresentou atividade de mais alta que quando ligada covalentemente à mesma resina, porém com estabilidade térmica menor do que aquela. A partir desses resultados, concluem que no método de ligação iônica, os sítios ativos da enzima mantem-se menos alterados que no covalente, porém sujeitos a desnaturação térmica mais facilmente.

MAEDA e SUZUKI (25) imobilizaram invertase ionicamente a DEAA-celulose, com retenção máxima de 45% da atividade da enzima livre. Verificaram ser o complexo DEAA-celulose-invertase bastante estável no intervalo de pH de 5 a 7, a forças iônicas da ordem de 0,02. A temperatura ótima encontrada para essa enzima imobilizada foi de 55°C e quando em uso contínuo em coluna a 30°C, manteve sua atividade catalítica praticamente constante por nove dias. As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_m$  foram praticamente as mesmas, tanto para a enzima livre, quanto para a imobilizada em operações de batelada..

Resina tipo fenol-formaldeído mostrou-se um bom suporte para imobilização de invertase e outras enzimas, com obtenção de complexos resina-enzima de alta atividade. Por um processo misto de adsorção e ligação covalente com glutaraldeído, visando prolongar a atividade catalítica, obteve-se invertase imobilizada que apresentou uma atividade máxima de 600  $\mu$  mol de sacarose por minuto por grama de resina drenada, a 45°C e pH igual a 4,5, usando solução 0,4M de sacarose (35).

$\beta$ -frutofuranosidase de tomate adsorvida em CM-celulose reteve apenas 25% da atividade original, não se eluindo do suporte a valores de pH abaixo de 5. A enzima imobilizada apresentou o mesmo pH ótimo da nativa, ao usar sacarose como substrato e foi bastante estável em relação à temperatura até 35°C, desativando-se rapidamente a partir de 40°C (32).

FILIPULSON e HORNBY (18) ligaram  $\beta$ -frutofuranosidase de levedura covalentemente a uma matriz de poliestireno, verificando um pH ótimo do complexo resina-enzima entre 4,5 e 5,0 e uma elevação do valor de  $K_m$ , relativo ao da enzima solúvel. Essa preparação manteve sua atividade inalterada por várias semanas.

USAMI, HASEGAWA e KARASAWA (44) imobilizaram invertase por vários métodos, utilizando diferentes suportes, obtendo melhor resultado com DEAE-celulose, por ligação iônica, com 31% de atividade relativa à enzima solúvel. A enzima nativa apresentou uma temperatura ótima de 55°C e o complexo obtido ionicamente foi bastante estável até 40°C e apresentou uma temperatura ótima entre 30°C e 40°C.

#### II.4 - REATORES PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS

Segundo MESSING (30), não há um reator ideal ou universal para enzimas imobilizadas. O projeto e operação do reator para as mesmas, todavia, é o fator mais crítico nessa tecnologia. Três configurações básicas de reator tem sido propostas para utilização com enzimas imobilizadas em processamento contínuo, que são o reator contínuo de tanque agitado, ou CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), o reator de leito fluidizado e o reator de leito fixo ou reator tubular. A tomada de uma decisão com

respeito ao tipo de reator, deve também considerar as condições de temperatura, taxas de fluxo, controle e ajuste do pH, força iônica, concentração de substrato, efeitos de difusão, etc.

FILBERT e PITCHER (17) afirmam que o reator de leito fixo ou reator de coluna recheada é o mais difundido e melhor conhecido para enzimas imobilizadas. Os reator descontínuos são usados somente em pequena escala, o de leito fluidizado está recebendo alguma atenção, devido à sua capacidade em manusear alimentação contendo material particulado e o CSTR é menos eficiente para a maioria dos processos que envolvem cinéticas simples de ordem maior que zero.

Para LILLY e DUNNILL (24), as operações com enzimas, em batelada, permitem grande flexibilidade. A operação contínua apresenta diversas vantagens, como: menor custo da mão-de-obra, facilidade de controle automático, maior constância nas condições de reação, obtendo-se maior uniformidade na qualidade dos produtos.

Conforme os dois autores mencionados acima, a escolha do reator depende da cinética da reação e de várias condições operacionais. Para uma simples enzima, cuja cinética é descrita pela equação de Michaelis-Menten, teoricamente, o CSTR é menos eficiente (produto formado por unidade de enzima) que o reator tubular, exceto para concentrações de reagente muito altas e baixas conversões a produto. Se ocorre inibição da reação pela concentração do produto, então CSTR se torna menos eficiente ainda relativamente ao reator tubular. Porém se ocorre inibição pelo reagente, o CSTR torna-se mais favorável. Condições instáveis, todavia, tem sido verificadas para reações catalisadas

por enzimas inibidas pelo reagente em CSTR. Se a catálise heterogênea é limitada pela velocidade de transferência de massa à superfície do catalisador, a taxa de fluxo do reagente nessa superfície pode ser melhorada, aumentando a agitação em um CSTR e a velocidade de fluxo linear em um reator de leito fixo.

Segundo WEETALL (46), existem dois tipos básicos de sistemas de reatores aplicáveis à tecnologia de enzima imobilizada. Um é o reator de tanque agitado, podendo ser operado contínuo ou descontinuamente. A velocidade de reação nesses reatores é afetada pela velocidade de agitação e taxa de fluxo, se operado continuamente. Uma adaptação do reator de tanque agitado é o reator de leito fluidizado, no qual o substrato flui através do leito de enzima imobilizada, no sentido ascendente, numa velocidade suficiente para fluidizar o leito. O outro tipo de reator é o tubular, usado como colunas e deve ser usado para substratos de baixa viscosidade e alta solubilidade. Geralmente, um sistema de coluna tem maior eficiência que reatores de tanques agitados e são preferíveis, quando possível.

Para CHIBATA (10), o reator de tanque agitado, é útil para soluções de substrato de alta viscosidade e para enzimas imobilizadas com atividade relativamente baixa, podendo ser contínuos ou descontínuos. Os reatores de leito fixo, são os mais utilizados para enzimas e células imobilizadas, sendo encontrados com fluxo descendente, ascendente e com reciclo. Quando a velocidade linear da solução de substrato afeta a velocidade de reação, o método do reciclo é vantajoso. Onde o fluxo descendente causa compressão no leito, é preferível o ascendente. O reator de leito fluidizado é indicado para soluções de substrato de alta viscosidade e quando um substrato ou produto gasoso é usa-

do. Outros tipos de reatores, tais como membranas de ultra-filtração, tubos de enzima, filmes de enzimas e outros tem sido usados, mas são poucos e aplicados a casos isolados.

PATWARDHAN e KARANTI (38) afirmam que um reator de leito fixo pode ser mais interessante que um CSTR, para alcançar alta conversão com enzimas imobilizadas. As resistências à transferência de massa tem um pronunciado efeito em parâmetros cinéticos, tais como a constante aparente de Michaelis-Menten.

Segundo LILLY e DUNNILL (24), na prática, os reatores segundo suas condições de fluxo se situam entre os dois casos ideais, o de perfeita mistura, como no reator de tanque agitado ideal e o de nenhuma mistura na direção do fluxo, como no reator tubular ideal.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 - MATERIAL

##### III.1.1 - ENZIMA

Invertase de levedura, grau comercial, com 104,4 mg de proteína por ml de enzima foi obtida de Miles-Seravac Laboratories Ltd (England). Em todos os experimentos realizados, foi usada diluída na razão 1:50, ou seja, com 2,088 mg de proteína por ml de enzima.

##### III.1.2 - RESINAS

Dowex 1-X4, resina trocadora de ânions fortemente básica, tipo estireno amônio quaternário, grupo funcional  $-N^+(CH_3)_3$ , na forma cloreto, com grande porosidade, capacidade de troca de 3,5 meq por grama de resina seca, granulometria, entre 20 - 50 mesh, foi obtida de Bio-Rad Laboratories.

Amberlite IRA-400, resina trocadora de ânions fortemente básica, na forma cloreto, grupo funcional  $-N^+(CH_3)_3$ , granulometria de 20 - 50 mesh foi obtida da Fluka AG.

Rexyn 101(H), resina trocadora de cátions, fortemente ácida, grau analítico, copolímero de poliestireno sulfonado, na forma hidrogeniônica, grupo funcional  $-SO_3H$ , com média porosidade, granulometria de 16 - 50 mesh, com capacidade total de troca de 4,7 meq por grama de resina seca foi obtida da Fisher

Cientific Company.

Duolite S - 761 (equivalente a Duolite S - 30), resina tipo fenol-formaldeído, adsorvente e trocadora de íons, foi obtida da Diamond Shamrock Corporation.

### III.1.3 - PRODUTOS QUÍMICOS

A sacarose utilizada em todos os experimentos como substrato foi um produto PA, obtido da Mallinckrodt, Quimis.

Todos os demais reagentes utilizados foram produtos PA.

### III.1.4 - VIDRARIA DE LABORATÓRIO

### III.2 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Peneirador vibratório, marca Produtest, modelo T e peneiras da série Tyler.

- Termostato "Ultra Thermostat", marca MTA Kutez, tipo 606.

- Agitador, modelo A, marca Alltest.

- Termostato "Thermostat 01", marca Veb Prufgerate-Werk.

- Bomba Peristáltica, modelo P203, marca Milan.

- Potenciômetro, marca Analytical Measurements.

- Espectrofotômetro modelo Coleman 295, da Perkin-Elmer.

- Balança Analítica, precisão 0,0001g, marca Unimatic.

- Bomba de Vácuo, marca Primar, modelo 141.

- Coluna de vidro com diâmetro interno 0,85cm, altura 46 cm, com jaqueta para circulação de água e controle da temperatura, com placa porosa para retenção do leito de enzima imobilizada.

### III.3 - MÉTODOS

#### III.3.1 - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O conteúdo proteico da invertase foi determinado por um método do Biureto modificado, conforme boletim técnico do laboratório Wiener (9), utilizando como padrão de proteínas uma solução de albumina e globulinas em estado natural, denominado como soro padrão, com 47 mg de proteína, por ml de soro. O reativo EDTA/Cu utilizado, também foi obtido do mesmo laboratório.

Esse método, constou basicamente das seguintes etapas:

- a). Foram preparados tres tubos espectrofotométricos, o branco, o padrão contendo uma amostra de soro padrão e o tubo teste, contendo uma amostra da solução de invertase, da qual se pretendia determinar o conteúdo proteico, conforme ilustra a tabela a seguir:

Substância	Branco	Padrão	Teste
Água	50 $\mu$ l	-	-
Soro Padrão	-	50 $\mu$ l	-
Invertase	-	-	50 $\mu$ l
Reativo EDTA/Cu	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

- b). Os tubos foram incubados durante 15 minutos a 37°C, após esse tempo, resfriados até a temperatura ambiente e determinadas as absorbâncias ou densidades óticas do padrão e teste, em relação ao branco, a 540 nm.

c). O conteúdo proteico da invertase foi determinado pela relação:

$$\text{Conteúdo proteico (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 47$$

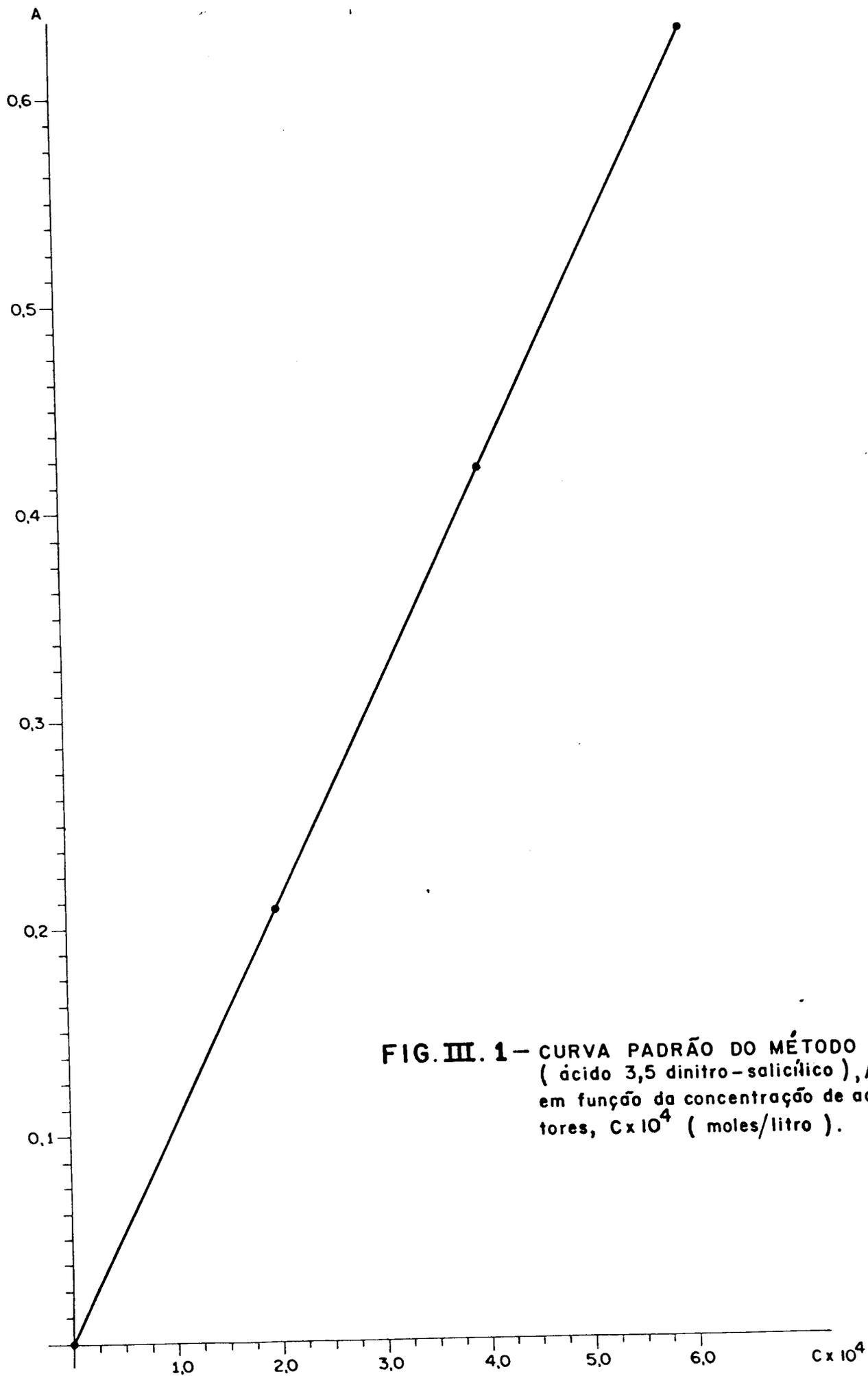
### III.3.2 - MÉTODO DNS DE DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

A curva padrão do método de dosagem de açúcares redutores pelo DNS (ácido 3,5 dinitro-salicílico), foi construída conforme CLARK (12), no intervalo de linearidade do método. A curva padrão (absorbância ou densidade ótica a 540 nm, em função da concentração de açúcares redutores), apresentada na figura III.1, foi construída a partir dos dados apresentados na tabela a seguir:

Substância	Volume em mililitros			
	Branco	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3
Solução 0,005 M de glicose 0,005 M de frutose	-	0,4	0,8	1,2
Solução 0,3 M sacarose	1,0	1,0	1,0	1,0
Água	2,0	1,6	1,2	0,8

A cada tubo (branco e padrões), foram adicionados 2,0 ml do reagente DNS, desenvolvida cor, por fervura durante 5 min, resfriados, diluídos a 20,0 ml e determinadas as densidades óticas.

