

# ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM RESINAS DE TROCA IÔNICA E PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO

BRUNA VIEIRA CABRAL<sup>1</sup>, LARISSA NAYHARA SOARES SANTANA FALLEIROS<sup>1</sup>,  
ELOÍZIO JÚLIO RIBEIRO<sup>2</sup>

## RESUMO

Invertase é um biocatalisador potencialmente útil na produção de açúcar invertido, tendo um grande interesse no processo de imobilização em resinas de troca iônica, visto que apresenta várias vantagens em relação à enzima na forma livre, tais como redução de custo, possibilidade de melhor controle de processo, operação contínua e aumento de estabilidade. Neste trabalho foi estudado o processo de imobilização da enzima invertase em resinas de troca iônica por adsorção e ligação iônica. Para o estudo da adsorção, foram estudadas as influências conjuntas das principais variáveis que interferem na imobilização pH, concentração de enzima, temperatura do meio e tempo de imobilização. O desenvolvimento experimental do trabalho foi realizado após aplicação de planejamentos experimentais, com base em trabalhos preliminares e da literatura, para a escolha dos intervalos adequados das variáveis de interesse. Os resultados indicaram que entre as resinas estudadas a que apresentou melhores resultados na imobilização de invertase por adsorção e ligação iônica foi a Duolite A-568. As melhores condições no processo de imobilização foram: tempo de imobilização 24 horas, temperatura 29°C, pH 5,0 e concentração da enzima no meio 12,5 g/L. **Palavras-chave:** Açúcar invertido, Imobilização, Invertase e Duolite A-568.

## ABSTRACT

Invertase is a potentially useful biocatalyst for the production of invert sugar, taking great interest in the process of immobilization on ion exchange resins, since it presents several advantages over the enzyme in free form, such as cost reduction and increased stability. This study investigated the process of immobilizing the enzyme invertase on ion exchange resins by adsorption and ionic binding. For the adsorption study, was studied the combined influence of the main variables that influence the immobilization process such as pH, enzyme concentration, temperature and time. The development of the experimental work was carried out after application of experimental design, based on preliminary work and literature, to choose the appropriate intervals of the variables of interest. The results indicate that between all the tested resins Duolite A-568, showed better results in immobilization of invertase by adsorption and ionic binding was. The best conditions in the immobilization process were: immobilization time of 24 h, temperature of 29°C, pH 5.0 and enzyme concentration of 12.5 g/L.

**Keywords:** Sugar inverted, Immobilization, Invertase and Duolite A-568.

## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos industrializados surgiram proporcionando redução de custos e aumento do tempo de conservação. Dentre os aditivos usados na indústria alimentícia, destacam-se os adoçantes, responsáveis por melhorar o sabor de alimentos. Existem adoçantes naturais e sintéticos, entretanto o consumo de adoçantes naturais como a sacarose nem sempre é bem vindo, como é o caso dos diabéticos e dos obesos. Para esses casos foram desenvolvidos adoçantes sintéticos como o aspartame, sacarina, ciclamato e acesulfame-K, que apresentam suspeitas e controvérsias quanto aos seus efeitos em seres humanos, inclusive sua ação carcinogênica (VICENTE, 2000).

O açúcar invertido é uma solução mais densa comparada à sacarose, capaz de minimizar a cristalização e o crescimento de micro-organismos. Corresponde a uma mistura de açúcares em solução, constituída principalmente de glicose, frutose e sacarose residual, sendo 20% mais doce que a sacarose além de diminuir a temperatura de congelamento devido a sua afinidade com água (CADENA *et al.*, 2010).

Este açúcar é obtido a partir da hidrólise da sacarose, conhecida como reação de inversão. A hidrólise pode ser por inversão química, catalisada por ácidos e por resinas trocadoras de íons fortemente ácidas e enzimática, catalisada pela enzima invertase. A inversão química é mais fácil do ponto de vista industrial, porém o produto final apresenta qualidade inferior, devido ao escurecimento e à formação de subprodutos tóxicos nas reações secundárias, como hidroximetil-furfural (HMF) (DHAMPUR INVERTOS LTD, 1999). A obtenção de açúcar invertido por via enzimática apresenta como vantagem a obtenção de um produto de maior qualidade quando comparado ao obtido por hidrólise ácida. A hidrólise enzimática atinge um rendimento de 80%, permite a obtenção de um produto de alta qualidade, com baixos teores de cinzas, não há desenvolvimento de cor e com ausência de HMF, porém, apesar destas vantagens, a inversão enzimática é dispendiosa, devido ao alto custo da enzima (EMREGUL, SUNGUR e AKBULUT, 2006; ROCHA *et al.*, 2006, COUTINHO FILHO, 2005; RIBEIRO, 1989).

A invertase ou  $\beta$ -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) catalisa a reação de hidrólise da sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose. A enzima invertase pode ser obtida de diferentes micro-organismos. A maioria das pesquisas referentes a esta enzima estudam, principalmente, invertase extracelular. *Saccharomyces cerevisiae* é uma fonte de invertase bastante conhecida, contendo duas formas desta enzima. Uma delas é intracelular e

pobre em carboidrato, a outra corresponde a invertase extracelular rica em carboidrato, sendo esta última a mais utilizada em indústrias de bebidas e alimentos (KARKAS e ONAL, 2012).

Uma alternativa para utilizar a hidrólise enzimática é a imobilização da invertase, pois garante um produto com alta pureza sem ocasionar problemas de águas residuais, muito comum nos processos químicos. Além disso, o processo com a enzima imobilizada pode reduzir severamente o custo do processo, por permitir a reutilização da enzima e eliminar etapas posteriores ao processo de hidrólise. Alta produtividade, alta estabilidade e o baixo custo para imobilização da invertase são requisitos fundamentais para competir com o processo ácido tradicional (VUJCIC *et al.*, 2011; BERGAMASCO *et al.*, 2000; COUTINHO FILHO *et al.*, 2005; MANSFELD *et al.*, 1992).

Diante do amplo uso da invertase em indústrias alimentícias, diversos estudos foram feitos referentes à sua imobilização em diferentes suportes, objetivando analisar sua estabilidade enzimática e seu potencial de reuso. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para fixação da enzima. Assim o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa ao controle do processo (AZODI, FALAMAKI e MOHSENFAR, 2011).

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o processo de imobilização da enzima invertase em resinas de troca iônica por adsorção e ligação iônica, avaliando as influências conjuntas das principais variáveis que interferem na imobilização pH, concentração de enzima, temperatura do meio e tempo de imobilização.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – Açúcar invertido**

O açúcar invertido é um xarope composto de glicose e frutose resultante de uma reação de hidrólise da sacarose (TOMOTANI e VITOLO, 2006; ALMEIDA, 2005; RODRIGUES, 2000). É conhecido como reação de inversão, pois o xarope dos monossacarídeos desvia um feixe de luz polarizada para a esquerda, enquanto as soluções de sacarose desviam esse feixe para a direita (CABRAL, 1989).

