

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DESENVOLVIMENTO

DE PROCESSOS QUÍMICOS

***UTILIZAÇÃO DE REATOR DE MISTURA COM ENZIMA LIVRE
PARA OBTENÇÃO DE XAROPES DE AÇÚCAR INVERTIDO***

CLÁUDIA STECKELBERG

Química

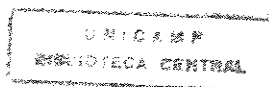
SÍLVIO ROBERTO ANDRIETTA

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na área de concentração Desenvolvimento De Processos Químicos.

Campinas, SP

1996



UNIDADE	80
N.º CHAMADA:	
T/Unicamp	
St 31u	
V.	
TOMBO	30002
PRCC	283/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06/05/97
N.º CPD	

CM-00097272-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

St31u

Steckelberg, Cláudia

Utilização de reator de mistura com enzima livre para
obtenção de xaropes de açúcar invertido / Cláudia
Steckelberg.--Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Sílvio Roberto Andrietta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Hidrólise. 2. Sacarose. 3. Xarope de milho. 4.
Enzimas. I. Andrietta, Sílvio Roberto. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.
III. Título.

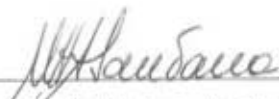
Dissertação defendida e aprovada, em 17 de Dezembro de 1996, pela Banca Examinadora
cosnstituída pelos professores:



Dr. Silvio Roberto Andrietta
(CPQBA-UNICAMP)



Prof. Dr. Francisco Maugerí Filho
(FEA/DEA-UNICAMP)



Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana
(FEQ/DPQ-UNICAMP)

*Dedico este trabalho aos meus pais Clodoaldo e Jandira,
que sempre me deram incentivos para chegar até aqui.*

*Ofereço com carinho ao **Marcelo**, meu marido*

Agradecimentos

Queria aproveitar esta simples e única página, dentre tantas outras, para com simples e poucas palavras agradecer ao Silvio pela orientação, confiança, estímulo e principalmente pela paciência e compreensão nos momentos de incertezas e até de descrença, tornando este período de convivência uma etapa de grande crescimento profissional e pessoal.

A minha família que me apoiou incondicionalmente em todos os momentos. Obrigado por existirem e por fazerem parte de minha vida.

Ao Marcelo pelo carinho, pela força e por acreditar que eu seria capaz de alcançar meu objetivo.

As minhas irmãs Ana Maria, Flávia e Alessandra, pelos incontáveis papos sobre coisas da vida e pela presença constante nestes anos de convivência.

De uma forma muito especial à Graça pela ajuda, boa vontade, críticas, correções e sugestões que contribuíram em muito na conclusão deste trabalho. Agradeço-a também pela amizade, pelo companheirismo e por muitas conversas que me fizeram crescer como pessoa.

Aos membros da Banca Examinadora, pela atenção, correção e contribuição na realização deste trabalho.

À Dra. Maria Isabel Rodrigues pela colaboração e esclarecimentos prestados.

Ao Gil Serra pela total consideração e especialmente pela amizade e auxílio durante a execução deste trabalho, sem o qual este não seria possível realizar-se.

Ao Daniel e Américo pelo apoio nas tomadas dos dados.

À Vera um carinho especial pela ajuda no trabalho e pela amizade.

À Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao CPQBA/UNICAMP pela realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do CPQBA e todos que estiveram junto a mim e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, com sugestões, críticas e especialmente amizade.

A Deus por me guiar em mais esta etapa de minha vida.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Definição de Adoçantes Líquidos	4
2.2. Histórico do Desenvolvimento da Indústria de Adoçantes	6
2.3. Tipos de Adoçantes Líquidos	8
2.3.1. Açúcar Líquido (Xaropes de Sacarose)	8
2.3.1.1. Definição	8
2.3.1.2. Especificações	8
2.3.1.3. Processo de Obtenção	8
2.3.1.4. Característica do Produto	10
2.3.2. Xarope de Glicose	10
2.3.2.1. Definição	10
2.3.2.2. Especificações	11
2.3.2.3. Processo de Obtenção	11
2.3.2.4. Característica do Produto	12
2.3.3. Xarope de Frutose	12
2.3.3.1. Xarope de Frutose Obtido a partir do Amido (HFCS)	13
2.3.3.1.1. Definição	13
2.3.3.1.2. Especificações	14
2.3.3.1.3. Processo de Obtenção	14
2.3.3.1.4. Característica do Produto	19
2.3.3.2. Açúcar Invertido	20
2.3.3.2.1. Definição	20
2.3.3.2.2. Especificações	20
2.3.3.2.3. Processo de Obtenção	21
2.3.3.2.4. Característica do Produto	27
2.4. Usos e Aplicações dos HFCS e Açúcares Invertido	27
2.5. Planejamento Fatorial e Otimização	29