O padrão mais concentrado, o de número 3, após diluição a 20,0 ml, apresentou uma concentração igual a  $6,0 \times 10^{-4}$  moles de açúcar redutor, por litro de solução. Em todas as determinações de açúcares redutores efetuadas, procurou-se, através de diluições adequadas das amostras, trabalhar com concentrações dos mesmos, menores que  $6,0 \times 10^{-4}$  M.



**FIG. III. 1** — CURVA PADRÃO DO MÉTODO DNS (ácido 3,5 dinitro-salicílico), A (absorbância), em função da concentração de açúcares redutores,  $C \times 10^4$  (moles/litro).

### III.3.3 - PREPARAÇÃO DE TAMPÕES

Para valores de pH de 1,5 a 2,4, foram utilizados tampões (KCl + HCl). Esses tampões foram preparados pela mistura de 25 ml de solução 0,2M de KCl com  $x$  ml de solução 0,2M de HCl, diluindo a mistura a 100 ml. Os valores de  $x$  foram 20,7; 6,5 e 3,9 ml, respectivamente, para obtenção dos tampões de pH iguais a 1,5; 2,0 e 2,4 (29).

Para valores de pH de 3,0 a 5,5, foram usados tampões aceto-ácido acético 0,05M, preparados conforme CONN & STUMPF (13).

No caso de pH de 6,0 a 8,0, foram utilizados tampões fosfato. Esses tampões foram preparados pela mistura de 50ml de solução 0,1M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  com  $x$  ml de solução 0,1M de NaOH, diluindo a mistura a 100 ml. Os valores de  $x$  foram 5,6; 13,9; 29,1; 40,9 e 46,1 ml, respectivamente, para obtenção dos tampões com valores de pH iguais a 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 (29).

### III.3.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade, tanto da enzima livre, como imobilizada foi determinada pela dosagem do açúcar redutor formado, pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico (DNS) (12).

Em todos os experimentos de determinação de atividade de invertase livre, a mistura de reação foi uma solução de sacarose numa dada concentração, tamponada com 0,5 ml de solução tampão no pH do experimento e após estabilização da temperatura no valor desejado, foi adicionado 0,1 ml de enzima, perfazendo um volume total de reação de 3,0 ml. Após um tempo de reação de 5 min

na temperatura desejada, paralisou-se a reação pela adição de 2 ml do reagente DNS e logo a seguir os tubos de ensaio contendo a mistura foram colocados em um banho de água fervente por 5 min, resfriados, diluídos adequadamente e determinado o açúcar redutor formado em cada tubo.

No caso de enzima imobilizada, foram efetuados dois tipos de testes de atividade, sendo um em processo em batelada e outro em processo contínuo. No processo em batelada, amostras de 0,2 g da enzima imobilizada (43) foram adicionadas a uma solução formada pela mistura de 2 ml de solução de sacarose 0,06 M e 1,0 ml da solução tampão de pH desejado no experimento já estabilizada na temperatura em questão. Após 5 min de reação, foi separada a enzima imobilizada por uma decantação simples e adicionado 2,0 ml do reagente DNS, deixando os tubos em um banho de água fervente por 5 min e determinado a seguir o açúcar redutor presente.

Nos experimentos envolvendo enzima livre e imobilizada operando uma batelada, as reações ocorreram em tubos de ensaio, dentro de um Banho-Maria de temperatura controlada, no termostato "Ultra-thermostat", já citado, uniformizando a temperatura da água do banho com um agitador de hélice, marca Alltest, também já mencionado, conforme fotos III.1 e III.2.

No caso da enzima imobilizada em operação contínua em uma coluna, a atividade foi determinada medindo o açúcar redutor formado em uma amostra colhida na saída da coluna, numa vazão bem definida, nas condições de concentração de sacarose na alimentação, pH e temperatura escolhidos para o experimento. Nesse caso, uma amostra de 1,0 ml do produto, misturado com 2,0 ml de água e com 2,0 ml do reagente DNS, foi colocado em banho de água ferven



FOTO III.1

Mar. 83

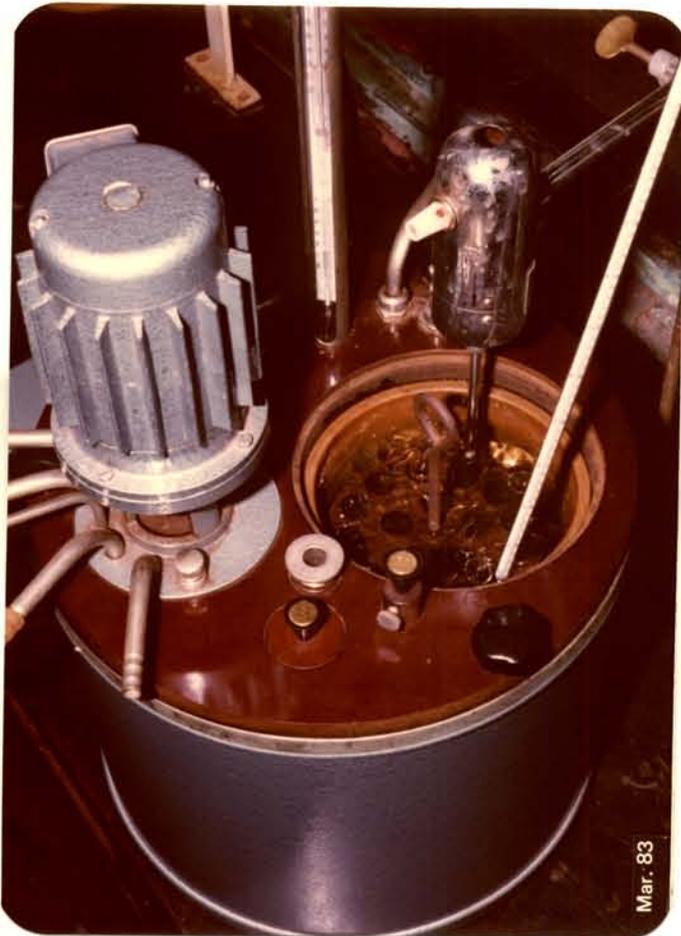


FOTO III.2

Mar. 83

te por 5 min e após diluição adequada, determinado o açúcar re-  
dutor presente na amostra inicial.

Em todos os experimentos de determinação de atividade, as  
leituras de densidade ótica foram feitas dentro do intervalo de  
linearidade do método, que é para concentrações de açúcares redu-  
tores menores ou iguais a  $6,0 \times 10^{-4}$  moles por litro (12).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo  
aquela quantidade de invertase que hidrolisa 1  $\mu$ mol de sacarose  
por minuto, sob condições definidas (40).

### III.3.5 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS, $K_m$ e $V_m$ DA ENZIMA LIVRE

Para determinar  $K_m$  e  $V_m$ , foi efetuada uma série de experi-  
mentos de determinação de atividade de invertase solúvel, como  
indicado no ítem III.3.4, a pH igual a 5,0 e temperatura igual a  
25°C, variando a concentração de sacarose de 0,33 a 0,01 M (12).

### III.3.6 - TEMPERATURA ÓTIMA DA INVERTASE LIVRE

A temperatura ótima de ação da invertase solúvel foi encon-  
trada, determinando a atividade enzimática da série de experimen-  
tos, conforme indicado em III.3.4, mantendo a concentração ini-  
cial de sacarose na solução de reação igual a 0,04M, mantendo o  
pH em 5,0 e variando a temperatura de reação de 25 a 65°C (12).

### III.3.7 - pH ÓTIMO DA INVERTASE LIVRE

Mantendo constantes a temperatura em 25°C, a concentração

inicial de sacarose da mistura de reação em 0,04 M, foram efetuados experimentos determinando a atividade de invertase para os valores de pH de reação variando de 1,5 a 8,0 (12).

### III.3.8 - ATIVAÇÃO DAS RESINAS PARA IMOBILIZAÇÃO

#### III.3.8.1 - ATIVAÇÃO DE DOWEX 1 - X4 E AMBERLITE IRA-400

Essas duas resinas são ambas trocadoras aniônicas fortemente básicas, e por isso, sofreram o mesmo processo de ativação. A resina foi colocada em uma coluna, através da qual fluiu-se solução 2 M de NaOH, na proporção de dois volumes de solução por volume de leite, durante aproximadamente 20 minutos e a seguir foi lavada com cinco volumes de água destilada por volume de leite, durante 30 minutos. A seguir a coluna contendo a resina já tratada com solução de NaOH, foi atravessada por uma solução 2 M de HCl, na proporção de dois volumes por volume de leite, durante 20 minutos, sendo a seguir lavada com água destilada, correspondente a cinco volumes de leite, durante 30 min. Com esse tratamento de ativação, a resina adquire a forma cloreto (8).

#### III.3.8.2 - ATIVAÇÃO DE REXYN 101 (H)

Essa é uma resina catiônica fortemente ácida, com grupo funcional  $-SO_3H$  e pode ser usada na forma hidrogeniônica e na forma sódica.

Para uso da resina na forma hidrogeniônica, a mesma sofreu o seguinte tratamento: colocada num bequer, foi embebida com cerca do dobro do seu volume em HCl 2M, durante 30 - 60 minutos, agitando ocasionalmente. A seguir, a resina foi colocada em uma

coluna, pela qual fluiu HCl 2M, durante 10 - 15 minutos, num volume igual ao do leito. A seguir, foi lavada, passando pela coluna um volume de água cerca de seis vezes o do leito (3).

A resina na forma sódica foi preparada através do tratamento anterior, seguido pela passagem de solução 2M de NaOH na coluna contendo a resina, em quantidade igual a dois volumes de leito durante 20 minutos e a seguir lavada com cinco volumes de água (8).

### III.3.8.3 - ATIVAÇÃO DE DUOLITE S-761

Para essa resina não se dispunha de dados técnicos, que a definissem como aniônica ou catiônica. Foi seguido o método de ativação usado por OLSON e STANLEY (35) para Duolite S-30. Esse tratamento consistiu em lavagem da resina com água destilada, seguida de pernoite em solução de NaCl 0,1M, numa relação de quatro volumes de NaCl para cada volume de resina. Após o pernoite, a resina foi lavada com água destilada, correspondente a seis vezes o volume da mesma, drenada utilizando um ligeiro vácuo e usada para imobilização.

### III.3.9 - IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE

#### III.3.9.1 - UTILIZANDO AS RESINAS DOWEX 1 - X4 E

#### AMBERLITE IRA - 400

Foram efetuadas duas séries de experimentos, utilizando as duas resinas na forma básica, ou seja, na forma  $\text{OH}^-$ . Cada teste de imobilização, realizou-se em tubo de ensaio, contendo 0,2 g da resina ativada e lavada com solução tampão no pH a ser usado no

experimento, adicionado de 1,0 ml do referido tampão e 1,0 ml da enzima. Variou-se o pH dos experimentos de 3,0 a 7,0 (6). A mistura foi mantida 12 h a 25°C e após esse tempo, a resina foi lavada e determinada sua capacidade em hidrolisar sacarose.

Uma modificação do método de imobilização citado anteriormente, foi realizada quando, após as 12 h a 25°C, foi acrescentado 0,5 ml de glutaraldeído em cada tubo, deixando mais 3 h a 25°C e 8 h na temperatura de 3°C, visando estabilizar a enzima ao suporte por ligação cruzada (35). Também nesses experimentos variou-se o pH de 3,0 a 7,0.

### III.3.9.2 - UTILIZANDO A RESINA REXYN 101(H)

Com Rexyn 101 (H) na forma hidrogeniônica, foi efetuada uma série de testes de imobilização, nos quais a mistura de 0,2 g de resina ativada e estabilizada no pH correspondente com 1,0 ml do tampão e 1,0 ml da enzima permaneceu 12 h a 25°C, sendo a seguir lavada com bastante água destilada para remoção de alguma enzima não ligada e determinada a atividade da enzima imobilizada. O pH dos testes variou de 3,0 a 7,0 (6).

Com a mesma resina na forma sódica, foi feita a mesma série de testes mencionada para a forma hidrogeniônica e uma variação, na qual, após 12 h de contato entre enzima e resina, foi adicionado a cada tubo, 0,5 ml de glutaraldeído, deixando mais 3 h a 25°C e mais 8 h a 3°C, após o que, a resina foi lavada e determinada sua atividade (35).

### III.3.9.3 - UTILIZANDO DUOLITE S-761

Invertase foi imobilizada nessa resina, utilizando um procedimento análogo ao referido por BOUDRANT e CHEFTEL (6), que estudaram a influência do pH na imobilização dessa enzima em algumas resinas aniônicas e catiônicas e também análogo ao utilizado por OLSON e STANLEY (35), que estudaram a influência de glutaraldeído na imobilização de enzimas em Duolite S-30.

Os testes de imobilização foram realizados em amostras de 0,2 g da resina ativada, lavadas no tampão correspondente, adicionadas a uma mistura formada de 1,0 ml do referido tampão e 1,0 ml da enzima. Os tubos-teste permaneceram 12 h à temperatura de 25°C e mais 3 h a 3°C. Variou-se o pH dos experimentos de 3,0 a 7,0. Após esse tempo de 15 h, as resinas foram lavadas determinando-se as atividades das mesmas.

Uma nova série de testes de imobilização foi realizada, em que, após o teste de 15 h, foi adicionado 0,5 ml de glutaraldeído em cada tubo, deixado mais 8 h na temperatura de 3°C, e após esse tempo, lavada a resina e determinada a atividade.

Testes com Duolite S-761 a pH = 3,0, foram realizados para determinar a quantidade de enzima a ser utilizada por grama de resina, assim como o tempo de imobilização.

A uma série de tubos de ensaio contendo 0,2 g de resina ativada, já lavada com o tampão de pH 3,0, foi adicionado quantidades de enzima, variando de 0,5 a 2,5 ml. Em todos os tubos foi adicionado 1,0 ml de solução tampão de pH 3,0 sendo o volume completado a 4,0 ml, pela adição de água destilada.

Visando estudar o tempo de imobilização, a pH igual a 3,0, e 25°C, utilizou-se 1 ml de enzima para cada amostra de 0,2 g da resina ativada. Em um experimento verificou-se a atividade da enzima imobilizada após 8,0 horas de contato, em um segundo a 10,0 horas, em um terceiro a 12,0 horas e em um quarto manteve-se a temperatura a 25°C durante 12 horas e mais 3,0 horas a 3°C.

### III.3.10 - INVERTASE IMOBILIZADA EM DUOLITE S-761, SEM O USO DE GLUTARALDEÍDO

#### III.3.10.1 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS Km' E Vm'

Os parâmetros cinéticos Km' e Vm' foram determinados a partir da atividade de amostras de 0,2 g da enzima imobilizada drenada a pH igual a 5,0 e à temperatura de 25°C, variando as concentrações iniciais de sacarose de 0,33 a 0,01 M (28).

#### III.3.10.2 - TEMPERATURA ÓTIMA

A temperatura ótima do complexo Duolite S-761-invertase foi encontrada a partir das atividades de amostras drenadas de 0,2 g de enzima imobilizada, a pH igual a 5,0 e na concentração inicial de sacarose igual a 0,04M, variando a temperatura de 18 a 55°C (28).

#### III.3.10.3 - pH ÓTIMO

As atividades de amostras de 0,2 g de invertase imobilizada, drenadas, foram determinadas à temperatura de 25°C, numa concentração inicial de sacarose igual a 0,04M, variando o pH dos experimentos de 1,5 a 7,5 (28).

### III.3.11 - PREPARAÇÃO DA COLUNA DE INVERTASE IMOBILIZADA

Foi escolhido para reator, o tipo leito fixo, devido ao fato de apresentar maiores facilidades de operação e controles.