Se comparado o açúcar invertido com o açúcar cristal, o invertido apresenta diversos benefícios, tais como (MARQUEZ, 2008):

- Melhoria do controle do processo de fabricação e da manutenção de condições higiênicas nas indústrias alimentícias;

- Alta pureza química evitando a geração de precipitados indesejáveis em função de elevados teores de ferro, cobre ou cálcio;
- Alto controle microbiológico, devido à menor atividade de água, dispensando a necessidade de pasteurização por parte do cliente;
- Elimina a necessidade de investimentos em equipamentos para a dissolução e filtração do açúcar;
- Maior solubilidade, atuando como inibidores de cristalização e reduzindo custos com frete;
- Reduz o ponto de congelamento, propriedade útil em produtos que são conservados em congeladores;
- Em produtos com baixo teor de gordura, sua utilização evita que esses comecem a quebrar e secar;
- Possui viscosidade baixa, conferindo plasticidade a sorvetes, cremes e *fondants*;
- Maior doçura relativa do que a sacarose.

O açúcar invertido pode ser obtido por catálise enzimática, catálise ácida ou por troca iônica com as resinas. O processo enzimático pode ocorrer pela adição direta da enzima ou pela imobilização da mesma em suportes inertes (ALMEIDA, 2005; RODRIGUES, 2000).

## 2.2 – Inversão via enzimática

Os métodos enzimáticos empregam as enzimas livres ou imobilizadas. Existem vários benefícios ao utilizar as enzimas imobilizadas às solúveis, tais como a reutilização do biocatalisador heterogêneo, redução de custos e melhoria no controle do processo (CAO, 2005). A hidrólise heterogênea catalisada pela enzima invertase produz um xarope de alta qualidade com baixas concentrações de (HMF) e sem desenvolvimento de cor (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Um processo típico de produção industrial consiste na adição de 100g de invertase em 1 tonelada de xarope com teor de sólidos de 60%, que deverá ser mantida sob agitação constante e temperatura controlada em torno de 60°C, durante 12 horas, para a obtenção de um grau de inversão superior a 90% (MARTINS, 2000).

O processo de hidrólise de sacarose por invertase imobilizada tem sido bastante estudado nos últimos anos, porém um dos fatores que tem impedido a sua aplicação industrial é a existência de um processo eficiente, utilizando um suporte barato e reutilizável. Desta

forma a imobilização em resinas de troca iônica tem se mostrado um método eficiente e adequado a tais exigências (TOMOTANI e VITOLO, 2006).

As principais aplicações industriais estão relacionadas com aquelas que utilizam o açúcar no estado dissolvido, tais como bebidas carbonatadas, sucos concentrados, xaropes medicinais, doces e molhos, o açúcar invertido tem sido preferencialmente utilizado pela sua estabilidade em altas concentrações, em função da sua alta solubilidade, permitindo maior tempo de vida de prateleira se comparado com soluções de sacarose. Além do mais as qualidades do produto obtido por hidrólise enzimática são bastante superiores, quando comparadas àquelas do produto da hidrólise ácida (TOMOTANI e VITOLO, 2006).

### 2.3 – Enzimas

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, todas as enzimas são proteínas (GALVÃO, 2004). Pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (GÜRSEL *et al.*, 2003; ISIK *et al.*, 2003).

A utilização das enzimas é antiga, antes de sua função e dos próprios microrganismos serem conhecidos. Um dos primeiros alimentos a utilizar a ação enzimática que se tem notícia foi o pão. Pasteur, no final do século passado demonstrou a intervenção das leveduras no processo de fermentação alcoólica e o trabalho que evidenciou a ação das enzimas fora das células (CABRAL, 1981).

Essencialmente as enzimas apresentam três propriedades principais: estabilidade, atividade e especificidade (BAILEY e OLLIS, 1986; BLANCH e CLARK, 1997; GALVÃO, 2004):

*Estabilidade:* a capacidade de uma enzima depende de sua estrutura nativa, a qual é mantida por meio de forças de interação (pontes de hidrogênio e ligações de sulfeto, forças de Van der Waals, interações apolares e iônicas). Alterações no ambiente reacional podem debilitar essas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e ocasionando perda parcial ou total da sua funcionabilidade biológica. Assim a estabilidade pode ser afetada por variação de temperatura, pH e presença de solventes polares.

*Atividade:* esta propriedade de uma enzima atua na diminuição da energia de ativação requerida para transformar um substrato em produto, aumentando a velocidade de reação. A capacidade catalítica da enzima reside no seu sítio ativo e este compreende um

número pequeno de aminoácidos. O sítio ativo é uma estrutura complexa cuja configuração permite alojar a molécula de substrato na posição correta para que os grupos funcionais da enzima efetuem sua transformação química.

*Especificidade:* a especificidade define a afinidade de uma enzima por grupos específicos em um determinado substrato. Esta é uma propriedade imprescindível das enzimas enquanto catalisadores. Duas características estruturais são determinantes na especificidade da enzima: O substrato possui ligações químicas que podem ser atacadas pelos grupos funcionais do sítio ativo da enzima e o substrato possui grupos funcionais que se unem à enzima, permitindo seu correto alinhamento no sítio ativo para que a reação possa ocorrer.

Como as enzimas não são consumidas na reação, sua ação catalítica é semelhante aos catalisadores inorgânicos. Porém, é diferente dos catalisadores sintéticos comuns pela forma suave que realiza a catálise, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambiente e, principalmente com elevado grau de especificidade em relação ao substrato.

### 2.3.1 – Invertase

Invertase ou  $\beta$ -D-frutofuranosidase frutohidrolase (E.C.3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise do terminal não redutor do resíduo  $\beta$ -D-frutofuranosídeo em frutofuranosídeos. Além disso, a invertase catalisa reações de transferência com outros aceptores, além da água. Isso resulta na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (VICENTE, 2000).

Existem várias fontes de invertase, tais como, leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais, mas a principal fonte de produção industrial são as leveduras. A enzima apresenta-se em duas formas, 80% são externas, localizadas entre a membrana plasmática e a parede celular, os 20% restantes são intracelulares, desprovidas de carboidratos e localizadas no protoplasma (CABRAL, 1982; ISIK *et al.*, 2003; VICENTE, 2000).

A temperatura ótima depende do grau de purificação da enzima e da concentração do substrato, tendo sido encontrado valores entre 23 e 55°C (DRAETTA, 1971). A estabilidade térmica da invertase pode ser devido a estrutura terciária da proteína, a qual contém interações carboidrato-proteína, com ligações cruzadas na cadeia polipeptídica (WISEMAN e WOODWARD, 1975 ).

O mecanismo de ação da invertase não é totalmente conhecido, mas estudos com a enzima têm sugerido o envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (VICENTE, 2000). Um mecanismo para a formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por LAIDLER (1958) e citado por BOWSKI *et al.*, (1971), o

qual está representado na Figura 2.1. Pode se observar a influência do pH no mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos.