3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Enzimas	31
3.1.1. Invertase (Beta D-Fructofuranosidase)	31
3.1.2. Inulinase (Frutanolhidrolase 1,2)	31
3.2. Substrato Utilizado	32
3.3. Análise de Açúcares Redutores	32
3.4. Sistema de Hidrólise da Sacarose	32
3.5. Caracterização das Enzimas	34
3.5.1. Temperaturas e pH Testados	34
3.5.2. Condução do Ensaio	34
3.5.3. Determinação da Temperatura e pH Ótimo das Enzimas	34
3.5.4. Determinação da Meia Vida das Enzimas	36
3.6. Otimização do Reator de Mistura com Enzima Livre	36
3.6.1. Determinação da Conversão de Sacarose	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Avaliação das Enzimas Comerciais	39
4.1.1. Invertase	39
4.1.2. Inulinase	41
4.2. Determinação do Ponto Central para Otimização do Reator Enzimático	43
4.2.1. Invertase	43
4.2.2. Inulinase	47
4.3. Otimização do Reator de Enzima Livre	51
4.3.1. Invertase	51
4.3.2. Inulinase	57
4.3.3. Considerações Gerais	63
5. CONCLUSÕES	69
6. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Açúcar líquido - Especificações	8
Tabela 2. Xarope de glicose - Especificações	11
Tabela 3. HFCS - Especificações	14
Tabela 4. Xaropes de açúcar invertido -Especificações	20
Tabela 5. Determinação da temperatura e pH ótimo da invertase	35
Tabela 6. Determinação da temperatura e pH ótimo da inulinase	35
Tabela 7. Ensaio de otimização para enzima invertase	37
Tabela 8. Ensaio de otimização para enzima inulinase	38
Tabela 9. Valores de atividade da invertase comercial para diferentes temperaturas e pH 4,5	39
Tabela 10. Resultados de atividade da invertase em função do pH em temperatura de 60°C	40
Tabela 11. Valores de atividade da inulinase comercial para diferentes temperaturas e pH 4,5	41
Tabela 12. Atividade da invertase em função da temperatura e pH	43
Tabela 13. Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)	44
Tabela 14. Valores de meia vida da invertase para diferentes temperatura e pH igual a 5,0	46
Tabela 15. Atividade da inulinase em função da temperatura e pH	47
Tabela 16. Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)	47
Tabela 17. Valores de meia vida da inulinase para diferentes temperaturas e pH igual a 4,5	50
Tabela 18. Modelo ajustados, coeficiente de correlação e conversão após 6 horas de reação para cada ensaio (invertase)	51
Tabela 19. Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)	53
Tabela 20. Modelo ajustados, coeficiente de correlação e conversão após 6 horas de reação para cada ensaio (inulinase)	57
Tabela 21. Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)	59
Tabela 22. Insumos utilizados para a produção de 1000 kg de xarope parcialmente invertido a partir de açúcar de cor ICUMSA 300	66
Tabela 23. Insumos utilizados para a produção de 1000 kg de xarope parcialmente invertido a partir de açúcar de cor ICUMSA 150	66
Tabela 24. Insumos consumidos para a produção de 1000 kg de xarope	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma de obtenção do HFCS	19
Figura 2.	Processo de obtenção de xarope de açúcar invertido	26
Figura 3.	Fluxogra esquemático do reator de inversão	33
Figura 4.	Atividade da invertase a pH de 4,5 em função da temperatura	39
Figura 5.	Atividade da invertase em função do pH com temperatura de 60°C	40
Figura 6.	Atividade da inulinase em função da temperatura com pH de 4,5	42
Figura 7.	Atividade em função da temperatura e do pH (invertase)	45
Figura 8.	Atividade em função da temperatura e do pH (inulinase)	49
Figura 9.	Conversão em função da temperatura e da massa de enzima para invertase	54
Figura 10.	Conversão em função da temperatura e da concentração de sacarose para invertase	55
Figura 11.	Conversão em função da massa da enzima e da concentração de sacarose para invertase	56
Figura 12.	Conversão em função da temperatura e da massa de enzima para inulinase	60
Figura 13.	Conversão em Função da Temperatura e da Concentração de sacarose para inulinase	61
Figura 14.	Conversão em função da massa da enzima e da concentração de sacarose para inulinase	62

RESUMO

No Brasil os adoçantes líquidos obtidos a partir da sacarose são uma alternativa viável, tendo em vista ser este país um grande produtor de cana-de-açúcar, matéria-prima a qual tem a sacarose como seu maior componente.