Após efetuar a análise granulométrica da resina Duolite S-761 (7), uma massa de 8,0 g da mesma foi utilizada para imobilização de invertase, sem o tratamento com glutaraldeído, a pH 3,0, utilizando 40 ml de enzima, seguindo o procedimento descrito no item III.3.9.3.

Após imobilização, uma coluna de 0,85 cm de diâmetro interno, foi recheada com o complexo resina-invertase, apresentando uma altura de leito de 12,5 cm, tomando-se cuidado para não formar bolhas, obtendo um leito com aparência bastante uniforme, conforme foto nº III.3.

No início de operação, essa coluna apresentou uma taxa de fluxo máxima de 30 cm<sup>3</sup>/min, diminuindo para 25,5 cm<sup>3</sup>/min após um dia de uso contínuo, havendo também uma diminuição da altura do leito para 12 cm, valores esses que se mantiveram até o final dos experimentos.

Após estabilizada a altura do leito, foi determinada sua porosidade, obtida pela razão entre o volume de líquido retido no leito e o volume de líquido contido na coluna, no espaço correspondente ao leito, mas sem esse (7). Para garantir que todo o líquido retido no leito fosse retirado para ser medido, foi usada uma bomba de vácuo.

A alimentação de solução de sacarose à coluna foi feita u-

sando uma bomba peristáltica, já especificada e a temperatura foi controlada e mantida a  $(28 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  através de um termostato, pela circulação da água do banho do mesmo através da jaqueta da coluna.

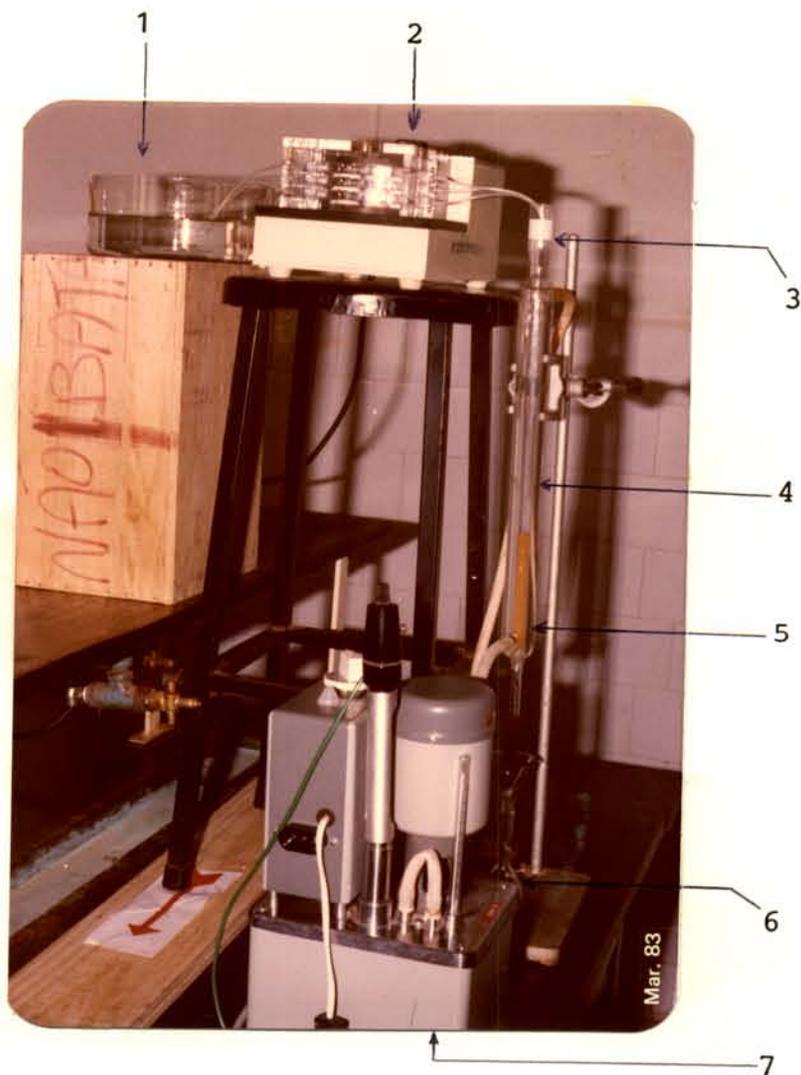


FOTO III.3

Legenda: 1 = depósito de solução de sacarose; 2 = bomba peristáltica; 3 = nível de líquido na coluna; 4 = coluna com camisa; 5 = leito de enzima imobilizada; 6 = balão volumétrico, para recolher amostras; 7 = termostato.

### III.3.12 - ESTUDO DA CONVERSÃO EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE LINEAR DE FLUXO

Foi feito um estudo da conversão a várias velocidades lineares de fluxo através da coluna, para as concentrações de sacarose na alimentação de  $1,0 \times 10^{-1}$ ;  $5,0 \times 10^{-2}$ ;  $2,5 \times 10^{-2}$  e  $1,0 \times 10^{-2}$  M, à temperatura de  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ , sem controle do pH, uma vez que as soluções de sacarose apresentaram pH entre 6,5 e 6,8, seguindo um procedimento análogo àquele seguido por GELF et alii (20).

Foi realizada uma série de experimentos. Após estabilizada a taxa de fluxo através da coluna, mantendo o nível de líquido acima do leito, fixo em 34,0 cm, e após ter passado pela coluna um volume de solução correspondente a seis vezes o seu volume, era recolhida uma amostra de  $100,0 \text{ cm}^3$  em um balão volumétrico, medindo o tempo gasto para tal. As velocidades lineares de fluxo foram determinadas a partir da razão entre as taxas de fluxo, pela porosidade do leito e pela área da seção transversal da coluna. Dessa amostra, era determinado o açúcar redutor formado, conforme indicado no item III.3.4 e determinada a conversão de sacarose a glicose e frutose.

A partir dos dados de conversão em função da velocidade linear de fluxo, foi estudada a cinética da hidrólise contínua de soluções de sacarose, em um reator de leito fixo contendo invertase immobilizada e testado um modelo cinético, supondo que o leito funcionasse como um reator tubular ideal.

### III.3.13 - ESTABILIDADE ENZIMÁTICA NA COLUNA

A coluna com invertase immobilizada operou continuamente du-

rante 30 dias, mantendo-se a temperatura constante a  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Durante esse tempo, foram usadas concentrações de sacarose de  $1,0 \times 10^{-1}$ ;  $5,0 \times 10^{-2}$ ;  $2,5 \times 10^{-2}$  e  $1,0 \times 10^{-2}$  M, com variação da va zão, sendo que em todos esses dias, foi verificada a atividade en zimática da coluna, à velocidade linear de fluxo de 40,08 cm/min, na concentração  $1,0 \times 10^{-1}$  M e à temperatura de  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1 - RESULTADOS

#### IV.1.1 - RESULTADOS RELATIVOS À ENZIMA LIVRE

##### IV.1.1.1 - CONTEÚDO PROTEICO

O conteúdo proteico da invertase utilizada nos experimentos foi de 2,088 miligramas de proteína por mililitro de enzima, determinado pelo método do biureto modificado.

##### IV.1.1.2 - PARÂMETROS CINÉTICOS, Km E Vm

A partir dos dados de velocidade de reação em função da concentração, foi construída a curva da figura IV.1, evidenciando claramente que a reação de hidrólise de sacarose por essa enzima, segue o mecanismo de Michaelis-Menten. Foi construído o diagrama de Lineweaver-Burk, figura IV.2, do qual se obteve um valor de  $2,180 \times 10^{-2}$  moles por litro para Km e  $1,186 \times 10^{-2}$  moles de sacarose por litro de solução por min por ml de enzima utilizada, ou  $5,68 \times 10^{-3}$  moles de sacarose por litro de solução por min por mg de proteína.

##### IV.1.1.3 - TEMPERATURA ÓTIMA

As atividades enzimáticas de invertase a várias temperaturas, a pH = 5,0, são apresentadas na figura IV.3, indicando uma temperatura ótima de ação enzimática igual a 50°C.

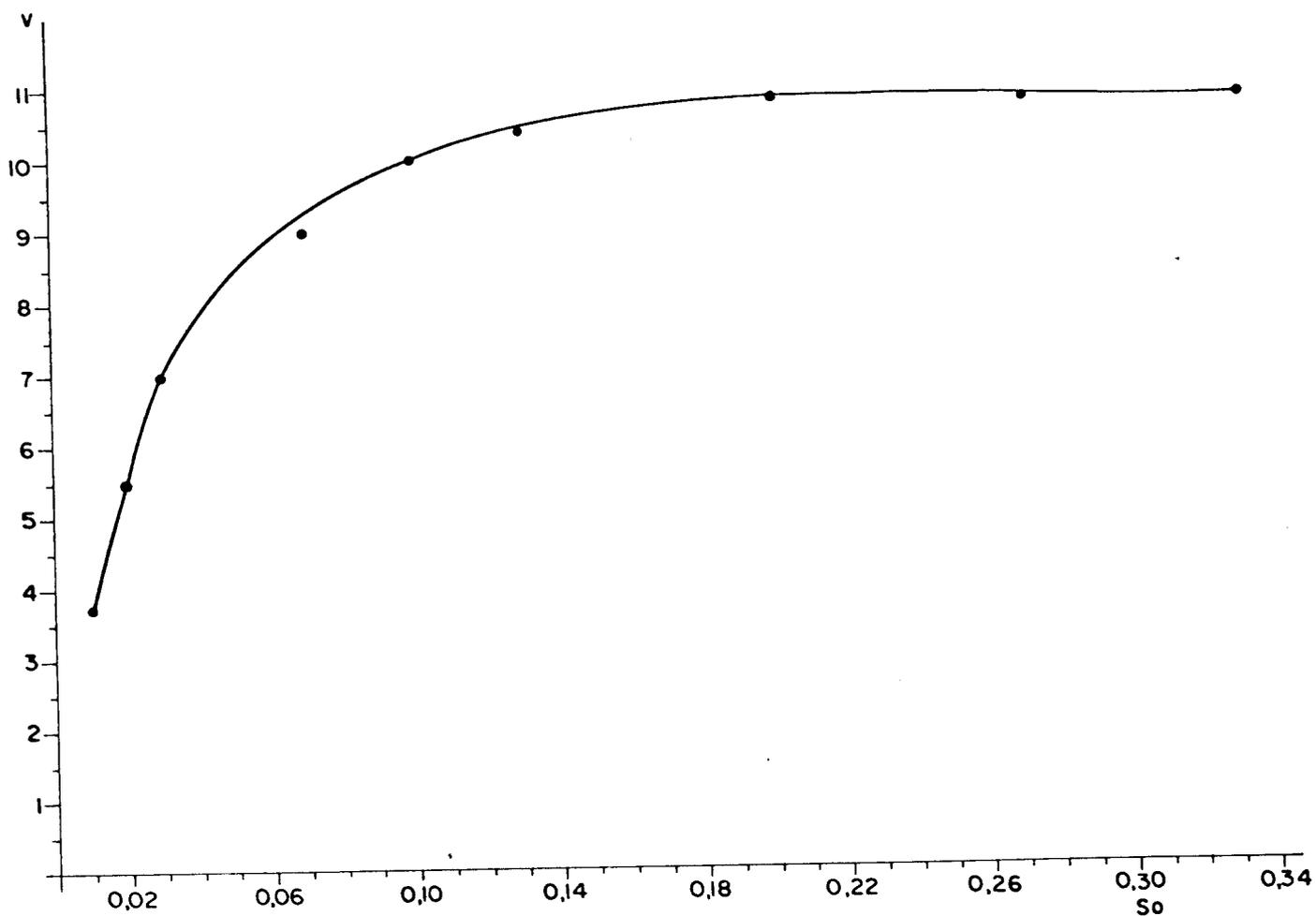


FIG. IV. 1-VELOCIDADE DE REAÇÃO,  $v$  ( $\frac{\text{moles sacarose}}{\text{lx min. x ml invertase}}$ ) em função da concentração inicial de sacarose,  $S_0$  ( $\frac{\text{moles}}{\text{l}}$ ), usando invertase livre, a  $25^\circ\text{C}$  e  $\text{pH} = 5,0$ .