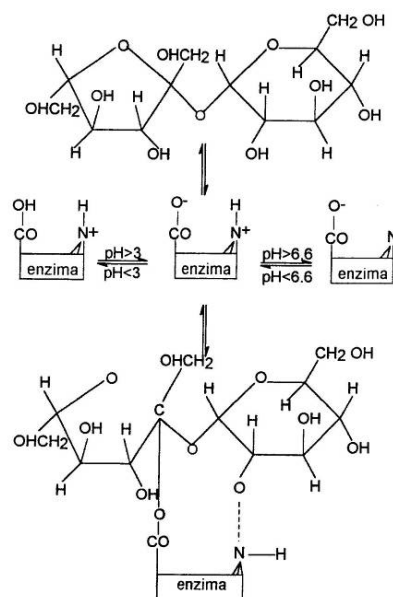


Figura 2.1 – Mecanismo sugerido para a formação do complexo ativo invertase-sacarose (BOWSKI *et al.*, 1971).

Através deste mecanismo observa-se que as formas carregadas eletricamente são ativas. Assim existe um pH no qual a concentração da forma ativa é máxima, sendo este considerado como pH ótimo, acarretando a atividade máxima (CABRAL, 1989). O pH ótimo da invertase de leveduras na forma livre situa-se entre 4,4 a 5,5. DURANT e MONSAN (1982) recomendam pH 4,5 e temperatura 55°C na hidrólise em xaropes de sacarose a 60°brix.

## 2.4 – Enzimas imobilizadas

Biocatalisadores, enzimas ou células, têm sido amplamente utilizadas em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Há muitos anos, esforços intensivos têm sido empreendidos não somente no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores, mas também na elucidação de técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos. Apesar destes esforços intensivos, amplamente documentados na forma de publicações técnicas e registros de patentes, poucos processos baseados em técnicas de imobilização, seja de enzimas ou de células, foram implementados em escala industrial (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores

fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR E KRAEMER, 2000).

A imobilização é um processo que pode ser definido como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador (TAMPIOM e TAMPIOM, 1988). A imobilização pode ser definida também como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989). O uso em processo contínuo, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do biocatalisador são as principais vantagens propiciadas pela imobilização (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização. A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a utilização de processo contínuo (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006).

As enzimas imobilizadas possuem várias vantagens sobre as enzimas livres (BERGAMASCO *et al.*, 2000; GÜRSEL *et al.*, 2003; GÓMEZ *et al.*, 2005; SZYMANSKA *et al.*, 2007), tais como:

- Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, por serem facilmente controlados;
- Reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- É possível usar alta dosagem de enzima por volume de reator, comparada ao uso de enzimas livres;
- Os produtos são facilmente separados do meio reacional;
- Em alguns casos a estabilidade e a atividade são aumentadas pela imobilização;
- Esta técnica permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa.

As principais desvantagens da imobilização são: a possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização e os efeitos difusionais devido ao transporte do



substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada (RIBEIRO, 1989; BAYRAMOGLU *et al.*, 2003).

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzimas data do início do século XX, quando Nelson e Griffin (1916) adsorveram invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose.

## 2.5 – Métodos de imobilização de enzimas

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no aprisionamento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas (HAIDER e HUSAIN, 2008), conforme pode ser verificado na Figura 2.2.

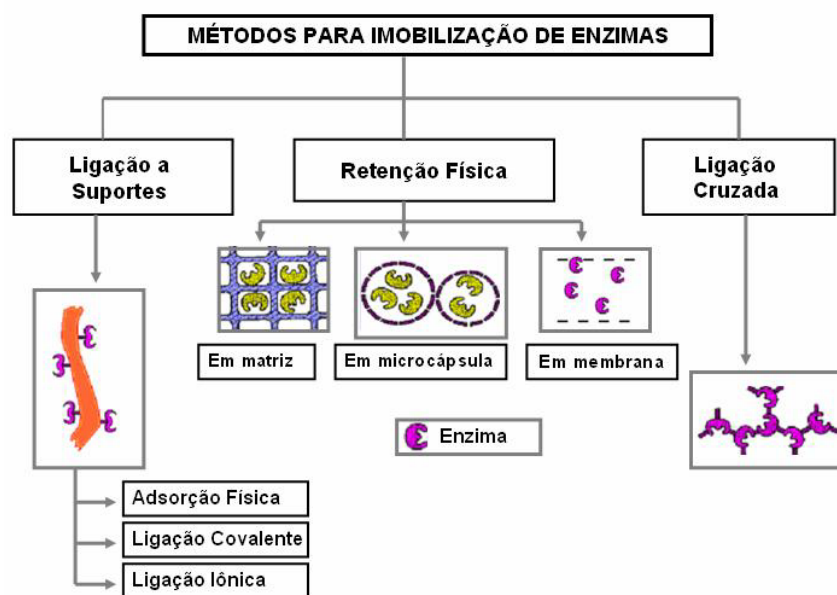


Figura 2.2 – Métodos para imobilização de enzimas (FISCHER , 2010).

### 2.5.1 – Ligação a suportes insolúveis

Pode ser dividido em cinco categorias de acordo com o tipo de interação enzima-suporte (adsorção física, ligação iônica, ligação metálica, ligação covalente e ligações cruzadas e co-cruzadas).

O método de ligação a suportes insolúveis pode ser dividido em adsorção física, ligação metálica, ligação covalente e ligação iônica:

- *Adsorção física*: É o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, força iônica, concentração de enzimas e temperatura. O controle dessas variáveis é requerido para a adsorção otimizada e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima.

Embora este tipo de imobilização seja fácil de executar, os mecanismos envolvidos na união suporte/enzima são complexos, pois envolvem vários tipos de ligações não covalentes atuando simultaneamente, a saber, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo, forças eletrostáticas e forças hidrofóbicas. Todas estas ligações são rompidas com facilidade através da variação do pH, da força iônica, temperatura e da natureza do solvente. A fraqueza da interação suporte/enzima é o fator responsável pela fragilidade apresentada por este tipo de sistema imobilizado. Para que o mesmo seja estável é indispensável que as condições de adsorção da enzima ao suporte sejam idênticas às do sistema reacional no qual se utilizará o sistema imobilizado. Caso a interação suporte/enzima seja de natureza essencialmente iônica, uma ligeira mudança do pH ou da força iônica do meio de reação será suficiente para causar a dessorção da proteína (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; JEGANNATHAN *et al.*, 2008).

No trabalho de D'Souza e Godbole (2002) a invertase foi imobilizada em casca de arroz por adsorção seguida de ligação cruzada utilizando 2% de glutaraldeído. Como a casca de arroz possui sílica obteve ótimas características de estabilidade. Oosterom *et al.*, (1998) também utilizou a adsorção seguida da ligação cruzada para imobilizar a enzima  $\beta$ -galactosidase em uma resina de troca iônica tipo Duolite S-761 para utilizar na síntese de galactosídeos.

- *Ligação metálica*: Neste método usa-se um metal de transição como ativador da superfície do suporte, permitindo o acoplamento direto da enzima. Também é um método de simples preparação e força de ligação intermediária. Mantém a atividade da enzima, porém a estabilidade operacional obtida, quando se trabalha com substratos de alta massa molecular, é baixa, devido aos metais envolvidos (ZANIN e MORAES, 2004).