Como no Brasil, a maioria das indústrias consumidoras de açúcar não possuem estrutura de recebimento deste, à granel, torna-se propício a criação de uma estrutura para a recepção e estocagem de adoçantes líquidos, pois seu custo de instalação é significativamente menor em relação aos sistemas de armazenagem de açúcar cristal a granel.

A grande vantagem associada a utilização de adoçantes líquidos é que o produto chega à fábrica pronto para ser utilizado, não sendo necessário que a indústria possua uma unidade de dissolução de açúcar e tratamento de calda.

Os objetivos deste trabalho envolvem a otimização do processo de hidrólise da sacarose por via enzimática e avaliação preliminar da sua viabilidade técnica e econômica.

Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou-se duas enzimas produzidas comercialmente, a Invertina (invertase) e a Novozym 230 (inulinase).

Inicialmente foi feita a caracterização das enzimas invertase e inulinase no que se refere ao pH e temperatura para determinação do ponto de maior atividade de cada uma. Estes resultados foram obtidos por dois métodos de otimização (única variável e múltiplas variáveis), para se obter os pontos de máximo. Estudou-se também a meia vida para essas duas enzimas.

A partir das condições de máxima atividade (pH e temperatura) e meia vida de cada enzima, otimizou-se o reator de hidrólise da sacarose, levando-se em conta as limitações industriais incluindo a viabilidade econômica. Levou-se em consideração a temperatura de operação, a concentração inicial de sacarose e a massa de enzima utilizada. Para tanto, foi utilizado o planejamento experimental fatorial de dois níveis e o método de superfície de resposta para a análise dos dados.

Através dos resultados pode-se observar que o método de uma única variável levou ao ponto de máxima atividade falso (pH = 4,5 e temperatura 60°C, para invertase e pH = 4,5 e temperatura 70°C, para inulinase) quando comparado com os resultados de múltiplas variáveis (pH = 4,9 e temperatura 57°C, para invertase e pH = 4,6 e temperatura 65°C, para inulinase).

Nas condições de máxima atividade destas enzimas a meia vida foi de 1,79 horas para invertase e 1,11 horas para inulinase.

Pôde-se concluir pelos resultados obtidos, que o processo de produção de xarope invertido utilizando reator de mistura com enzima livre, apesar de apresentar vantagens na qualidade do produto final, mostrou-se ser inviável economicamente, pois aumenta o custo de insumos utilizados de U\$7,56 por tonelada de produto na inversão ácida para U\$32,79 quando a enzima mais barata (invertase) é utilizada.

O custo da enzima corresponde a 6,1 % do custo final do produto, enquanto que para a inversão ácida, este custo não ultrapassa 1%.

ABSTRACT

In Brazil, the liquid sugar obtained from sucrose is regarded as a viable alternative since this country is a great sugar cane producer and sucrose is the main component of this raw material.

Due to the fact that most of the sugar consumer industries in Brazil do not have a structure that holds this product in bulk, the creation of a reception and storage structure of liquid sugar becomes propitious because its installation is significantly cheaper than the storage systems for crystal sugar in bulk.

The major advantage of using liquid sugar is that the product is ready to be used when it gets to the industry, so it is unnecessary for the industry to have a sugar dissolution and syrup treatment unit.

The purposes of this study are to reach the optimization of the sucrose hydrolysis by enzyme and to make a preliminary evaluation of its technical and economical viability.

Two commercially manufactured enzymes - Invertina (invertase) and Novozym 230 (inulinase) - were used in this study.

First of all, the invertase and inulinase enzymes had their pH and temperature characterized in order to determine the high point in each one. These results were obtained through two optimization methods (single variable and multiple variables), which were used to arrive at the high points. The half life of these two enzymes has also been studied.

From the maximum activity conditions (pH and temperature) and the half life of each enzyme, the sucrose hydrolysis reactor was optimized, taking account of the industrial limitations, including the economical viability. The operation temperature, the initial sucrose concentration and the mass of enzyme used were all taken into account. In order to do so, we used the two-level factorial experimental design and the response surface method for the data analysis.

Through the results obtained we can observe that the single variable method led to a false maximum activity (pH = 4.5 and temperature of 60°C, for invertase and pH = 4.5 and temperature 70°C, for inulinase), when compared to the results of the multiple variables (pH = 4.9 and temperature 57°C, for invertase and pH = 4.6 and temperature 65°C, for inulinase. In the

maximum activity conditions of these enzymes, the half life was 1.79 hours for invertase and 1.11 hours for inulinase.