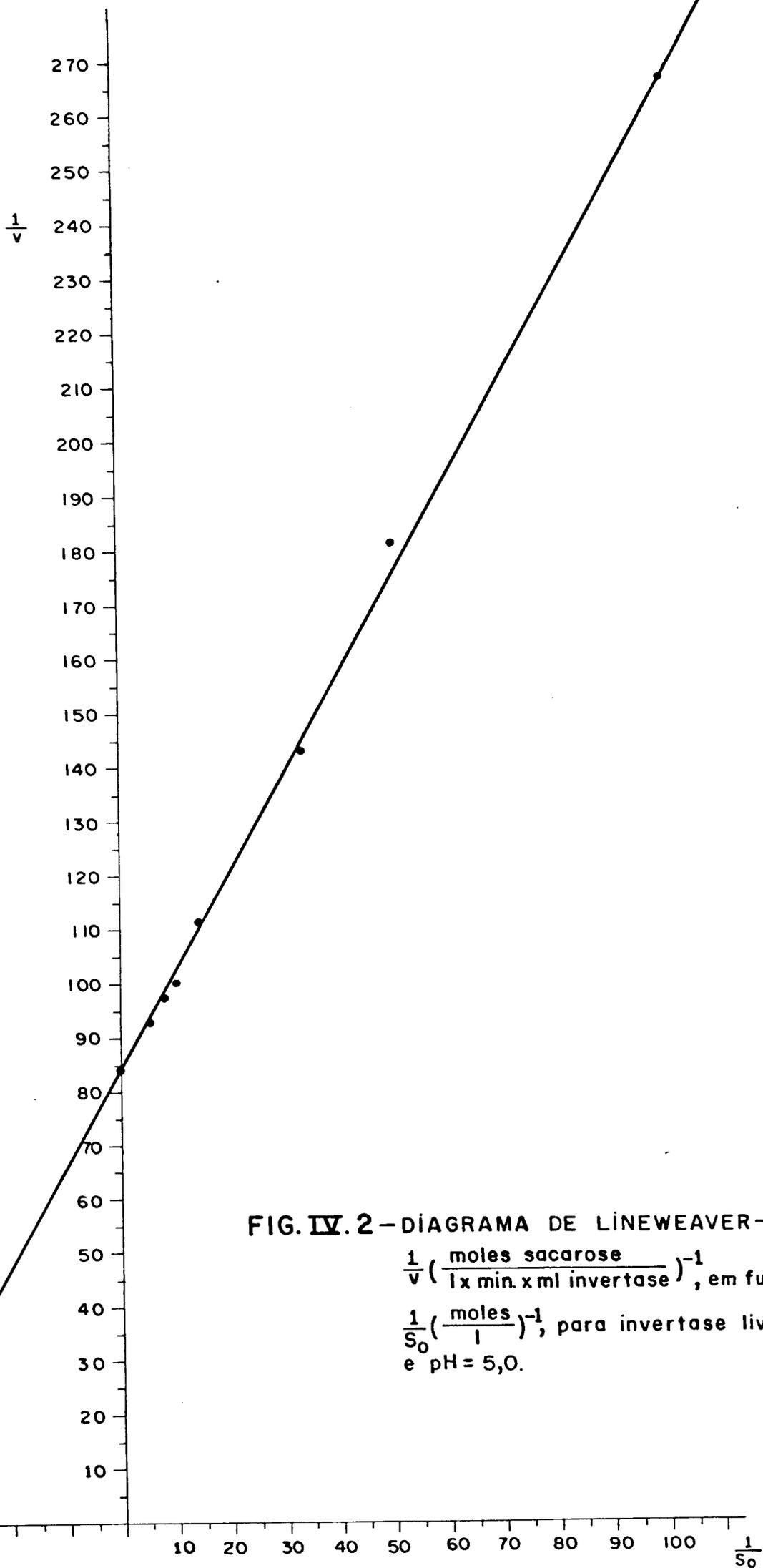
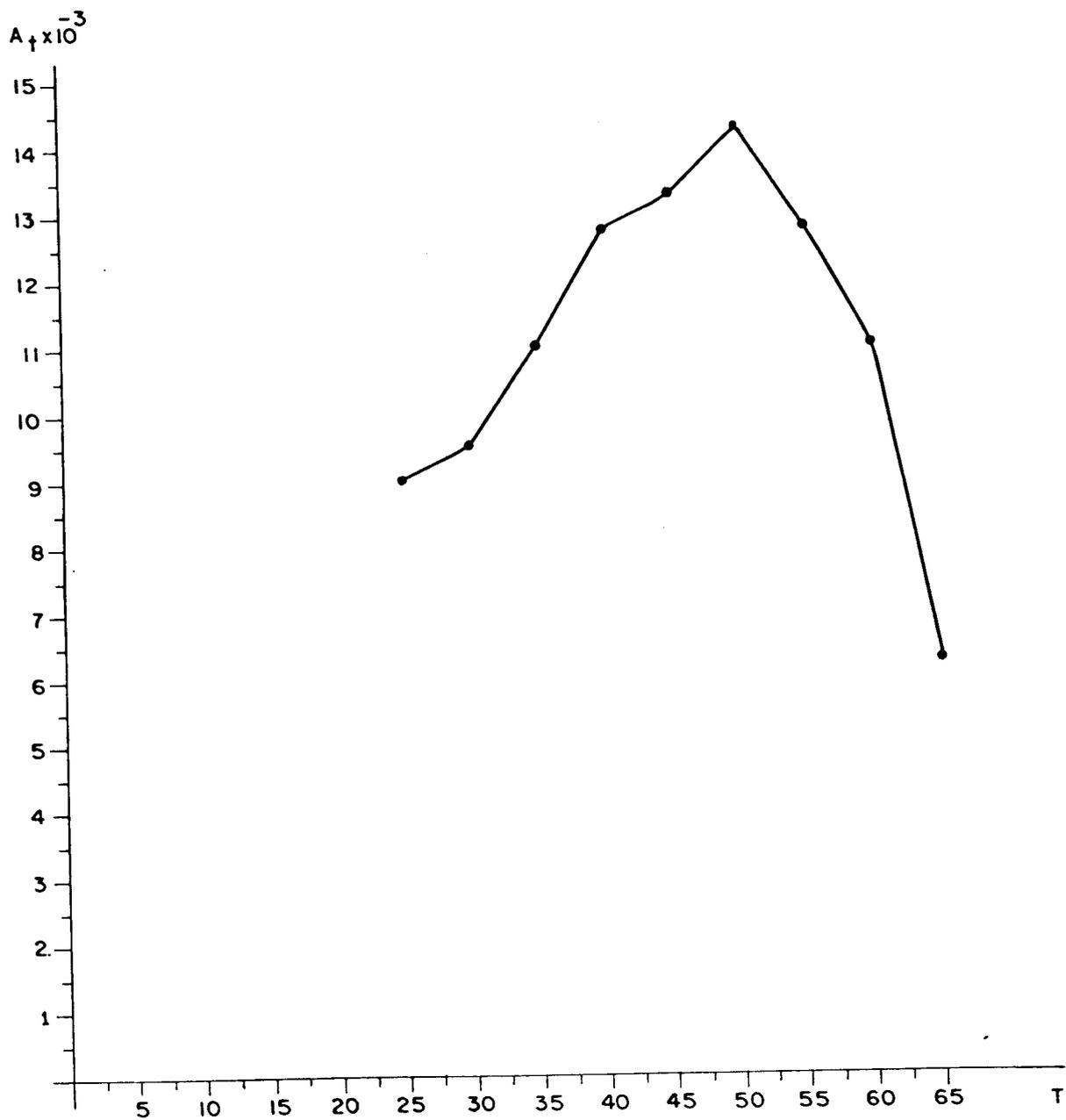


FIG. IV.2 - DIAGRAMA DE LINEWEAVER-BURK,  
 $\frac{1}{v} \left( \frac{\text{moles sacarose}}{1 \times \text{min. x ml invertase}} \right)^{-1}$ , em função de  
 $\frac{1}{S_0} \left( \frac{\text{moles}}{l} \right)^{-1}$ , para invertase livre, a 25°C  
e pH = 5,0.



**FIG. IV. 3** ATIVIDADE DE INVERTASE LIVRE,  
 $A_t$  ( $\frac{\mu \text{ moles sacarose}}{1x \text{ min.} \times \text{ ml invertase}}$ ), em função da temperatura,  
 $T$  (°C), a pH= 5,0.

#### IV.1.4.4 - pH ÓTIMO

Foram determinadas as atividades de invertase, a 25°C, para valores de pH entre 1,5 e 8,0, podendo-se observar a partir da figura IV.4 um pH ótimo em torno de 5,0.

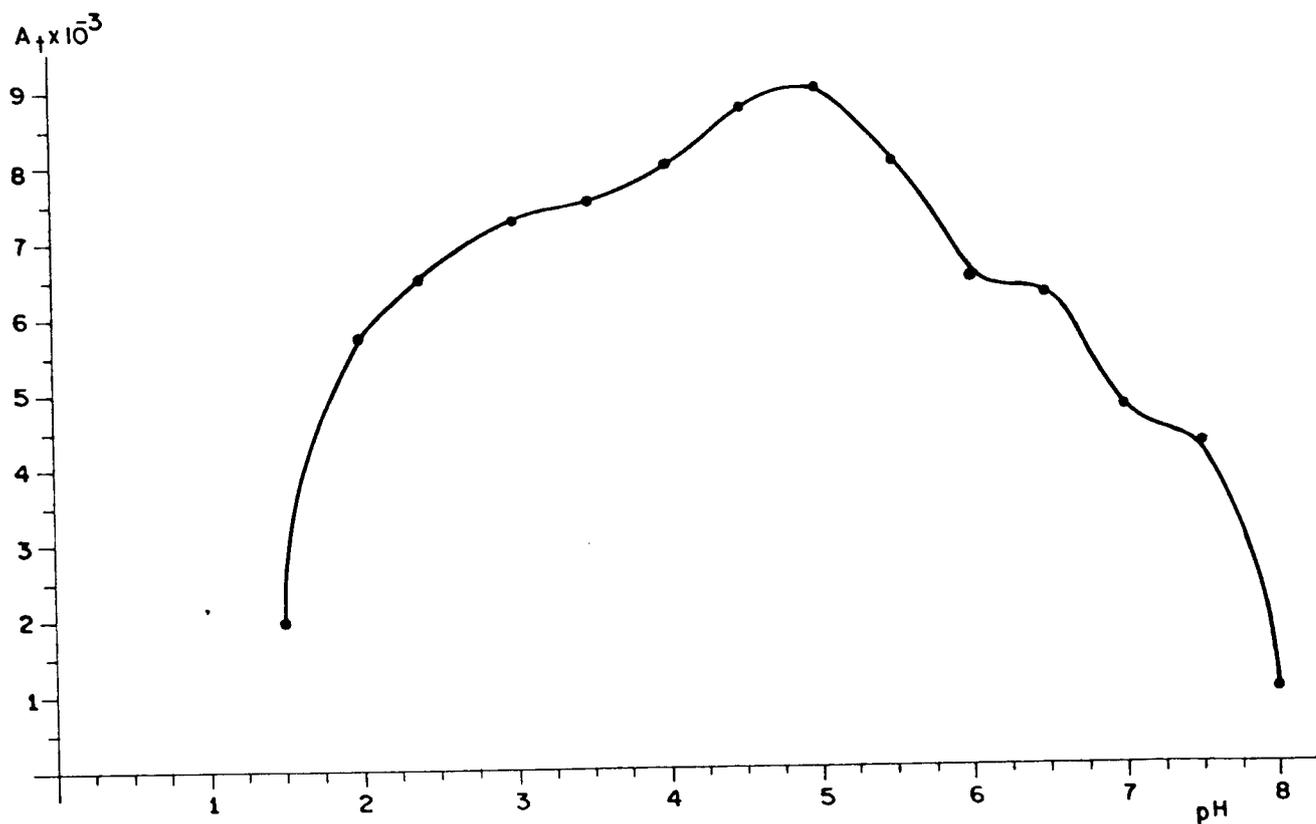


FIG. IV. 4 - ATIVIDADE DE INVERTASE LIVRE,

$A_t \left( \frac{\mu \text{ moles sacarose}}{1 \text{ x min. x ml invertase}} \right)$ , em função do pH, a 25°C.

#### IV.1.2 - RETENÇÃO DE ATIVIDADE NA IMOBILIZAÇÃO

Os resultados estão apresentados como porcentagem de retenção de atividade obtidos pela relação entre a atividade de uma dada quantidade de enzima imobilizada e a atividade do mesmo volume de enzima solúvel usado na imobilização.

##### IV.1.2.1 - COM A RESINA DOWEX 1 - X4

Essa resina foi utilizada para imobilizar invertase, conforme procedimento indicado no item III.3.9.1, variando o pH de imobilização entre 3,0 e 7,0, não apresentando retenção de atividade em nenhum dos experimentos.

Foi testado o uso de glutaraldeído, como indicado no item III.3.9.1, nos mesmos valores de pH de 3,0 a 7,0, não verificando nenhuma retenção de atividade. Nesse caso, houve a formação de um gel, de cor esbranquiçada, aumentando em quantidade, desde pH igual a 3,0 até pH igual a 7,0.

##### IV.1.2.2 - COM A RESINA AMBERLITE IRA-400

A imobilização de invertase nessa resina, na forma cloreto, apresentou uma retenção de atividade máxima igual a 32,61%, quando o procedimento de imobilização foi feito a pH = 3,5, sem o uso de glutaraldeído. Para os demais valores de pH, as porcentagens de retenção são dadas na Tabela IV.1.

No caso de se usar glutaraldeído, os resultados apresentados na Tabela IV.2 mostram que houve uma máxima retenção de atividade de 18,26%, na faixa de pH de 4,0 a 4,5. Para valores de

pH acima de 5,0, não houve retenção de atividade. Nesse caso, também houve formação de gel, que aumentou a medida que se aumentou o pH.

#### IV.1.2.3 - COM A RESINA REXYN 101 (H)

Nesse caso, sem o uso de glutaraldeído, houve uma retenção máxima de atividade de 43,48%, utilizando essa resina na forma hidrogeniônica a pH igual a 4,0. As porcentagens de retenção nos diversos valores de pH utilizados são mostrados na Tabela IV.3.

Na imobilização utilizando a resina na forma sódica, uma retenção máxima de atividade de 40,00% foi alcançada a pH igual a 3,5. As porcentagens de retenção nos valores de pH de imobilização estão apresentadas na Tabela IV.4.

Para Rexyn 101 (H) na forma sódica, utilizando glutaraldeído como reagente bifuncional de ligação cruzada, conseguiu-se uma retenção de atividade máxima de 17,40%, a pH 3,5. Os valores de retenção de atividade são dados na Tabela IV.5.

#### IV.1.2.4 - COM DUOLITE S-761

Essa resina foi utilizada na imobilização de invertase, atida segundo o processo descrito no item III.3.8.3. Conseguiu-se uma máxima retenção de atividade de 70,43%, sem o uso de glutaraldeído, a um valor de pH de imobilização igual a 3,0. As porcentagens de retenção de atividade nos valores de pH usados, são dados na Tabela IV.6.

Também foi utilizada a variação do método de imobilização,

utilizando glutaraldeído, conseguindo uma retenção máxima de atividade de 47,83%, a pH = 3,5. Os valores de retenção são mostrados na Tabela IV.7.

No procedimento de imobilização sem o uso de glutaraldeído, foi verificada a influência da quantidade de enzima a ser usada na imobilização, a pH igual a 3,0, encontrando que até a razão de 5 ml de enzima por grama de resina, havia aumento de retenção de atividade, estabilizando a partir dessa relação.

Com relação ao tempo de imobilização, foi verificado que 10,0 horas de contato foram suficientes para retenção da atividade, a 25°C. Verificou-se também, que após 10,0 horas a 25°C, não era necessário deixar mais 3,0 h à temperatura de 3°C, pois não implicou em aumento de retenção de atividade.

TABELA IV.1 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), imobilizada em Amberlite IRA-400, na forma cloreto, sem o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	19,56
3,5	32,61
4,0	28,26
4,5	26,10
5,0	8,70
5,5	6,52
6,0	0,00
6,5	0,00
7,0	0,00

TABELA IV.2 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), immobilizada em Amberlite IRA-400, na forma cloreto, com o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	10,87
3,5	13,04
4,0	18,26
4,5	18,26
5,0	8,70
5,5	0,00
6,0	0,00
6,5	0,00
7,0	0,00

TABELA IV.3 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), immobilizada em Rexyn 101 (H), na forma hidrogeniônica, sem o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	34,78
3,5	34,78
4,0	43,48
4,5	34,78
5,0	34,78
5,5	34,78
6,0	21,74
6,5	0,00
7,0	0,00

TABELA IV.4 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), immobilizada em Rexyn 101 (H), na forma sódica, sem o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	39,13
3,5	40,00
4,0	21,74
4,5	4,35
5,0	0,00
5,5	0,00
6,0	0,00
6,5	0,00
7,0	0,00

TABELA IV.5 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), immobilizada em Rexyn 101 (H), na forma sódica, com o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	8,70
3,5	17,40
4,0	8,70
4,5	2,15
5,0	0,00
5,5	0,00
6,0	0,00
6,5	0,00
7,0	0,00

TABELA IV.6 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), imobilizada em Duolite S-761, sem o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	70,43
3,5	47,83
4,0	43,48
4,5	34,78
5,0	30,43
5,5	30,43
6,0	30,43
6,5	4,35
7,0	0,00