- *Ligação covalente*: A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É

necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (JEGANNATHAN *et al.*, 2008; MATEO *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2011 ).

*-Ligação iônica:* O princípio envolvido no método de imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido, que contém resíduos para troca iônica. A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente (FERNANDES *et al.*, 2006).

O procedimento deste método é feito da mesma forma que no processo de adsorção física. Como desvantagem, neste método também pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio, visto que para este método há total dependência destes. As vantagens são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, devido ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização, o que conduz à obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas (WEETALL, 1975).

*- Ligações covalentes multipontuais:* O estudo de métodos de imobilização torna-se cada vez mais importante diante da busca pela estabilidade enzimática. A imobilização multipontual tem sido constantemente estudada como um método que leva à estabilização enzimática. A imobilização multipontual consiste na formação de várias ligações covalentes entre grupos reativos da enzima e vários grupos ativos do suporte. Para se obter o derivado estável pela técnica de imobilização multipontual, deve-se selecionar um suporte morfológicamente apropriado. Suportes porosos, cuja estrutura interna tem grande área superficial, como por exemplo, sílica, alumina e géis de agarose, promovem congruência geométrica entre a enzima e o suporte, aumentando a rigidez de uma pequena parte da área superficial da enzima (aumento de 10 a 20%), que é transladada para toda a estrutura terciária, devido às fortes interações entre todas as partes da molécula de proteína (GUISÁN *et al.*, 1991).

## 2.6 – Suportes para imobilização de enzimas

Vários suportes, naturais ou sintéticos, são utilizados para a imobilização de enzimas. Embora saiba que não existe um suporte universal, existem características primordiais a serem observadas para a escolha de um suporte, tais como: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, regenerabilidade, morfologia, composição, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, dentre outras (GALVÃO, 2004; MESSING, 1975).

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. A Tabela 2.1 ilustra os diferentes tipos de suportes.

Tabela 2.1 – Classificação dos suportes de acordo com a composição (GALVÃO, 2004)

| <b>Suportes</b>  |                   |                    |                   |                  |
|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| <b>Orgânicos</b> |                   | <b>Inorgânicos</b> |                   |                  |
| <b>Naturais</b>  | <b>Sintéticos</b> | <b>Minerais</b>    | <b>Fabricados</b> |                  |
| Polissacarídeos  | Proteínas         | Poliestireno       | Areia             | Vidro (PC)       |
| Celulose         | Colágeno          | Poliacrilatos      | Bentonita         | Cerâmica (PC)    |
| Agarose          | Albumina          | Polivinilos        | Homeblenda        | Sílica (PC)      |
| Agar             | Gelatina          | Nylon              | Pedra-pome        | Aluminossilicato |
| Quitosana        | Seda              | Poliamidas         |                   | Óxido de Ferro   |
| Amido            |                   | Vinil              |                   | Óxido de Níquel  |
|                  |                   | Policrilamidas     |                   |                  |

Os suportes podem se classificados como porosos ou não-porosos. Os porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização e protege a enzima contra turbulências externas, já os não-porosos têm a desvantagem de não possuir grande área para a imobilização, mas elimina o problema de transferência de massa interna, devido à diminuição do tamanho das partículas e pelo aumento de velocidade de escoamento do fluido (GALVÃO, 2004).

Na imobilização utilizando suportes porosos estes devem ter poros de tamanho suficiente para permitir a acomodação da enzima e o acesso do substrato. Suportes porosos insolúveis para imobilização resultam em grandes áreas superficiais disponíveis, mas implica em dificuldades difusionais para entrada de reagentes e saídas de produtos, principalmente quando os substratos são macro-moléculas (GALVÃO, 2004).

A maior parte dos suportes não permite o acoplamento direto da enzima, necessitando de uma etapa de ativação do mesmo. Utilizam para isso reagentes ativadores como os

brometos de cianogênio e reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos (GALVÃO, 2004).

Suportes ativados com grupos epóxidos podem apresentar o inconveniente de baixa reatividade, mesmo que possua a capacidade de reagir com grupos distintos da enzima. Esse problema pode ser minimizado com a modificação parcial dos grupos epóxidos com etilenodiamina, ácido iminodiacético (IDA), e outros. Esses grupos favorecem a adsorção prévia da enzima, facilitando a etapa final de ligação covalente com os grupos epóxidos não modificados do suporte (BAYRAMOGLU *et al.*, 2003; MATEO *et al.*, 2000).

Entre os suportes orgânicos e inorgânicos, os últimos apresentam melhores características para serem utilizados nos processos industriais, principalmente a sua estabilidade à degradação física, química, térmica e microbiana, além da resistência mecânica e estabilidade industrial, que evita a compactação em processos contínuos e a possibilidade de regeneração do suporte através do processo pirolítico (CABRAL, 1981; COUTINHO FILHO, 2005; MESSING, 1978; RIBEIRO, 1989). Os suportes orgânicos apresentam uma diversidade de radicais disponíveis para a ligação com as enzimas, enquanto os inorgânicos possuem um caráter inerte (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Há várias citações de uso de polímeros como suportes para a imobilização da invertase (GÓMEZ, *et al.*, 2005; GÜRSEL, *et al.*, 2003; KIRALP, *et al.*, 2003; SANJAY, *et al.*, 2005; TOMOTANI e VITOLO, 2006). Os maiores problemas ao utilizar os suportes de polímeros são o baixo pH e a baixa estabilidade térmica (SANJAY *et al.*, 2005).

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 – Materiais**

Neste trabalho foi utilizada enzima invertase de leveduras da marca Sigma, disponível na forma de pó solúvel em água.

Os reagentes utilizados foram todos na forma P.A., exceto a sacarose, usada na forma de açúcar cristal comercial.

Como suportes para a imobilização de invertase foram utilizadas as resinas Dowex Marathon A e C, fornecidas pela *Dow Chemical Company* e Duolite A-568 e Duolite S-761, produzidas por *Rohm e Haas Company*.

### 3.2 – Imobilização de invertase

Nesta etapa do trabalho foi estudado o processo de imobilização da enzima invertase em resinas de troca iônica por adsorção e ligação iônica. Foram estudadas as influências conjuntas das principais variáveis que interferem na imobilização, como pH, concentração de enzima, temperatura do meio e tempo de imobilização;

O desenvolvimento experimental do estudo da influência conjunta das variáveis supracitadas foi realizado após aplicação de planejamento experimental, com base em trabalhos preliminares e da literatura, para a escolha dos intervalos adequados das variáveis de interesse. Como respostas do planejamento obtivemos a atividade catalítica alcançada e a estabilidade do biocatalisador.

### 3.3 – Métodos analíticos

#### *a-) Dosagem de açúcares*

Glicose e frutose foram dosadas como açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1959). A sacarose também foi dosada pelo mesmo método, após sua inversão total com ácido.