The results allow us to conclude that even though the process to produce invert syrups by using the well mix reactor with free enzymes has shown some advantages regarding the quality of the final product, it has also proved to be economically inviable because it increases the raw material costs from U\$7.56 per ton of product in the acid hydrolysis to U\$32.79 when the cheaper enzyme (invertase) is used. The enzyme cost is related to 6.1% of the final cost of the product, whereas for the acid hydrolysis, the cost is less than 1%.

1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 60, o consumo de adoçantes na forma líquida vem aumentando rapidamente. Entre esses adoçantes, os xaropes ricos em frutose, também chamados de HFCS (High Fructose Corn Syrup), são os mais utilizados. Quando iniciou-se sua produção, continha 42% de frutose e um poder adoçante um pouco inferior ao açúcar (sacarose de cana). Os HFCS produzidos atualmente podem ser encontrados em concentração de frutose de até 90% em função do desenvolvimento da separação cromatográfica. Apesar disto, os mais comercializados contém de 42 a 55% desse açúcar.

Os Estados Unidos da América é o país onde o consumo de HFCS é mais elevado, atingindo 6.000.000 ton/ano em 1990, o que pode ser atribuído a grande quantidade de milho disponível neste país. Em países europeus, tais como França e Alemanha, o consumo de adoçantes líquidos não ultrapassa 30% do mercado total. Nestes países, onde tradicionalmente é produzido o açúcar cristal a partir da beterraba, as indústrias consumidoras deste produto já são equipadas com sistemas de recepção, armazenamento e transporte deste açúcar à granel dificultando assim o crescimento do consumo dos adoçantes líquidos (ICC INTERNATIONAL COMMERCE CORP., 1993).

No Brasil, a maioria das indústrias consumidoras de açúcar não possuem estrutura de recebimento deste, à granel, sendo ele transportado em sacos de 50 ou 1000 Kg. Este tipo de embalagem, dificulta o manuseio pois requer mão-de-obra adicional aumentando o desperdício. Neste cenário, torna-se propício a criação de uma estrutura por parte das indústrias consumidoras, para a recepção e estocagem de adoçantes líquidos, pois seu custo de instalação é significativamente menor quando comparado com sistemas de armazenagem de açúcar cristal à granel.

A grande vantagem associada à utilização de adoçantes líquidos é que o produto chega à fábrica pronto para ser utilizado, não sendo necessário que a indústria possua uma unidade de dissolução de açúcar e tratamento da calda.

No Brasil os adoçantes líquidos obtidos a partir da sacarose são uma alternativa viável, tendo em vista ser este país um grande produtor de cana-de-açúcar, matéria-prima a qual tem a sacarose como seu maior componente.

É possível ainda obter-se xaropes ricos em frutose através da hidrólise da sacarose, pois esta é um dissacarídeo formada pela ligação glicosídica entre o carbono 1 da glicose e o carbono 2 da frutose.

Entre os produtos possíveis de serem obtidos a partir da sacarose de cana-de-açúcar, está o xarope parcialmente invertido (33,3% sacarose, 33,3% glicose e 33,3% frutose), e os xaropes totalmente invertidos com concentrações entre 50 e 60% de frutose.

Os adoçantes líquidos vem sendo produzidos no Brasil em pequena escala, possuindo características indesejáveis, tais como cor elevada e presença de substâncias formadas durante a reação de hidrólise, pois estas são realizadas em meio ácido e à altas temperaturas.

Os xaropes produzidos no Brasil restringem-se ao parcialmente invertido, o qual é encontrado no mercado com o preço 70% em média mais alto que o açúcar cristal, segundo levantamento realizado durante os anos de 1990 a 1992 (ICC INTERNATIONAL COMMERCE CORP., 1993). Este sobre preço é atribuído à falta de concorrência, pois a empresa líder do mercado domina mais de 90% do mesmo.

Os principais segmentos da indústria de alimentos potencialmente consumidoras de adoçantes líquidos são as que consomem o açúcar na forma cristalina aonde se incluem: refrescos carbonatados, sucos de fruta, doces, bolachas e conservas.

O Brasil é um dos maiores consumidores de refrigerantes do mundo, sendo um dos segmentos da indústria de alimentos que mais consomem açúcar para obtenção do produto. Em outros países, tais como Estados Unidos e Japão, as indústrias produtoras de refrigerantes utilizam o HFCS 55% em suas formulações. Em alguns países da Europa o xarope parcialmente invertido proveniente da sacarose de beterraba já está sendo utilizado na produção de refrigerantes.