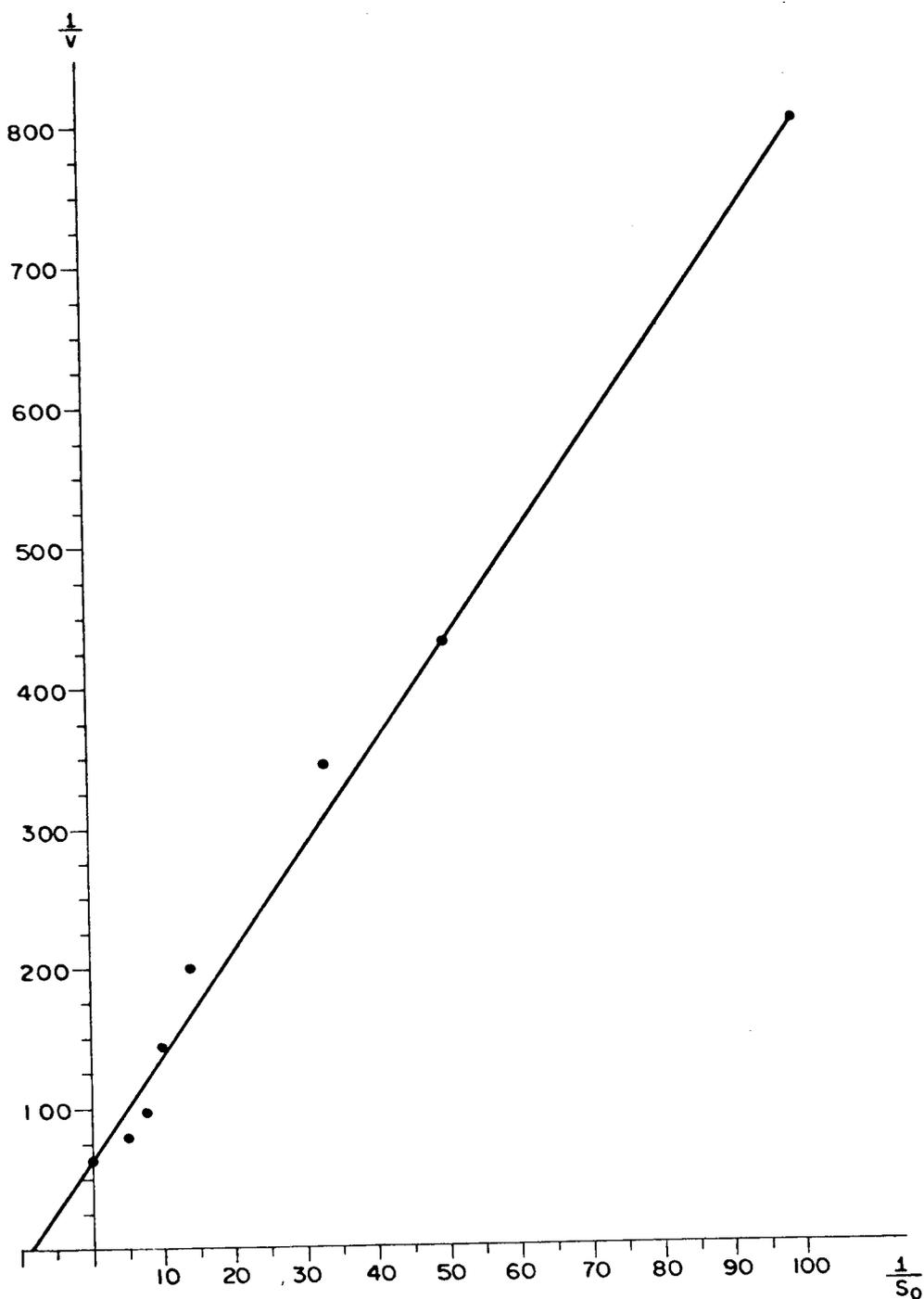
TABELA IV.7 - Porcentagens de retenção de atividade de invertase (P), imobilizada em Duolite S-761 com o uso de glutaraldeído, em função do pH.

pH	P
3,0	26,10
3,5	47,83
4,0	34,78
4,5	26,10
5,0	26,10
5,5	26,10
6,0	26,10
6,5	6,52
7,0	0,00

IV.1.3 - RESULTADOS RELATIVOS À INVERTASE IMOBILIZADA EM DUOLITE  
S-761 SEM USO DE GLUTARALDEÍDO

IV.1.3.1 - PARÂMETROS CINÉTICOS  $K_m'$  E  $V_m'$

Os valores de  $K_m'$  e  $V_m'$  para a invertase imobilizada, em operações em batelada, utilizando a razão de 66,67 g de enzima imobilizada por litro de solução de reagente, foram determinadas a partir do diagrama de Lineweaver-Burk mostrado na figura IV.5, encontrando um valor igual a  $1,123 \times 10^{-1}$  mol de sacarose por litro, para  $K_m'$  e um valor de  $1,51 \times 10^{-2}$  mol de sacarose por litro por minuto por grama de enzima imobilizada, para  $V_m'$ .



**FIG. IV. 5** - DIAGRAMA DE LINEWEAVER-BURK, para invertase imobilizada,  $\frac{1}{v} \left( \frac{\text{moles sacarose}}{\text{lx min. x g complexo}} \right)^{-1}$ , em função de  $\frac{1}{S_0} \left( \frac{\text{moles}^{-1}}{\text{l}} \right)^{-1}$ , a 25°C e pH = 5,0.

#### IV.1.3.2 - TEMPERATURA ÓTIMA

As atividades de invertase imobilizada, a pH igual a 5,0, para temperaturas na faixa de 18 a 55°C são mostradas na figura IV.6. A temperatura ótima encontrada foi 45°C e nota-se a partir dessa figura que, a atividade enzimática cai rapidamente, tanto para valores maiores, como para menores que 45°C.

#### IV.1.3.3 - pH ÓTIMO

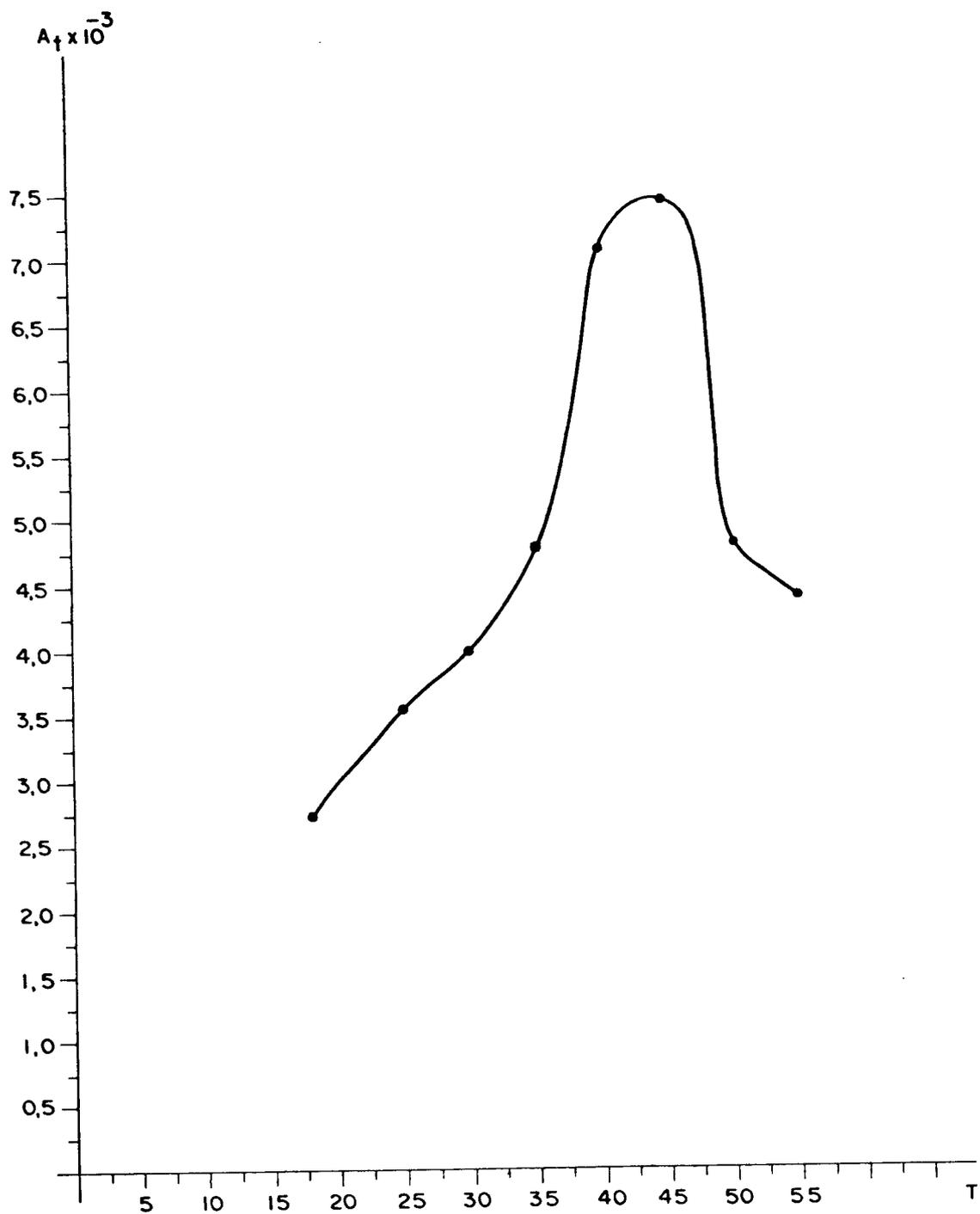
A influência do pH na atividade de invertase imobilizada é mostrada na figura IV.7, na qual se nota um pH ótimo em torno de 6,5. Verificou-se um deslocamento para o lado básico, relativo à enzima livre, que apresentou maior atividade a um valor de pH igual a 5,0.

#### IV.1.4 - DADOS RELATIVOS À COLUNA DE INVERTASE IMOBILIZADA EM DUOLITE S-761 SEM USO DE GLUTARALDEÍDO

##### IV.1.4.1 - PREPARAÇÃO DA COLUNA

Foi feita a análise granulométrica da resina utilizada na imobilização, por peneiramento, sendo verificado que toda ela se situou entre as malhas 16 e 60 da série Tyler, com 97% da resina entre as malhas 16 e 35, como mostrado na Tabela IV.8. A partir desses dados, foi determinado o diâmetro médio das partículas (7), sendo encontrado um valor igual a 0,596 mm.

Após imobilização, a invertase imobilizada foi empacotada numa coluna com controle de temperatura, de diâmetro interno 0,85 cm e após a máxima compactação, o leito apresentou uma altura de



**FIG. IV. 6** - ATIVIDADE DE INVERTASE IMOBILIZADA,  
 $A_t$  ( $\frac{\mu \text{ moles sacarose}}{1 \text{ x min. x g complexo}}$ ), em função da temperatura,  
 $T$  (°C), a pH=5,0.

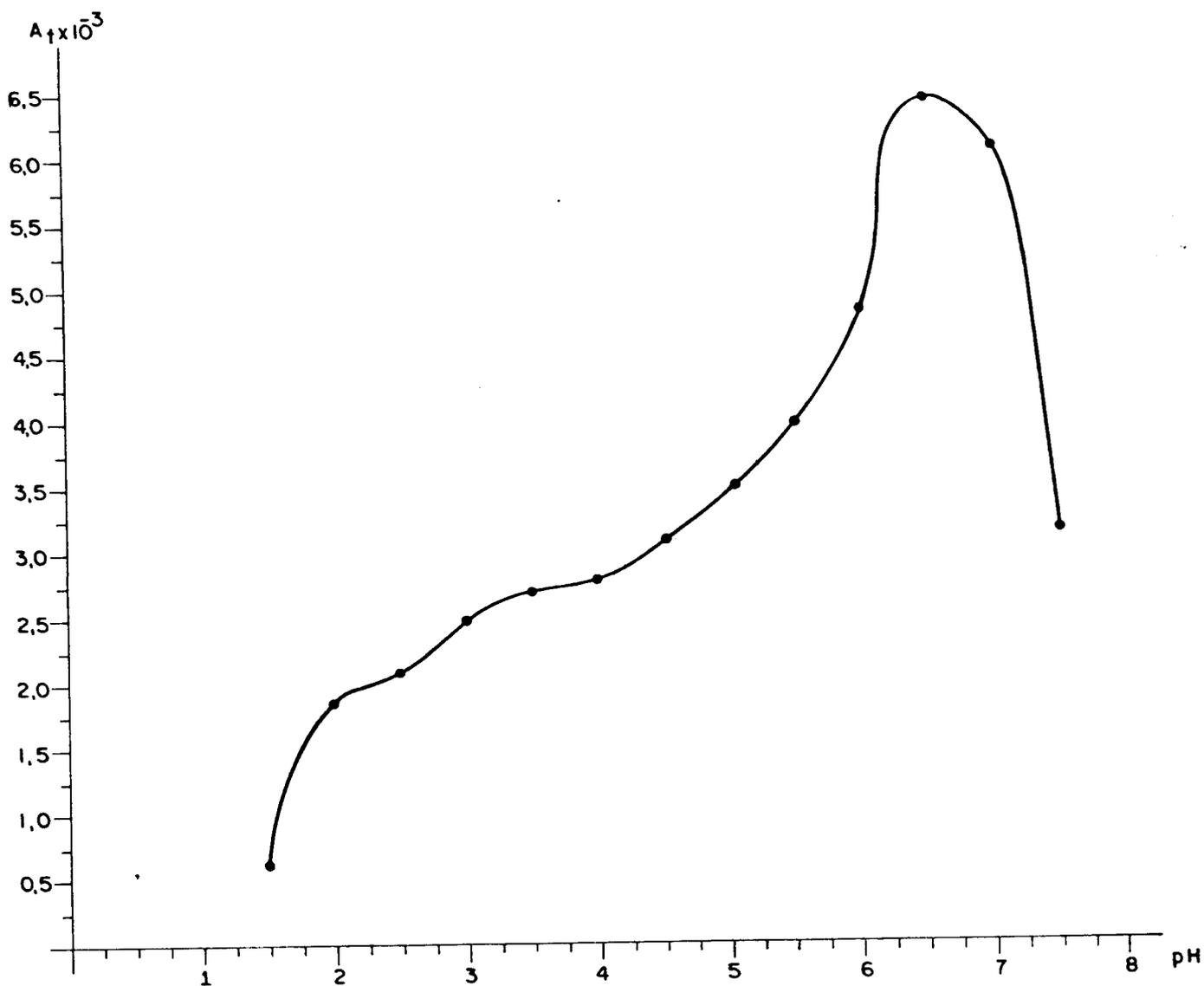


FIG. IV. 7 - ATIVIDADE DE INVERTASE IMOBILIZADA,  
 $A_t \left( \frac{\mu \text{ moles sacarose}}{1 \text{ x min. x g complexo}} \right)$ , em função do pH, a 25°C.

12,0 cm, implicando numa relação altura do leito pelo diâmetro médio das partículas igual a 201,34, comportando-se portanto, segundo RASE (39), como um reator tubular ideal.

Foi determinado, também, a porosidade do leito, obtida pela relação entre o volume de água retido no mesmo e o volume de água correspondente à mesma altura do leito na coluna, porém sem o mesmo (7), sendo encontrado o valor de 0,44.

TABELA IV.8 - Análise granulométrica da resina Duolite S - 761 - Cálculo do diâmetro médio das partículas.

Malhas (Tyler)	Fração em peso ( $x_i$ )	Diâmetro médio ( $D_i$ ), mm	$\left(\frac{x_i}{D_i}\right)$	$D_i^3$	$\frac{x_i}{D_i^3}$
-16+20	0,318	0,912	0,349	0,758	0,419
-20+28	0,393	0,711	0,553	0,359	1,095
-28+35	0,259	0,503	0,515	0,127	2,039
-35+48	0,028	0,356	0,079	0,045	0,622
-48+60	0,001	0,272	0,005	0,020	0,050

IV.1.4.2 - ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DA SACAROSE NA COLUNA DE INVERTASE IMOBILIZADA

Admitindo que esse reator de leito fixo comporta-se como um reator tubular ideal e fazendo um balanço de massa para um elemento de volume do mesmo, vem:

$$v \cdot dV = F_m \cdot d\alpha \quad \text{eq (1)}$$

$$\text{como, } F_m = F \cdot S_0 \quad \text{eq (2)}$$

$$V = A \cdot l \quad \text{eq (3)}$$

$$dV = A \cdot dl \quad \text{eq (4)}$$

$$S = S_0 \cdot (1 - \alpha) \quad \text{eq (5)}$$

Supondo que a hidrólise da sacarose segue o modelo cinético de Michaelis-Menten,  $v = \frac{V_m' \cdot S}{K_m' + S}$  eq (6), e levando as equações (2), (3), (4), (5) e (6) na equação (1) e integrando entre os limites (0;  $\ell$ ) e (0;  $\alpha$ ), chega-se a:

$$S_0 \cdot \alpha = K_m' \cdot \ln(1 - \alpha) + \frac{V_m' \cdot \ell}{C} \quad \text{eq (7), onde}$$

$$C = \frac{F}{\gamma \cdot A} \quad \text{eq (8)}$$

A equação (7) é então o modelo cinético para o reator usado e compõe-se de dois parâmetros a serem determinados experimentalmente,  $K_m'$  e  $V_m'$  e das variáveis operacionais  $S_0$ ,  $\ell$  e  $C$ .