#### *b-) Determinação da atividade da enzima*

As atividades, tanto da enzima livre como imobilizada, foram determinadas pelo procedimento de taxas iniciais de reação (ALMEIDA *et al.*, 2005; COUTINHO FILHO *et al.*, 2005; RIBEIRO, 1989; VICENTE, 2000). Uma unidade de atividade de invertase imobilizada foi definida como  $U_i$  (grama de açúcar redutor produzido por litro de meio reacional, por minuto, por grama de suporte).

## 4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Escolha do Suporte

As resinas Dowex Marathon A e C da Dow Chemical Company e as resinas Duolite A-568 e Duolite S-761, da *Rohm e Hass* após ativação, foram preliminarmente testadas em triplicatas com relação à retenção de atividade de invertase a partir de soluções da enzima.

Os testes preliminares de imobilização de invertase nas resinas citadas anteriormente indicaram que apenas Duolite A-568 e Duolite S-761 apresentaram atividade enzimática imobilizada, sendo que a atividade alcançada com a primeira foi bastante superior, como pode ser verificado na Tabela 4.1. A unidade utilizada para expressar atividade da invertase imobilizada é  $U_i$  (grama de açúcar redutor por litro, minuto, grama de resina).

Tabela 4.1 – Resultados preliminares de imobilização de invertase nas resinas

| <b>Resinas</b>   | <b>IA (%)</b> | <b>A<sub>I</sub> (U<sub>i</sub>)</b> |
|------------------|---------------|--------------------------------------|
| Dowex Marathon A | 35,44 ± 0,31  | 0                                    |
| Dowex Marathon C | 22,70 ± 0,75  | 0                                    |
| Duolite A-568    | 54,81 ± 0,41  | 0,562 ± 0,03                         |
| Duolite S-761    | 39,10 ± 1,61  | 0,274 ± 0,02                         |

Observa-se pelos valores encontrados do índice de adsorção (IA) e pela atividade de invertase imobilizada ( $A_I$ ) apresentados na Tabela 4.1, que a resina Duolite A-568 é o suporte que apresenta os melhores resultados, por isso esta resina foi utilizada durante todo o trabalho subsequente. Após a regeneração, este suporte apresentou a mesma retenção de atividade que o suporte original.

#### 4.2 – Influência do Tempo no Processo de Imobilização em Resina Duolite A-568

A influência do tempo no processo de imobilização de invertase na resina Duolite A-568 é apresentada na Figura 4.1, na qual verifica-se um aumento significativo de atividade da enzima imobilizada até 24 horas. Com base nestes resultados, todos os experimentos de imobilização realizados neste trabalho utilizaram um tempo de 24 horas.

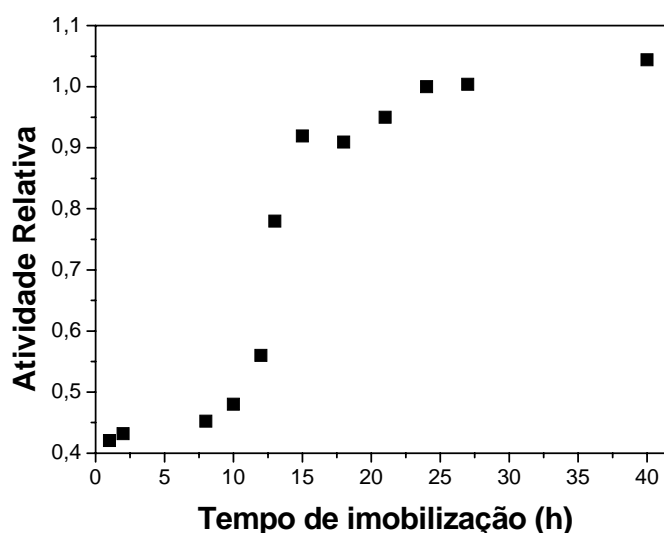


Figura 4.1 – Influência do tempo de imobilização na atividade enzimática relativa da invertase imobilizada.

#### 3.3 – Otimização do Processo de Imobilização

Visando otimizar o processo de imobilização de invertase na resina Duolite A-568, foram estudadas as influências conjuntas da temperatura ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) e concentração de enzima ( $X_3$ ) no meio de imobilização através de um Planejamento Composto Central (PCC). Os resultados das atividades enzimáticas obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.



Tabela 4.2 - Atividade enzimática obtida em cada experimento do planejamento.

| Experimentos | Valor real (valor codificado)    |                      |   | Atividade enzimática (U <sub>i</sub> ) |
|--------------|----------------------------------|----------------------|---|--|
|              | Temperatura °C (X <sub>1</sub> ) | pH (X <sub>2</sub> ) | Concentração de invertase - g/L (X <sub>3</sub> ) |  |
| 1            | 14 (-1)                          | 3,5 (-1)             | 3,0 (-1)  | 0,4822                                 |
| 2            | 14 (-1)                          | 3,5 (-1)             | 17,0 (1)  | 2,1956                                 |
| 3            | 14 (-1)                          | 6,5 (1)              | 3,0 (-1)  | 0,5342                                 |
| 4            | 14 (-1)                          | 6,5 (1)              | 17,0 (1)  | 0,7618                                 |
| 5            | 40 (1)                           | 3,5 (-1)             | 3,0 (-1)  | 0,6682                                 |
| 6            | 40 (1)                           | 3,5 (-1)             | 17,0 (1)  | 2,3204                                 |
| 7            | 40 (1)                           | 6,5 (1)              | 3,0 (-1)  | 1,3322                                 |
| 8            | 40 (1)                           | 6,5 (1)              | 17,0 (1)  | 1,7288                                 |
| 9            | 9 (- $\alpha$ )                  | 5,0 (0)              | 10,0 (0)  | 1,9222                                 |
| 10           | 45 (+ $\alpha$ )                 | 5,0 (0)              | 10,0 (0)  | 3,2266                                 |
| 11           | 27 (0)                           | 3,0 (- $\alpha$ )    | 10,0 (0)  | 1,3176                                 |
| 12           | 27 (0)                           | 7,0 (+ $\alpha$ )    | 10,0 (0)  | 2,6404                                 |
| 13           | 27 (0)                           | 5,0 (0)              | 0,5 (- $\alpha$ )                                 | 0,4144                                 |
| 14           | 27 (0)                           | 5,0 (0)              | 19,0 (+ $\alpha$ )                                | 4,2622                                 |
| 15           | 27 (0)                           | 5,0 (0)              | 10,0 (0)  | 4,5354                                 |
| 16           | 27 (0)                           | 5,0 (0)              | 10,0 (0)  | 5,0254                                 |
| 17           | 27 (0)                           | 5,0 (0)              | 10,0 (0)  | 4,9366                                 |

Observa-se pela Tabela 4.2 que a atividade enzimática alcançada durante os experimentos variou de 0,4144 Ui a 5,0254 Ui. Os maiores valores de atividade alcançados foram nos ensaios do ponto central do PCC.

Os resultados experimentais de atividade enzimática imobilizada foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o software Statistica 7.0. Assim, estão representados na Tabela 4.3 os termos lineares, as interações e os termos quadráticos das três variáveis estudadas e as respectivas análises no teste t Student.