As conversões, usando soluções com concentrações iniciais de sacarose iguais a  $1,0 \times 10^{-1}$ ,  $5,0 \times 10^{-2}$ ,  $2,5 \times 10^{-2}$  e  $1,0 \times 10^{-2}$  M, foram determinadas a vários valores de velocidades lineares de fluxo e são mostradas na figura IV.8.

Com os objetivos de verificar a validade do modelo proposto e determinar os parâmetros  $K_m'$  e  $V_m'$ , foi construída a tabela IV.9 e dela o gráfico da figura IV.9, que representa  $S_0 \cdot \alpha$  em função de  $\ln(1 - \alpha)$ . Cada reta obtida, corresponde a uma velocidade linear de fluxo, com inclinação igual a  $K_m'$  e intersecção com o eixo  $S_0 \cdot \alpha$  igual a  $\frac{V_m' \cdot \ell}{C}$ .

Os valores de  $K_m'$ , obtidos pelas inclinações das retas da figura IV.9, para cada valor de  $C$  são mostrados na figura IV.10. Os de  $V_m'$ , obtidos das intersecções das retas com o eixo  $S_0 \cdot \alpha$ , para cada valor de  $C$ , são mostrados na figura IV.11.

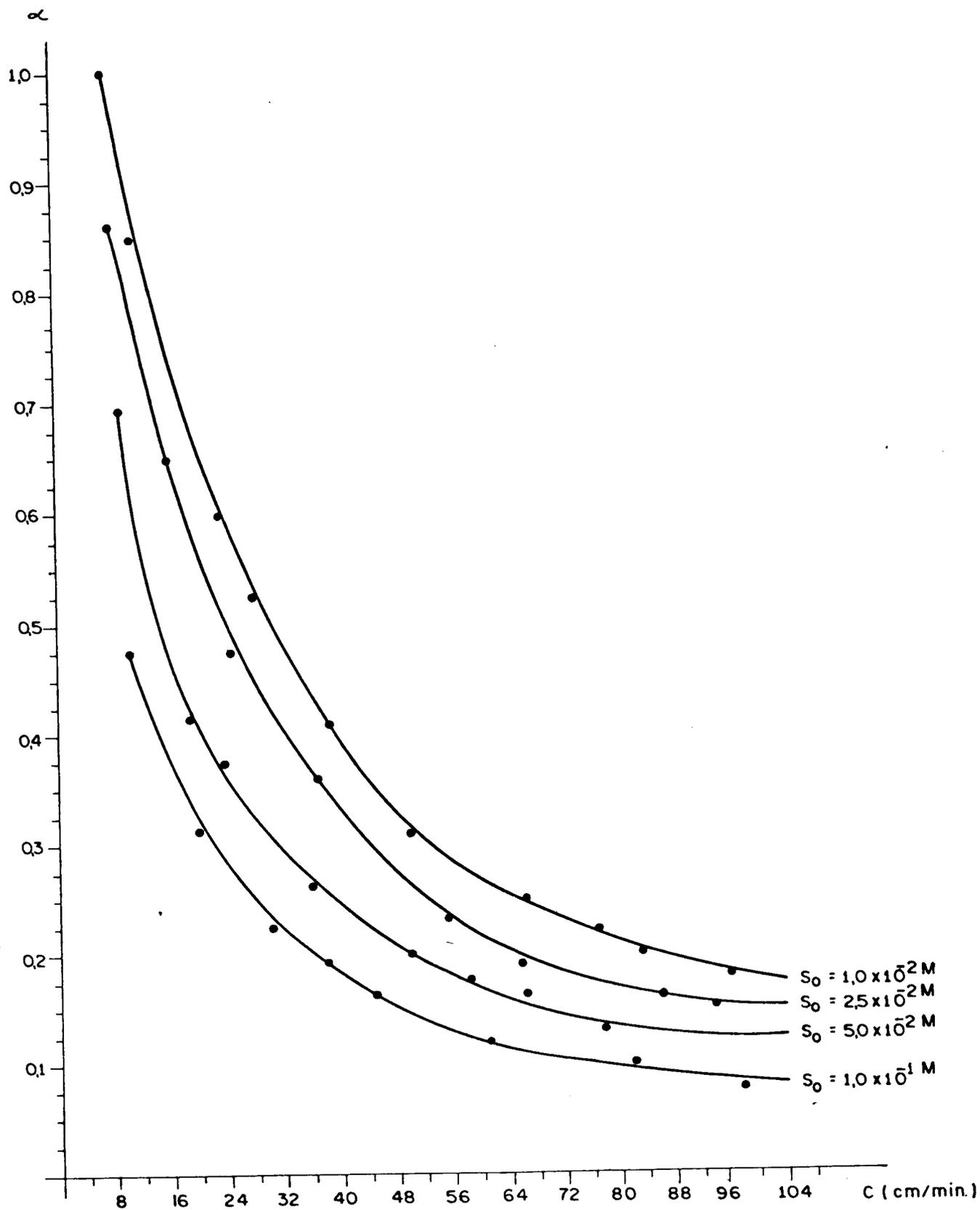


FIG. IV. 8 - CONVERSÃO DE SACAROSE A AÇÚCAR REDUTOR,  $\alpha$ , em função da velocidade linear de fluxo,  $C$  ( $\frac{cm}{min.}$ ), a  $28^\circ C$ , a  $pH = 6,5$ .

TABELA IV.9 - Concentração de açúcar redutor no produto,  $S_0 \cdot \alpha$  (moles/l), em função de  $\ln(1 - \alpha)$ , para vários valores da velocidade linear de fluxo,  $C$  (cm/min), sendo  $S_0$  = concentração de sacarose na solução de alimentação da coluna e  $\alpha$  a conversão de sacarose a glicose e frutose.

C	$S_0$	$\alpha$	$S_0 \cdot \alpha \times 10^3$	$\ln(1 - \alpha) \times 10^2$
104,22	$1,0 \times 10^{-1}$	0,080	8,00	- 8,34
104,22	$5,0 \times 10^{-2}$	0,115	5,75	- 12,22
104,22	$2,5 \times 10^{-2}$	0,140	3,50	- 15,08
104,22	$1,0 \times 10^{-2}$	0,165	1,65	- 18,03
96,20	$1,0 \times 10^{-1}$	0,085	8,50	- 8,88
96,20	$5,0 \times 10^{-2}$	0,125	6,25	- 13,35
96,20	$2,5 \times 20^{-2}$	0,150	3,75	- 16,25
96,20	$1,0 \times 10^{-2}$	0,175	1,75	- 19,24
88,18	$1,0 \times 10^{-1}$	0,090	9,00	- 9,43
88,18	$5,0 \times 10^{-2}$	0,130	6,50	- 13,92
88,18	$2,5 \times 10^{-2}$	0,160	4,00	- 17,43
88,18	$1,0 \times 10^{-2}$	0,190	1,90	- 21,07
80,17	$1,0 \times 10^{-1}$	0,095	9,50	- 9,98
80,17	$5,0 \times 10^{-2}$	0,140	7,00	- 15,08
80,17	$2,5 \times 10^{-2}$	0,180	4,50	- 19,84
80,17	$1,0 \times 10^{-2}$	0,215	2,15	- 24,21
72,15	$1,0 \times 10^{-1}$	0,105	10,50	- 11,09
72,15	$5,0 \times 10^{-2}$	0,150	7,50	- 16,25
72,15	$2,5 \times 10^{-2}$	0,190	4,75	- 21,07
72,15	$1,0 \times 10^{-2}$	0,235	2,35	- 26,78
64,13	$1,0 \times 10^{-1}$	0,115	11,50	- 12,22
64,13	$5,0 \times 10^{-2}$	0,165	8,25	- 18,03
64,13	$2,5 \times 10^{-2}$	0,215	5,35	- 24,21
64,13	$1,0 \times 10^{-2}$	0,260	2,60	- 30,11
56,12	$1,0 \times 10^{-1}$	0,130	13,00	- 13,93
56,12	$5,0 \times 10^{-2}$	0,185	9,25	- 20,46
56,12	$2,5 \times 10^{-2}$	0,240	6,00	- 27,44
56,12	$1,0 \times 10^{-2}$	0,285	2,85	- 33,55
48,10	$1,0 \times 10^{-1}$	0,150	15,00	- 16,25
48,10	$5,0 \times 10^{-2}$	0,215	10,75	- 24,21
48,10	$2,5 \times 10^{-2}$	0,280	7,00	- 32,85
48,10	$1,0 \times 10^{-2}$	0,330	3,30	- 40,05
40,08	$1,0 \times 10^{-1}$	0,180	18,00	- 19,85
40,08	$5,0 \times 10^{-2}$	0,255	12,75	- 29,43
40,08	$2,5 \times 10^{-2}$	0,330	8,25	- 40,04
40,08	$1,0 \times 10^{-2}$	0,390	3,90	- 49,43
32,06	$1,0 \times 10^{-1}$	0,225	22,50	- 25,49
32,06	$5,0 \times 10^{-2}$	0,315	15,75	- 37,83
32,06	$2,5 \times 10^{-2}$	0,415	10,12	- 51,92
32,06	$1,0 \times 10^{-2}$	0,470	4,70	- 63,48

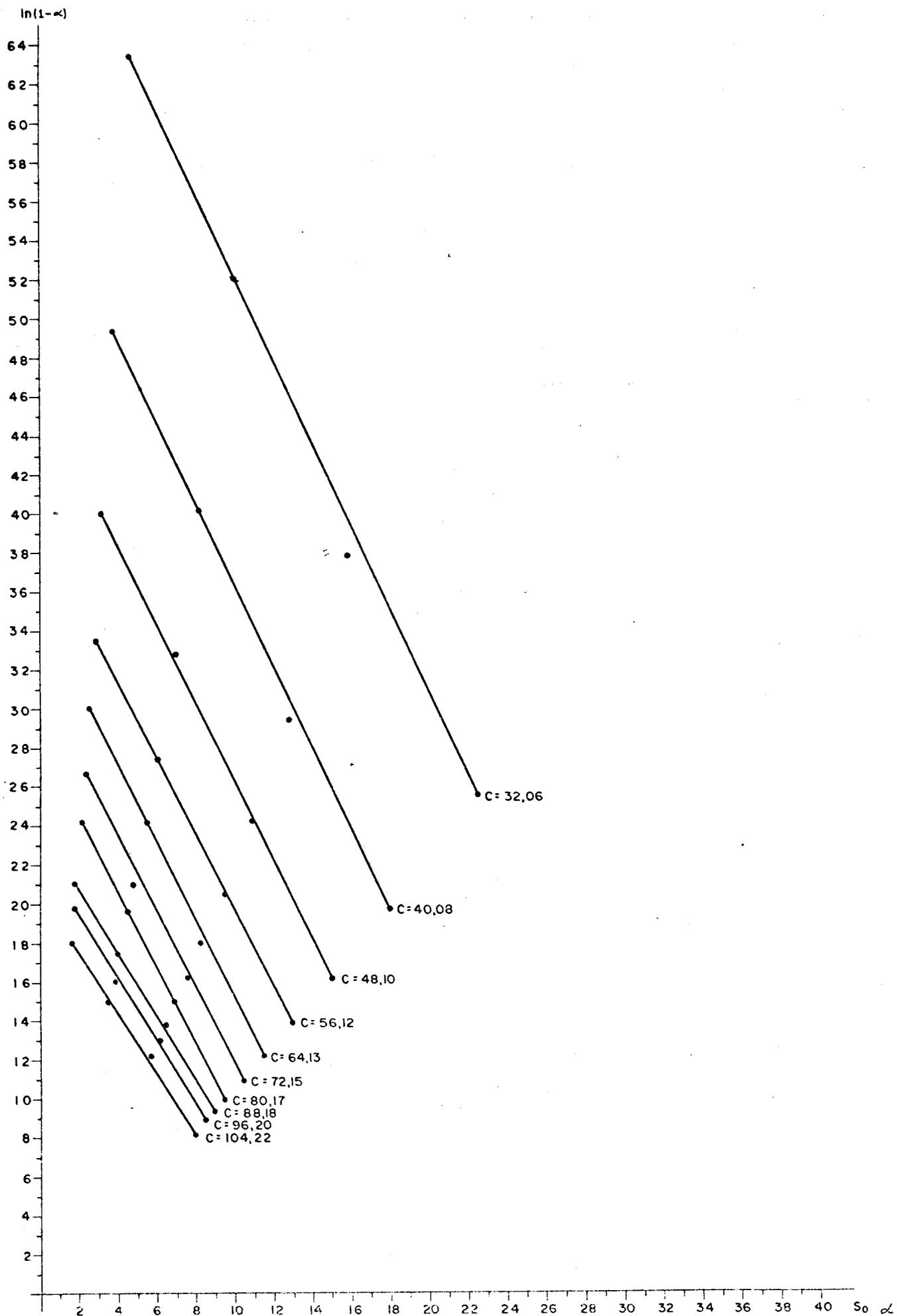
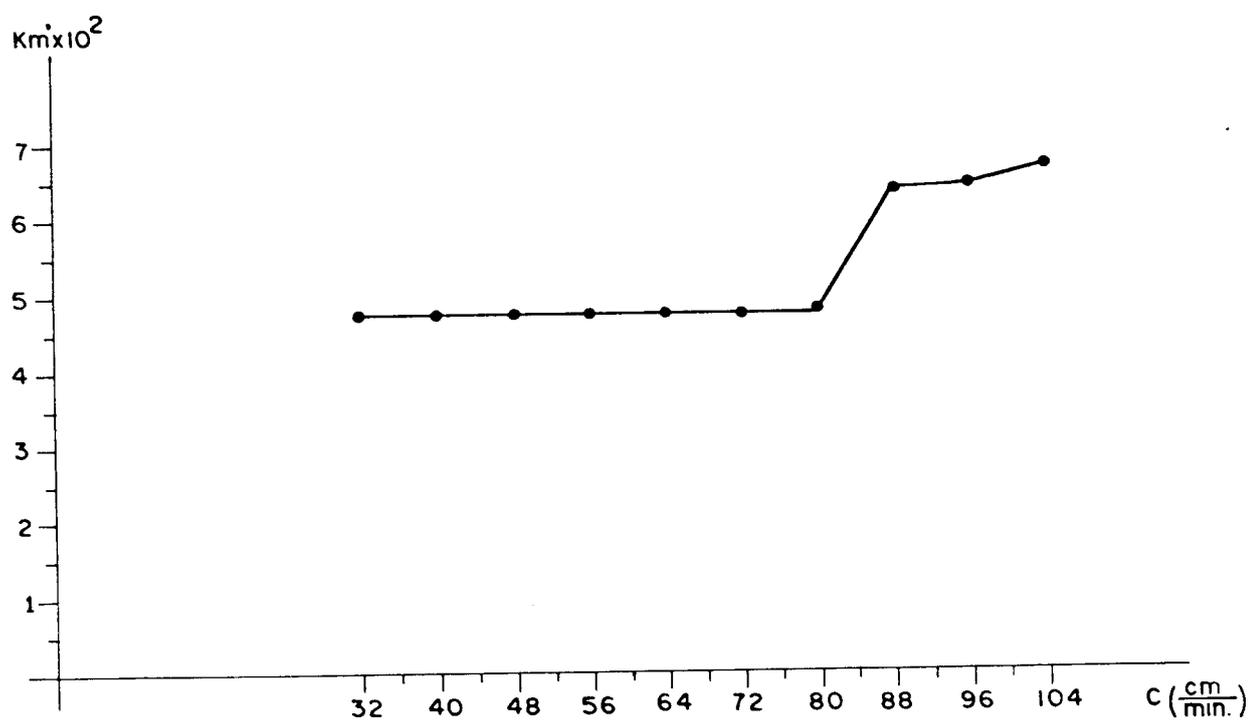
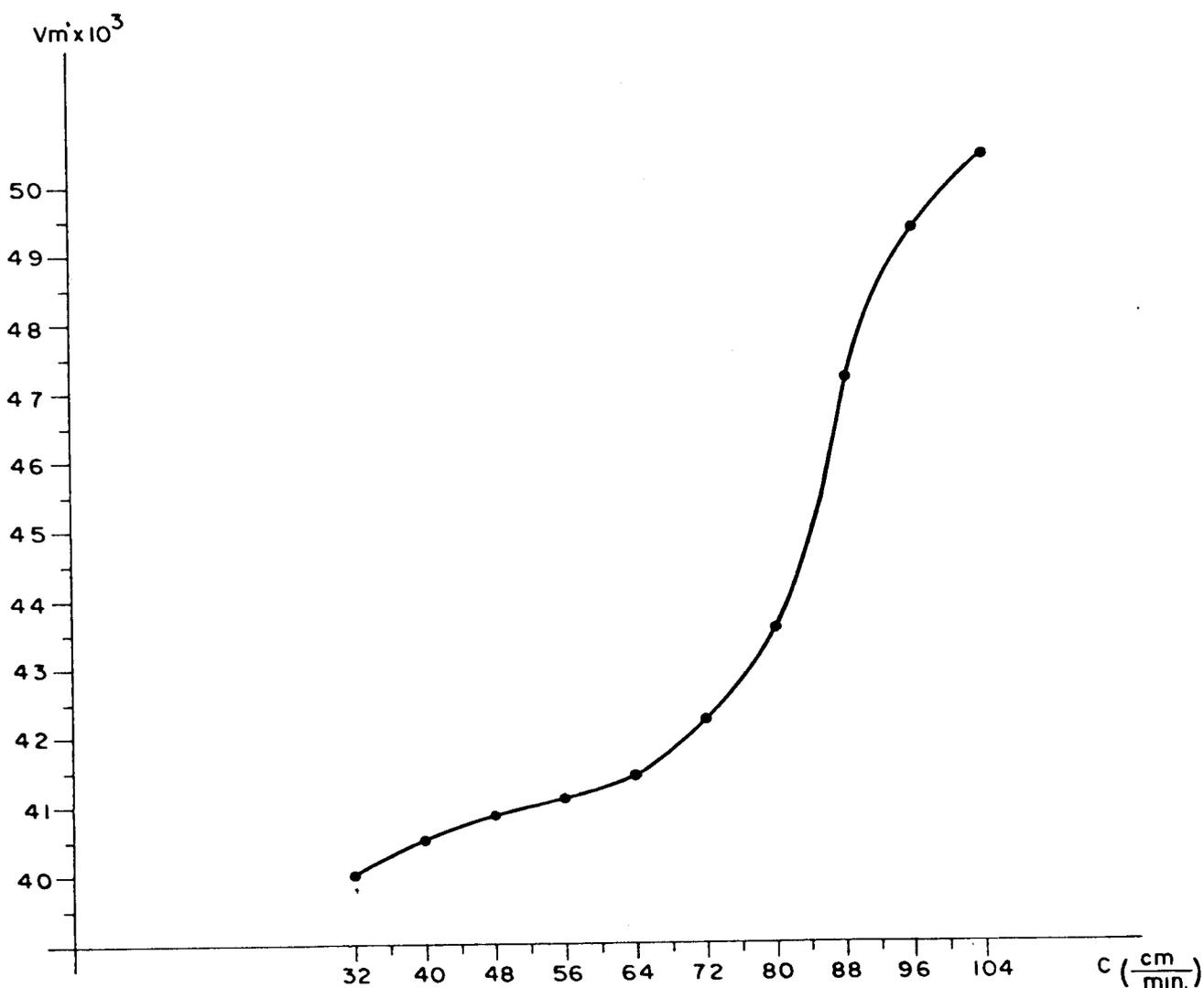