Tabela 4.3 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC.

| Fatores | Coefficiente de regressão | Erro Padrão | Nível significância p-valor |
|---------|---------------------------|-------------|-----------------------------|
| Média   | 4,66                      | 0,389       | 0,000006                    |
| X1 (L)  | 0,33                      | 0,219       | 0,177                       |
| X1 (Q)  | -1,01                     | 0,289       | 0,009                       |
| X2 (L)  | 0,041                     | 0,219       | 0,856                       |
| X2 (Q)  | -1,34                     | 0,289       | 0,002                       |
| X3 (L)  | 0,79                      | 0,219       | 0,008                       |
| X3 (Q)  | -1,14                     | 0,289       | 0,005                       |
| X1X2    | 0,18                      | 0,265       | 0,515                       |
| X1X3    | 0,013                     | 0,265       | 0,96                        |
| X2X3    | -0,34                     | 0,265       | 0,237                       |

Após a realização da regressão múltipla no programa *Statistic® 7.0*, utilizando os resultados da atividade enzimática apresentados na Tabela 4.1, obteve-se a Equação 1 completa:

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 4,66 + 0,33.X_1 + 0,041.X_2 + 0,79.X_3 - 1,01.X_1^2 - 1,34.X_2^2 - 1,14.X_3^2 \\
 & + 0,18.X_1X_2 + 0,013.X_1X_3 - 0,34.X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Devido à grande variedade inerente aos processos bioquímicos que envolvem enzimas, foram considerados significativos os parâmetros de nível de significância menores que 10% ( $p < 0,1$ ). Observa-se na Tabela 4.3 que as variáveis não significativas do modelo foram a temperatura e o pH nos seus termos lineares (X1(L) e X2(L)), as interações temperatura/pH (X1X2), temperatura/concentração de enzima (X1X3) e pH/concentração de enzima (X2X3).

Com a eliminação dos parâmetros não significativos, obtiveram-se as seguintes relações apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC

| Fatores                                      | Coefficiente de regressão | Erro Padrão | Nível de significância p-valor |
|--|---------------------------|-------------|--------------------------------|
| Média  | 4,6598                    | 0,372       | 0                              |
| X1 (Q)                                       | -1,0180                   | 0,277       | 0,0042                         |
| X2 (Q)                                       | -1,3432                   | 0,277       | 0,0006                         |
| X3 (L)                                       | 0,7886                    | 0,210       | 0,0037                         |
| X3 (Q)                                       | -1,1470                   | 0,277       | 0,0020                         |
| Coefficiente de determinação ( $R^2$ )= 0,87 |                           |             |                                |

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado na Equação 2.

$$Atividade = 4,6598 + 0,7886.X_3 - 1,018.X_1^2 - 1,3432.X_2^2 - 1,147.X_3^2 \quad (2)$$

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,87 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na obtenção da atividade de enzima imobilizada, mostrando que 87% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta (Equação 2).

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.5 verifica-se que o  $F_{calc}$  foi significativo ( $p < 0,01$ ). O resultado de  $F$  calculado ( $F_{calc}$ ) foi superior ao  $F$  tabelado ( $F_t$ ) para um nível de significância de 1%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Tabela 4.5 – ANOVA para a resposta de atividade enzimática.

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | $F_{calc}$ | P - valor |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------|-----------|
| Regressão         | 37,6094           | 9                  | 4,1788         | 7,4179     | 0,0075    |
| Resíduos          | 3,9434            | 7                  | 0,5633         |            |           |
| Total             | 41,5527           |                    |                |            |           |

$$F_t = F_{9; 7; 0,1} = 6,72$$

A Figura 4.2 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.3, a representação dos valores preditos versus observados.

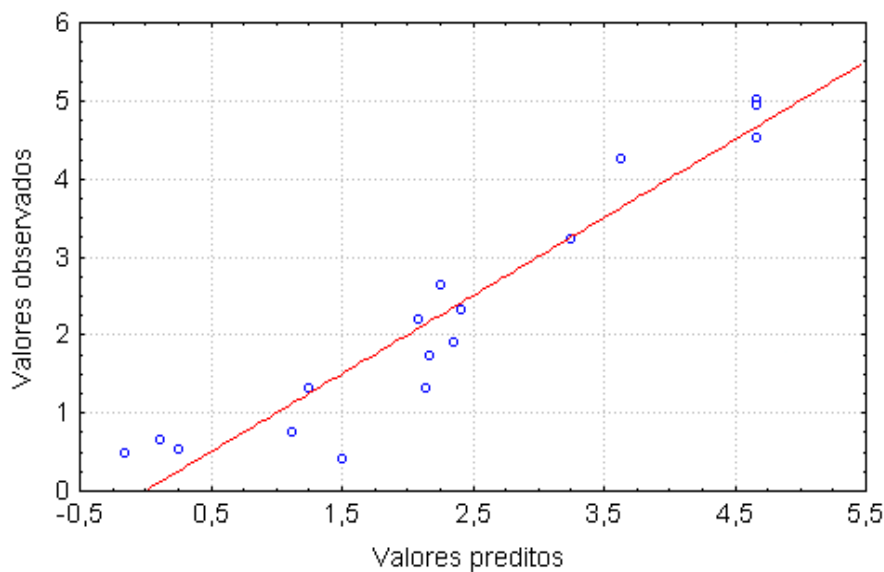


Figura 4.2 – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta de atividade enzimática.

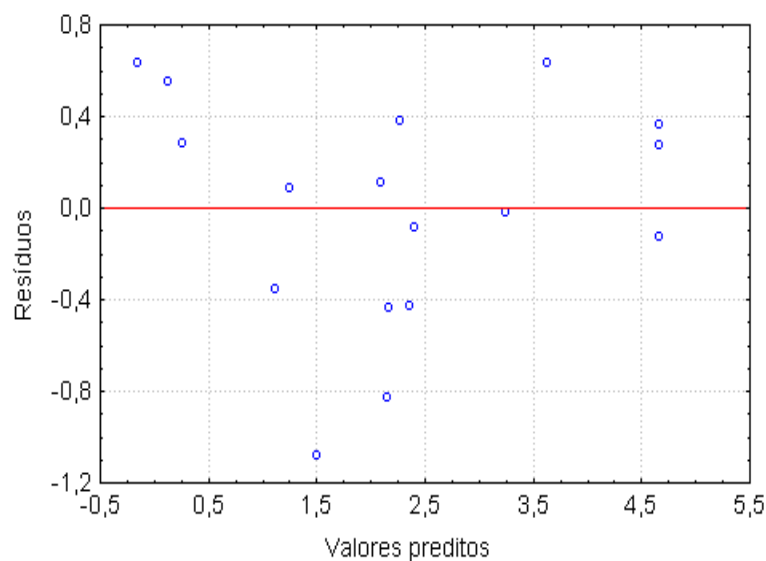


Figura 4.3 – Valores experimentais em função valores previstos pelo modelo para a resposta de atividade enzimática.