FIG. IV. 9 - CONCENTRAÇÃO DO PRODUTO NA SAÍDA DA COLUNA,  $S_0 \alpha$  ( $\frac{\text{moles}}{\text{l}}$ ) em função de  $\ln(1-\alpha)$ , para diferentes valores da velocidade linear de fluxo,  $C$  ( $\frac{\text{cm}}{\text{min}}$ ), a  $28^\circ\text{C}$  e  $\text{pH} = 6,5$ .



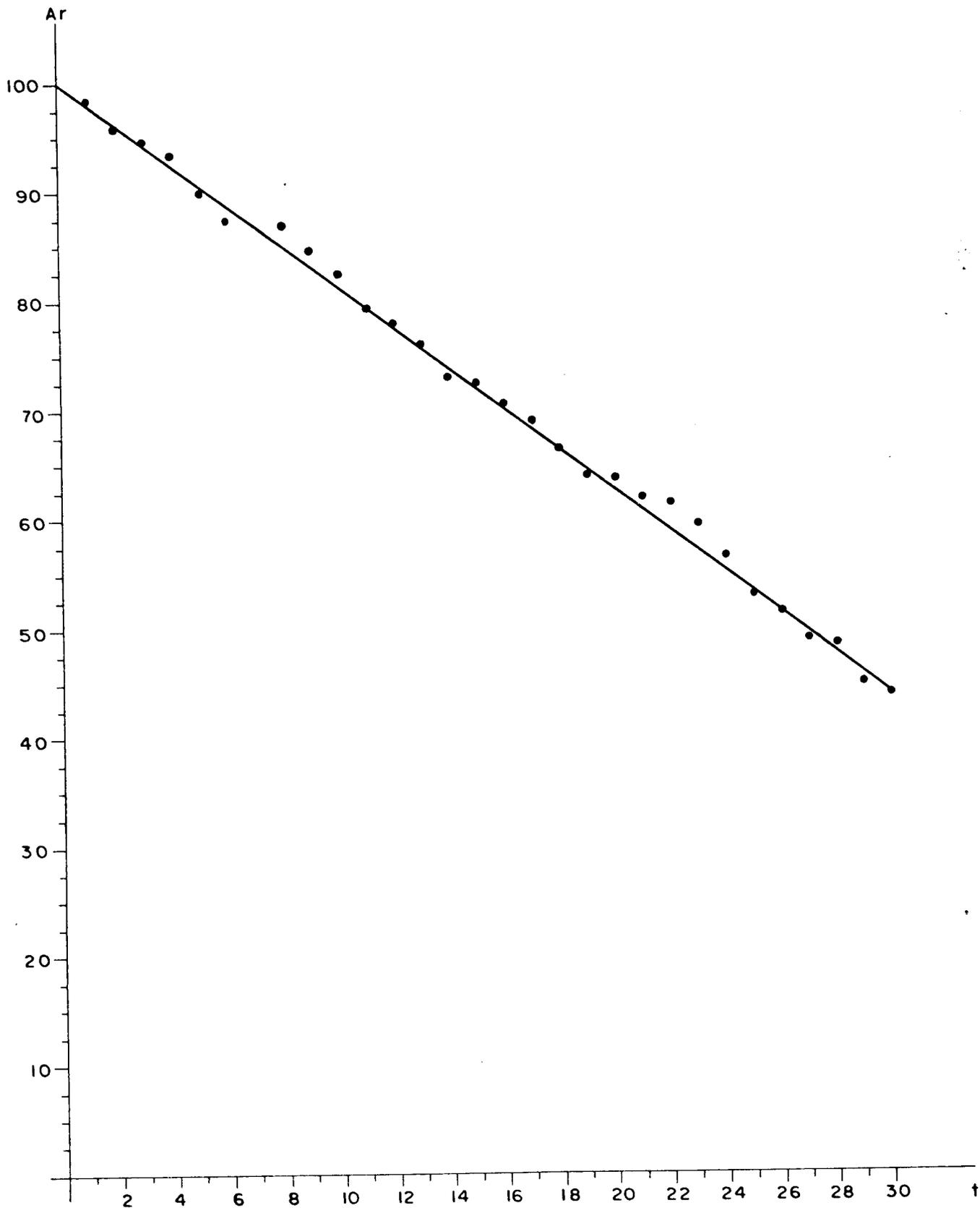
**FIG. IV. 10** – VARIACÃO DA CONSTANTE APARENTE DE MICHAELIS-MENTEN,  $K_m'$  ( $\frac{moles}{l}$ ), para invertase imobilizada, em função da velocidade linear de fluxo,  $C$  ( $\frac{cm}{min.}$ ), a  $28^\circ C$  e  $pH = 6,5$ .



**FIG. IV. 11**—VARIÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA DE REAÇÃO APARENTE,  $V_m'$  ( $\frac{\text{moles sacarose}}{1x \text{ min.} \times g \text{ complexo}}$ ), para invertase imobilizada, em função da velocidade linear de fluxo  $C$  ( $\frac{cm}{min.}$ ) a  $28^\circ C$  e  $pH=6,5$ .

#### IV.1.5 - ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

Após 30 dias em operação contínua, a coluna de invertase imobilizada ainda apresentava 43,75% da atividade inicial. A desativação da coluna foi quase uniforme em relação ao tempo, como mostrado na figura IV.12.



**FIG. IV. 12** – VARIACÃO DA ATIVIDADE RELATIVA,  $A_r$  (%),  
de invertase imobilizada em função do tempo  $t$  (dias).

## IV.2 - DISCUSSÃO

Várias resinas trocadoras de íons tem sido usadas para imobilizar enzimas, tanto trocadoras de ânions como de cátions, mas não tem sido utilizada a resina Duolite S-761, apenas uma semelhante a essa, tipo fenol-formaldeído, também com a denominação comercial de Duolite S-30, foi utilizada por OLSON e STANLEY (35).

Os dados relativos à imobilização de invertase em resinas trocadoras de íons, mostraram que o pH do meio tem grande influência na ligação entre enzima e resina, como pode ser verificado nas tabelas, IV.1, IV.2, IV.3, IV.4, IV.5, IV.6 e IV.7, que mostram as porcentagens de retenção de atividade enzimática em função do pH. Isso se deve à natureza dos grupos químicos que se encontram, tanto nas moléculas de enzima, como na resina, que dependendo do pH do meio, se ionizam, adquirindo cargas elétricas, positivas ou negativas, ou podem se neutralizar. A situação ideal para ligação entre enzima e resina, por ligação iônica, seria aquela em que as duas estivessem com cargas opostas, com maior número possível de radicais carregados em cada uma delas, mas que não desnaturasse a proteína.

A imobilização de invertase, usando Duolite S-761 como suporte, apresentou uma alta retenção de atividade, 70,43%, quando comparada com os resultados disponíveis, como por exemplo, os 45% obtidos por MAEDA e SUZUKI (25) em DEAA-celulose, 23% obtidos por USAMI, HASEGAWA e KARASAWA (44) com DEAE-celulose, 50% alcançados por SUZUKI et alii (41), em DEAE-celulose, 31% conseguidos por USAMI, NODA e GOTO (45) em DEAE-celulose, 56% alcançados por BOUDRANT e CHEFTEL (6) em Amberlite IRA-900. Em todos os trabalhos mencionados, o único que relata um estudo da influên-

cia do pH na ligação da enzima ao suporte foi o último. O resultado obtido com Duolite S-761, aparentemente se deve à adequação da resina e pela determinação do pH de melhor ligação. Outro detalhe que pareceu significativo, foi a relação "quantidade de enzima a ser usada na imobilização por grama de resina". Foi verificado que para valores maiores que 5 ml de invertase (ou 10,44 miligramas de proteína enzimática) por grama de resina, não havia aumento de retenção de atividade, evidenciando que, ao usar uma relação maior que essa, para a resina e enzima usadas, haveria perda de enzima e, evidentemente, uma diminuição da porcentagem de retenção, em relação à atividade da mesma quantidade de enzima livre, utilizada na imobilização. Esse ponto, não foi evidenciado em nenhum dos trabalhos mencionados anteriormente.

Um aspecto verificado com relação à ligação entre invertase e suporte é que os tipos de íons na resina, a serem trocados pelas moléculas de enzima, influem na retenção de atividade, como por exemplo foi verificado que Rexyn 101 (H), na forma hidrogeniônica foi mais efetiva que na forma sódica.

Para todas as resinas usadas na imobilização, notou-se menor atividade enzimática do complexo imobilizado, quando usou glutaraldeído como agente bifuncional para a enzima já ligada à resina. Foi notado nesses casos, a formação de uma substância gelatinosa no sobrenadante, de aspecto esbranquiçado, que provavelmente, foi devido a reações de polimerização entre a enzima e glutaraldeído. As atividades dos complexos foram menores, provavelmente, devido ao envolvimento de sítios ativos nas ligações entre enzimas e glutaraldeído, perdendo assim, atividade. No caso particular da resina ser Duolite S-761, a enzima imobilizada foi mais ativa do que aquela obtida por OLSON e STANLEY (35).

Os valores dos parâmetros cinéticos, para o complexo imobilizado, Duolite S-761-invertase, foram maiores que aqueles para a forma livre da enzima, estando de acordo com os resultados de DICKENSHEETS et alii (14), GELF et alii (20), MAEDA e SUZUKI (25) e outros. As principais causas dessas variações nos parâmetros  $K_m'$  e  $V_m'$  são, segundo KOBAYASHI e MOO-YOUNG (23) e CHIBATA (10) efeitos de limitação de difusão, interação eletrostática entre suporte e substrato e efeitos estéricos. No presente trabalho, essa mudança nos valores dos parâmetros cinéticos, parece devido às limitações por difusão, parecendo uma camada estagnada em volta das partículas, estabelecendo um gradiente de concentração de substrato através dessa camada, necessitando uma maior concentração de substrato que a requerida para a enzima livre, para saturar a enzima ligada à partícula. A interação eletrostática entre o suporte e o substrato, parece desprezível no presente caso, uma vez que, no pH da alimentação, em torno de 6,5 o substrato sacarose não apresenta cargas elétricas. O efeito estérico, também é aparentemente desprezível nesse caso, uma vez que as moléculas de substrato são pequenas.

A temperatura ótima para invertase imobilizada em Duolite S-761, foi menor que a apresentada pela forma livre da enzima usada, concordando com os resultados de MAEDA e SUZUKI (25), USAMI NODA e GOTO (45) e USAMI, HASEGAWA e KARASAWA (44), discordando com os de BOUDRANT e CHEFTEL (6) e DICKENSHEETS et alii (14).

O pH ótimo do complexo Duolite S-761 invertase, foi deslocado para o lado básico, relativo à enzima solúvel, bem como a curva pH-atividade. Esses deslocamentos, tanto no pH ótimo, como na curva pH-atividade dependem da carga elétrica da proteína enzimática e/ou do suporte insolúvel em água. O deslocamento para o lado

alcalino pode ter sido causado por um aumento de carga negativa no suporte, isto é, o microambiente da enzima imobilizada se tornou mais ácido que o da solução externa. Dessa forma, a concentração do íon hidrogênio em volta do suporte carregado negativamente, é maior que a concentração do mesmo na solução externa, implicando numa distribuição desigual dos íons hidrogênio e hidroxila. Admitindo que a ação do pH na atividade enzimática segue um mecanismo ácido-base, tipo  $E^{-2} \xrightleftharpoons[+H^+]{-H^+} E^{-} \xrightleftharpoons[+H^+]{-H^+} E$ , conforme BAILEY e OLLIS (2), sendo E e  $E^{-2}$  formas inativas e  $E^{-}$  a forma ativa da enzima, para manter a concentração de íons em volta do suporte com a enzima na forma ativa  $E^{-}$ , vai implicar no pH mais alto na solução, do que ao redor das partículas de enzima imobilizada. USAMI, HASEGAWA e KARASAWA (44) e DICKENSHEETS et alii (14) obtiveram valores de pH ótimo para invertase imobilizada, deslocados também para o lado básico.