Observando a Figura 4.2, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.3, nota-se que as respostas experimentais para obtidas para atividade enzimática apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica, com coeficiente de determinação de 87%.

Como o modelo foi significativo foi possível construir as superfícies de respostas, analisadas duas a duas, e definir regiões de interesse. As superfícies estão representadas nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6.

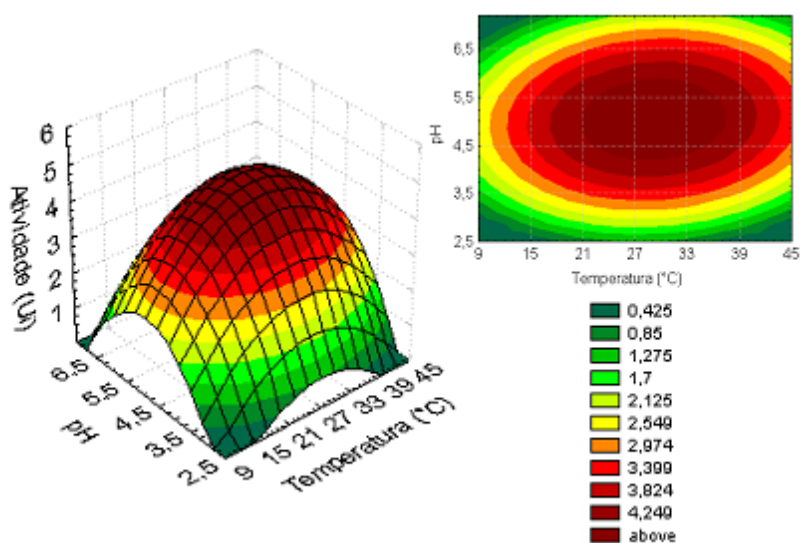


Figura 4.4 – Superfície de resposta da influência da temperatura e do pH na atividade de invertase imobilizada.

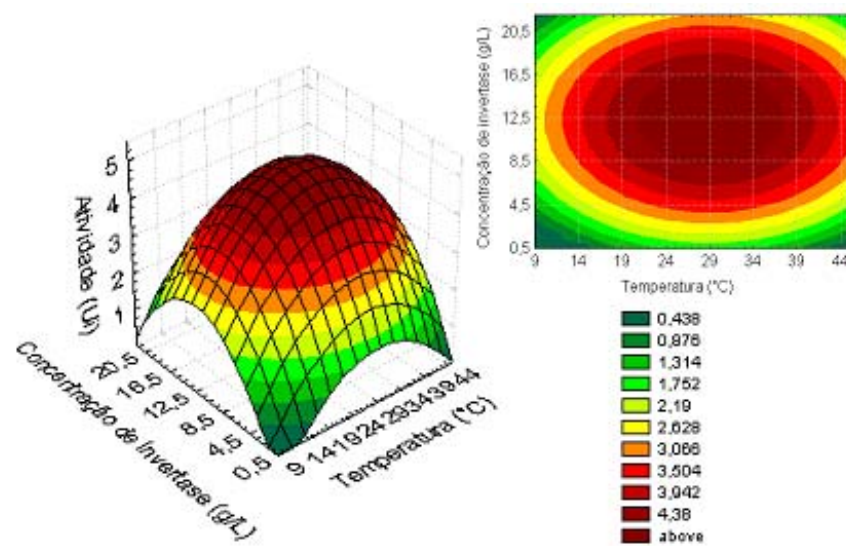


Figure 4.5 – Superfície de resposta da influência da temperatura e da concentração de enzima na atividade de invertase imobilizada.

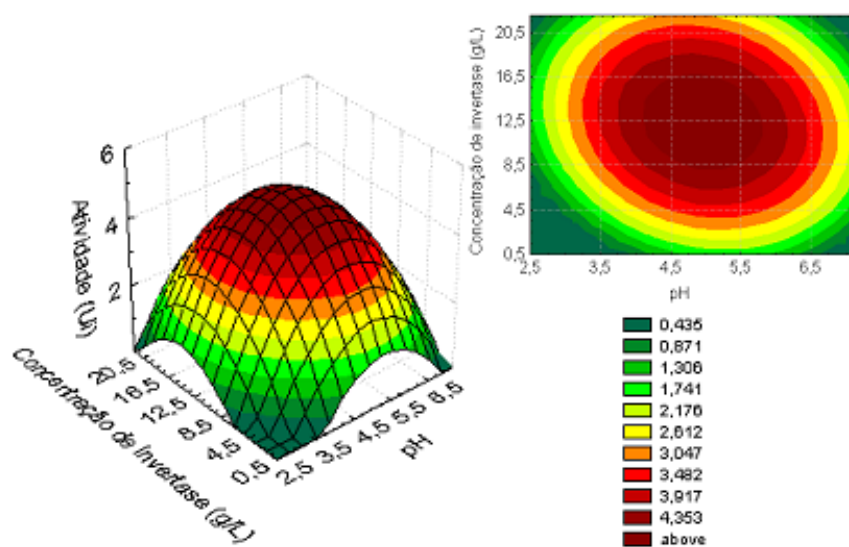


Figure 4.6 – Superfície de resposta da influência do pH e da concentração de enzima na atividade de invertase imobilizada.

Observa-se que em todas as superfícies existe uma região correspondente à uma resposta máxima. Analisando as Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 observa-se que a faixa de pH e de temperatura correspondente à máxima atividade esta compreendida próxima ao ponto central, a região de máxima atividade engloba a temperatura de 21 a 36°C e o pH de 4,2 a 5,7. Nas Figuras 4.5 e 4.6, observa-se que a região de maior atividade correspondente à concentração enzimática está um pouco deslocada para a esquerda, ou seja, engloba o

ponto central e acima dele, a concentração de invertase varia de 8,5 a 16,5 g/L na região de máxima atividade obtida.

A fim de obter o ponto estacionário que maximiza a resposta de atividade enzimática no processo de imobilização, realizou-se uma análise canônica utilizando a equação completa (Equação 1). As variáveis das coordenadas  $X_1 = 0,058$ ;  $X_2 = 0,2102$  e  $X_3 = 0,5075$ , representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Os valores encontrados para a maximização da atividade foram a temperatura ( $X_1$ ) igual a 29°C, o pH ( $X_2$ ) igual a 5,0 e concentração de invertase ( $X_3$ ) igual a 12,5 g/L. Estes resultados corroboram com os resultados de Arica e Bayramoglu (2006) que obtiveram pH 5,5 como a condição que melhor adsorveu invertase em um suporte à base de polietilenoimina, utilizando a proporção de 52 mg de invertase por grama de catalisador a 20°C.