As soluções de sacarose usadas nos experimentos foram de concentrações baixas, com o objetivo de se evitar inibição pelo substrato, pois como afirma KOBAYASHI e MOO-YOUNG (23), ela aparece para concentrações iniciais de sacarose maiores que 0,3 M, em sistemas com enzimas imobilizadas.

Em operação contínua, no reator de leito fixo, as conversões de sacarose à açúcar redutor, variaram com os valores da velocidade linear de fluxo. As conversões diminuíram com o aumento das mesmas (diminuição dos tempos de residência) e com o aumento das concentrações iniciais de sacarose na alimentação. Para velocidades lineares de fluxo menores que 64,13 cm/min, houve um aumento acentuado nas conversões, indicando um tempo de residência adequado para se atingir maiores conversões.

Em condições de estado estacionário (concentração inicial fixa, temperatura constante, velocidade linear de fluxo constante), admitindo uniforme a concentração de invertase ao longo do leito e supondo desprezível a difusão na direção do fluxo, numa relação altura do leito pelo diâmetro médio das partículas igual a 201,34, verificou-se que o reator de leito fixo utilizado, seguiu o modelo proposto, de um reator tubular ideal com uma cinética de Michaelis-Menten, equação (7), uma vez que a figura IV.9, apresentou retas, para os diversos valores de C, resultados esses que concordam com os obtidos por GELF et alii (20), para  $\alpha$ -quimiotripsina imobilizada, em coluna.

O valor de  $V_m'$  encontrado para invertase imobilizada, operando em batelada, foi maior que o valor de  $V_m$  para a enzima livre. Quando em operação contínua,  $V_m'$  não foi constante, aumentando com as taxas de fluxo e foi sempre maior que o valor  $V_m'$  para a invertase imobilizada, operando em batelada. Isso, provavelmente, se deve a limitações de difusão de substrato e produtos, através das partículas. A hidrólise de sacarose por invertase imobilizada seguiu a cinética de Michaelis-Menten, como se pode observar na figura IV.5, o que concorda com KOBAYASHI e MOO-YOUNG (23). A constante aparente de Michaelis-Menten  $K_m'$ , para invertase imobilizada, em batelada, foi maior que o valor de  $K_m$  para a forma solúvel da enzima. Em operação contínua,  $K_m'$  foi constante até a velocidade linear de fluxo de 80,17 cm/min, aumentando a partir daí. Os valores de  $K_m'$  em operação contínua foram sempre maiores que para a enzima solúvel, porém menores do que para invertase imobilizada em batelada. A partir da velocidade linear de fluxo de 80,17 cm/min, houve um aumento acentuado, tanto em  $K_m'$ , como em  $V_m'$ , como pode-se notar nas figuras IV.11 e IV.12. Os resultados tanto para  $V_m'$ , como para  $K_m'$ , concordam razoavelmente com os obtidos por GELF et alii (20).

## V - CONCLUSÕES

Do presente trabalho, tiram-se as seguintes conclusões:

- V.1 - Resinas trocadoras de íons, tanto catiônicas como aniônicas, podem ser usadas para imobilizar enzimas.
- V.2 - O pH de imobilização tem grande influência na retenção de atividade enzimática.
- V.3 - A resina Duolite S-761, usada na imobilização da invertase, apresenta grande capacidade de retenção de atividade.
- V.4 - Constantes físicas, como pH e temperatura ótimos da invertase imobilizada, foram diferentes daquelas da forma livre da enzima.
- V.5 - Parâmetros cinéticos,  $K_m'$  e  $V_m'$ , para a enzima imobilizada, foram diferentes daqueles da forma livre da enzima.
- V.6 - Tanto a enzima livre, como a imobilizada em processo de batelada e contínuo, seguiram a cinética de Michaelis-Menten.
- V.7 - O reator de leito fixo utilizado, seguiu o modelo cinético proposto para o reator tubular ideal.
- V.8 - Os valores de  $K_m'$  e  $V_m'$ , para a operação contínua em coluna, variaram diretamente com a variação da velocidade linear de fluxo.

V.9 - A obtenção de açúcar invertido, utilizando invertase imobilizada, em Duolite S-761, operando continuamente em um reator de leito fixo, é um sistema tecnicamente viável.

V.10 - Nas condições do presente trabalho, obteve-se altas conversões de substrato a produto, utilizando baixas velocidades lineares de fluxo.

## VI - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

VI.1 - Estudar as causas da variação dos parâmetros cinéticos em relação à velocidade linear de fluxo.

VI.2 - Verificar as causas da redução de retenção de atividade enzimática com o aumento do pH.

VII - NOMENCLATURA

- CSTR = Reator de tanque agitado (Continuous Stirred Tank Reactor).
- S = Concentração do substrato, sacarose, em mol/ℓ.
- S<sub>0</sub> = Concentração inicial do substrato, sacarose, em mol/ℓ.
- v = Velocidade de reação.
- V<sub>m</sub> = Velocidade máxima de reação.
- K<sub>m</sub> = Constante de Michaelis-Menten.
- V<sub>m</sub>' = Velocidade máxima aparente de reação, para a enzima imobilizada.
- K<sub>m</sub>' = Constante de Michaelis-Menten aparente, para a enzima imolibilizada.
- F = Taxa de fluxo, em cm<sup>3</sup>/min.
- F<sub>m</sub> = Taxa de fluxo molar, em moles/min.
- V = Volume do reator, em cm<sup>3</sup>.
- A = Área da seção transversal do reator, em cm<sup>2</sup>.
- ℓ = Comprimento do reator, em cm.
- α = Conversão =  $\frac{S_0 - S}{S_0} = \frac{C_r}{2 S_0}$
- C<sub>r</sub> = Concentração de açúcar redutor, em moles/ℓ.
- γ = Porosidade do leito.
- C =  $\frac{F}{\gamma \cdot A}$  = Velocidade linear de fluxo, em cm/min.
- A<sub>t</sub> = Atividade enzimática, em  $\frac{\mu\text{mol de sacarose}}{\ell \cdot \text{min} \cdot \text{ml enzima}}$  para a inver-  
tase solúvel e  $\frac{\mu\text{mol de sacarose}}{\ell \cdot \text{min} \cdot \text{g resina}}$  para a forma imobilizalizada.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AXÉN, R. et alii. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharide by Means of Cyanogen Halides. Nature. 214: 1302 - 1304, 1967.
- 2 - BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. Tokyo. Mc Graw - Hill, 1977. 753 p.
- 3 - BASSET, J. et alii. Análise Inorgânica Quantitativa. [ Volgel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis ]. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1981. 690 p.
- 4 - BASTA, N. Immobilization routes - they're not standing still. Chem. Eng. 19: 5 - 59, April, 1982.
- 5 - BEDDOWS, C. G. & MIRAUER, R. A. Immobilization of  $\beta$  - Galactosidase and Other Enzymes onto p - Amino - Carboxylated Cellulose Derivatives. Biotechnol. Bioeng. 22 : 311 - 321, 1980.
- 6 - BOUDRANT, J. & CHEFTEL, C. Continuous Hydrolysis of Sucrose by Invertase Adsorbed in a Tubular Reactor. Biotechnol. Bioeng. 17: 827 - 844, 1975.
- 7 - BROWN, G. G. et alii. Operaciones básicas de la Ingeniería Química. [ Unit Operations ]. Barcelona, Ed. Marín, 1965. 629 p.

- 8 - Catálogo Duolite. Conditioning Ion - Exchange Resins Before Use. Diamong Shamrock, Functional Polymers Division. Cleveland, U.S.A.
- 9 - Catálogo. Método Colorimétrico para la determinación de Proteínas totales y albumina en suero. Wiener lab, Rosario, Argentina.
- 10 - CHIBATA, I. Immobilized Enzymes. 1.ed. Tokyo, Kodansha Scientific Books, 1978. 284 p.
- 11 - CHIBATA, I. et alii. Preparation and Industrial Applications of Immobilized Aminoacylases. Ferment. Technol. Today. 383 - 389, 1972.
- 12 - CLARK Jr, J. M. Experimental Biochemistry. San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1964. 228 p.
- 13 - CONN, E. E. & STUMPF, P. K. Introdução à Bioquímica. [ Outlines of Biochemistry ]. 3.ed. São Paulo, E. Blücher, 1977. 447 p.
- 14 - DICKENSHEETS, P. A. et alii. Characteristics of Yeast Invertase Immobilized on Porous Cellulose Beads. Bio-technol. Bioeng. 19: 365 - 375, 1977.
- 15 - DINELLI, D. Fibre - entrapped Enzymes. Proc. Bioch. 9 - 12, August 1972.
- 16 - DRAETTA, I. S. Isolamento, Purificação e Cinética da Invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Col. Inst. Tecnol.

- 17 - FILBERT, A. M. & PITCHER JNR, W. P. Immobilized Enzymes for Industrial Applications. Proc. Bioch. 3 - 8, September 1976.
- 18 - FILIPULSON, H. & HORNBLY, W. E. The Preparation and Properties of Yeast  $\beta$  - Fructofuranosidase Chemically Attached to Polystyrene. Biochem. J. 120: 215 - 219, 1970.
- 19 - FLYNN, A. & JOHNSON, D. B. The Immobilization of Invertase on Hornblend and on Enzacryl - TIO: Optimization and Stability Studies. Int. J. Bioch. 8(3): 243 - 247, 1977.
- 20 - GELF, G. et alii. Water Insoluble Enzymes Columns: Kinetic Study on Steady State and Transient Conditions. Biotechnol. Bioeng. 15: 315 - 322, 1974.
- 21 - KATCHALSKI, E. Applications of Water - Insoluble Enzyme Derivatives in Basic and Applied Research. Ferment. Technol. Today. 353 - 359, 1972.
- 22 - KAWASHIMA, K & UMEDA, K. Preparation of Membranous Invertase and It's Characteristics. Agr. Biol. Chem. 40(6): 1151 - 1157, 1976.
- 23 - KOBAYASHI, T. & MOO - YOUNG, M. The Kinetic and Mass Transfer Behavior of Immobilized Invertase on Ion - Exchange Resin Beads. Biotechnol. Bioeng. 15: 47 - 67, 1973.

- 24 - LILLY, M. D. & DUNNILL, P. Biochemical Reactors. Proc. Bioch. 29 - 32, Agust 1971.
- 25 - MAEDA, H, & SUZUKI, H. Preparation of Immobilized Invertase. Biotechnol. Bioeng. 15: 403 - 412, 1973.
- 26 - MAEJAKI, K. & OKIMASU, S. Immobilization of Invertase on Konjac mannan Gel. Informação Pessoal.
- 27 - MARCONI, W. et alii. Properties and Use of Invertase Entrapped in Fibers. Biotechnol. Bioeng. 16: 501 - 511, 1974.
- 28 - MASON, R. D. & WEETALL, H. H. Invertase Covalently Coupled to Porous Glass: Preparation and Charaterization. Biotechnol. Bioeng. 14: 637 - 645, 1972.
- 29 - MEITES, L. Handbook of Analytical Chemistry. 1.ed. New York, McGraw-Hill, 1963.
- 30 - MESSING, R. A. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. 1. ed. New York, Academic Press, 1975. 232 p.
- 31 - MIYAMOTO, K et alii. Intraparticle Diffusion in the Reaction Catalyzed by Immobilized Glucoamylase. J. Ferm. Technol. 51(8): 566 - 574, 1973.
- 32 - NAKAGAWA, H. et a lii. Comparison of the Properties of Tomato  $\beta$  - Fructofuranosidase Embedded within a Polyacrilamide Gel and Adsorbed on CM - Cellulose. Agr. Biol. Chem. 39(1): 1 - 5, 1975

- 33 - NELSON, J. M. & GRIFFIN, E. G. Adsorption of Invertase. J. Am. Chem. Soc. 38: 1109 - 1116, 1916.
- 34 - NELSON, J. M. & HITCHCOK, D. I. The Activity of Adsorbed Invertase. J. Am. Chem. Soc. 43: 1956 - 1961, 1921.
- 35 - OLSON, A. C. & STANLEY, W. L. Lactase and Other Enzymes Bound to a Phenol - Formaldehyde Resin with Glutaraldehyde. J. Agr. Food Chem. 21(3): 440 - 445, 1973.
- 36 - OOSHIMA, H. et alii. Characteristics of Immobilized Invertase. Biotechnol. Bioeng. 22: 2155 - 2167, 1980.
- 37 - OOSHIMA, H. et alii. Kinetic Study on Thermal Stability of Immobilized Invertase. Biotechnol. Bioeng. 22: 2169 - 2178, 1980.
- 38 - PATWARDHAN, V. S. & KARANTH, N. G. Film Diffusional Influences on the Kinetic Parameters in the Packed-Bed Immobilized Enzyme Reactors. Biotechnol. Bioeng. 24: 763 - 780, 1980.
- 39 - RASE, H. H. Chemical Reactor Design For Process Plants. 1.ed. New York, J. Wiley, 1977. v.1.
- 40 - REED, G. Enzymes in Food Processing. 2.ed. New York, Academic Press, 1975. 395 p.
- 41 - SUZUKI, H. et alii. Studies on the Water - Insoluble Enzyme Hydrolysis by Insoluble Yeast Invertase. Agr. Biol. Chem. 30(8): 807 - 812, 1966.

- 42 - SYNOWIECKI et alii. Immobilization of Invertase on Krill Chitin. Biotechnol. Bioeng. 23: 231 - 233, 1981.
- 43 - THORNTON, D. et alii. The Preparation and Properties of Hornblend as a Support for Immobilized Invertase. Bio-technol. Bioeng. 17: 1679 - 1693, 1975.
- 44 - USAMI, S. ; HASEGAWA, E. & KARASAWA, M. Preparations Properties of Immobilized Saccharase by Various Methods. Hakko Kyokaiishi. 33: 152 - 159, 1975.
- 45 - USAMI, S. ; NODA, J. & GOTO, K. Preparation and Properties of Water - Insoluble Saccharase. J. Ferment. Technol. 49(7): 598 - 603, 1971.
- 46 - WEETALL, H. H. Immobilized Enzymes and their Application in the Food and Beverage Industry. Proc. Bioch. 3 - 30, July/August 1975.
- 47 - WINGARD Jr., L. B. & PYE, E. K. Enzyme Enginering. New York, Plenum Press, 1974. v. 2.
- 48 - WESEMAN, A. & WOODWARD, J. Industrial Yeast Invertase Stabilization. Proc. Bioch. 10(6): 24 - 30, 1975.
- 49 - ZABORSKY, O. Immobilized Enzymes. 1.ed. Cleveland, CRC Press, 1973. 175 p.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dr<sup>a</sup> IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES, pela orientação deste trabalho.

À direção da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP.

À direção da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao professor IVANIR DE OLIVEIRA JUNIOR, do Departamento de Engenharia Química da UFU, pelas sugestões.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Engenharia Química da UFU, especialmente FRANCISCO CARLOS SILVA, pela ajuda na parte experimental.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.