Para a validação do modelo, foi realizado um experimento nas condições do ponto ótimo encontrado e o valor experimental da atividade enzimática foi 4,606  $U_i$  e jogando os valores codificados encontrados na análise canônica na Equação 1, obteve atividade enzimática igual a 4,7038  $U_i$ , próxima da experimental (4,606  $U_i$ )

## **5 – CONCLUSÃO**

Entre as resinas estudadas a que apresentou melhores resultados na imobilização de invertase por adsorção e ligação iônica foi a Duolite A-568. No estudo da influência do tempo de imobilização na atividade enzimática verificou-se um aumento significativo de atividade da enzima imobilizada utilizando tempo de imobilização de 24 horas. As condições ótimas para o processo de imobilização de invertase em Duolite A-568 foram tempo de imobilização de 24 horas, temperatura de 29°C, pH 5,0 e concentração da enzima no meio de 12,5 g/L, atingindo atividade de 4,606  $U_i$ .

## **6 – AGRADECIMENTOS**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. C. S.; ARAÚJO, L. C.; COSTA, A. M.; ABREU, C. A. M.; LIMA, M. A. G. A.; PALHA, M. L. A. P. F. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 8, 2005.
- ARICA, M. Y.; BAYRAMOĞLU, G. Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly (GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 38, p. 131-138, 2006.
- AZODI, M.; FALAMAKI, C.; MOHSENFAR, A. Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 69, p. 154–160, 2011.
- BAILEY, J. E. e OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second edition. New York, 1986.
- BAYRAMOĞLU, G.; AKGÖL, S.; BULUT, A.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Covalente immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl metacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, pp. 117-126, 2003.
- BERGAMASCO R.; BASSETTI F.J.; MORAES F.; ZANIN G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazil Journal Chemical Engineering**, v.17, p. 4-7, 2000.
- BLANCH, H. W. e CLARK, D. S. *Biochemical Engineering*. Estados Unidos. 1997.
- BOWSKI, L.; SANI, R.; RYU, D. Y.; VIETH, W. R.. Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotechnology Bioengineering*. v. 13, p. 641-656, 1971.
- CABRAL, F. A. Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio.(Dissertação de mestrado em engenharia de alimentos) Campinas, SP, 1989, 145p.
- CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; CARDOSO, J. P. Immobilization of amyloglucosidase on alkalyne derivatives of metal-link activated inorganic supports. *Biotechnology Bioengineering*. v. 23, p. 2083-2092, 1981.
- CADENA, D.P.G.; JERONIMO, R.A.S.; MELO, J.M.; SILVA, R.A.; FILHO, J.L.L.; PIMENTEL, M.C.B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1595–1602, 2010.
- CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**, n.3, p.3-20, 1989.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 9, p. 217-226, 2005.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de Biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos, **Revista Analytica**, N°23, p. 60-70; 2006

COUTINHO, FILHO U.; RIBEIRO, E. J.; MAUGERI FILHO, F. Estabilidade de invertase imobilizada em sílica. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15, Recife, 2005. Anais, 2005.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 52, p. 59-62, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRÃO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quím. Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DHAMPUR INVERTOS LTD. <http://www.sugarindia.com>.

DURAND, G. e MONSAN, P. Lês Enzymes – Production et utilisations industrielles. Bordas, Paris, 1982.

DRAETTA, I.S. Isolamento, purificação e cinética da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Col. Inst. Tecnologia de Alimentos. v.4, p. 23-37, 1971.

EMREGUL E., SUNGUR S., AKBULUT U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, v. 97, p. 591-597, 2006

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 136 p., 2010.

FERNANDES, P.; ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S. Desing and Characterisation of a Enzyme System for Inulin Hidrolysis. **Food Chemistry**. v. 95, p.77-82, 2006.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C., CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

GALVÃO, C. M. A. Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes. (Tese de doutorado em engenharia química). São Carlos, SP. 2004, 191p.

GÓMEZ, L.; RAMÍREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005.

GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; CUESTA, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSSEL, C. M. Immobilization-stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. **BioTechnology and Bioengineering**, v.38, p.1144-1152, 1991.

GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L., YAGCI Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *Reactive & Functional Polymers*. v. 57, p. 57-65, 2003.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Hydrolysis of Milk/whey Lactose by  $\beta$ -galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with**



Calcium Alginate Entrapped Enzyme. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2008.

ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAGCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/ polypyrrole matrices. *European Polymer Journal*. v. 39, p. 2375-2381, 2003.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 28(4), p. 253-64. 2008.

KARKAS, T.; ÖNAL, S. Characteristics of invertase partitioned in polyethylene glycol/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**. v.60, p. 142– 150, 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v.10, p.157-176, 2000.

KENNEDY, J. F. e CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization. In: *Enzyme Technology*. (REHM. H.J. e REED G., EDITORS). V. 7A, P. 347-406, 1987.

KIRALP, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. Immobilization of invertase in copolymers of thiophene functionalized menthyl ester with pyrrole. *Synthetic Metals*. v. 135-136, p. 79-80, 2003.

LAIDLER, K.J. *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. 1<sup>o</sup> edition, Oxford University Press, England, 1958.

MANSFELD, J.; SCHELLENBERGER, A.; ROMBACH, J. Application of polystyrene-bound invertase to continuous sucrose hydrolysis on pilot scale. *Biotechnology Bioengineering*. V. 40, p.997-1003, 1992.

MARQUEZ, L. D. S.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 51, p. 86-92, 2008.

MARTINS, M. Açúcar invertido: propriedades e aplicações. *Food Ingredients*. 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C.; Increase in conformational stability of enzymes on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment, **Enzyme Microbial Technology**. 26, p. 509- 515, 2000.

MESSING, R. A. *Carriers-in Immobilized enzymes for industrial reactors*. Editora Messing, R. A. New York, 1975.

MESSING, R. A. Carriers for immobilized biological active systems in advances in biochemical engineering. *Immobilized Enzymes I*. v. 10, 1978.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. v. 31, p. 426-428, 1959.

- NELSON, J. M. e GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. *Journal Amer, Chemical. Soc.* v 38, p1109-1115, 1916.
- OOSTEROM M. W.; BELLE H. J. A.; RANTWIJL F.; SHELDON R.A. Immobilised  $\beta$ -galactosidases and their use in galatoside synthesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.** v.134, p. 267-274, 1998.
- RIBEIRO, E. J. Estudo cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada.(Tese de doutorado em engenharia de alimentos) Campinas, SP, 1989, 203p.
- ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P. Desing and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry.* V. 95, p. 77-82, 2006.
- RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R.A.F.; SERRA, G.E.; ANDRIETA, S.R.; FRANCO, T.T. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* v. 20, p. 103-109, 2000.
- SANJAY, G. e SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chemistry.* p. 1-7, 2005.
- SZYMANSKA K.; BRYJAK J.; MROWIEC-BIALON J.; JARZEBSKI A. B. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalystis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 99, p. 167-175, 2007.
- TOMOTANI, E. e VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resins. *Process Biochemistry.* v.41, p.1325-1331, 2006.
- VUJCIC, Z.; MILORADOVIC, Z.; MILOVANOVIC, A.; BOZIC, N. **Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel.** *Food Chemistry.* v. 126, p. 236-240, 2011.
- WEETALL, H. H. Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry. *Process Biochemical.* p. 3-30, 1975.
- WISEMAN, A. & WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. *Process Biochemistry*, v. 10, p. 24-30, 1975.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa. Cap. 4, p. 35-85, 2004.