Os fatos descritos anteriormente, mostram que o mercado de adoçantes líquidos possui um grande potencial e sua utilização traz vantagens tanto para a indústria consumidora, já que poderia desativar suas unidades de dissolução e purificação de calda, como para a indústria produtora, pois economizaria na embalagem do produto, na comercialização com desconto de IPI e na incorporação de água ao produto (75% sólidos solúveis), assim como ganho de massa de açúcar na reação de inversão (5%).

Para que o mercado consumidor possa se expandir atingindo setores que ainda não participam do mesmo, é necessário melhorar a qualidade do produto e otimizar o processo para diminuir o custo de produção viabilizando sua utilização industrial.

Uma das principais atitudes para melhorar a qualidade do produto final é eliminar a formação de subprodutos durante a reação de hidrólise. Para tanto é necessário que se altere o processo de reação utilizando reatores enzimáticos. Todavia, é necessário ainda que estes reatores sejam otimizados a fim de baixar o custo de produção, pois, no momento a hidrólise ácida é mais barata. Portanto, é objetivo deste trabalho, otimizar o processo de hidrólise da sacarose por via enzimática comparando o desempenho da invertase e inulinase em reatores de enzima livre e avaliar de forma preliminar a viabilidade técnica e econômica da implantação do mesmo em unidades industriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Definição de Adoçantes Líquidos

Por definição, adoçante líquido é uma solução de carboidratos em água. Estes adoçantes podem ser constituídos por sacarose, glicose, glicose e frutose ou sacarose, glicose e frutose (ALEWIJN & HONIG, 1967; BAIKOW, 1967; GADIE, 1971; BRUDER & MOROZ, 1981). Os adoçantes são classificados como xarope de glicose, açúcar líquido, xarope de açúcar invertido, HFCS (Higher-fructose corn syrup) e HFS (Higher-fructose syrup), dependendo de sua composição e da matéria-prima da qual foi obtido.

As vantagens dos adoçantes líquidos provêm de vários fatores entre os quais se encontram seu fácil manejo, transporte e armazenamento. As instalações de armazenamento e distribuição do açúcar líquido são mais simples e mais baratas que as do sistema à granel, tanto para o fabricante quanto para o consumidor (BRUDER & MOROZ, 1981).

Os fatores utilizados na classificação dos adoçantes líquidos são:

a. Sólidos solúveis

Este parâmetro define a concentração de matéria seca dissolvida no xarope. Em xaropes de alta pureza, este parâmetro representa uma boa aproximação da concentração de açúcares presente no mesmo. Sua determinação é feita pela medida do índice de refração a 20°C.

b. pH

Este parâmetro é medido diretamente pelo potenciômetro sem diluição do xarope.

c. Cor

O procedimento mais comum é cor ICUMSA, a transmitância de uma solução contendo aproximadamente 50% de sólidos solúveis é medida depois da filtração através de uma membrana de 0,45 micron. A cor é definida como:

$$ICUMSA = \frac{100}{bc} (-\log T_{420})$$

onde:

b = comprimento da célula em cm

c = concentração da substância seca em g/ml

T₄₂₀ = transmitância a 420 nm comparada com água

Unidades ICUMSA são aproximadamente equivalente a "Referência Base", unidade usada pela National Soft Drink Association. Entretanto o cálculo da unidade de referência base (RBU) envolve a correção por turbidez pelo uso da transmitância a 720 nm ao invés da filtrada.

$$RBU = \frac{100}{bc} [(-\log T_{420}) - 2(-\log T_{720})]$$

d. Cinzas

É toda a matéria solúvel inorgânica presente no xarope. São constituídas basicamente de cátions e ânions livres. Sua determinação pode ser efetuada utilizando-se um refinômetro, seguindo o método utilizado para açúcar cristal.

e. Componentes Carboidratos

As distribuições de sacarídeos destes adoçantes são determinada por cromatografia líquida.

f. Poder Adoçante

A "doçura" de um açúcar é determinada a partir de análise sensorial, dependente das condições nas quais este produto será utilizado. A concentração, acidez, viscosidade e temperatura são alguns dos fatores que interferem nesta determinação.

2.2. Histórico do Desenvolvimento da Indústria de Adoçantes

O desenvolvimento dos adoçantes líquidos pode ser traçado a partir de 1811, quando o químico russo Kirchoff relatou em sua descoberta que o amido aumentava seu poder adoçante quando tratado com ácido. Em 1815, Saussure verificou que a reação descrita por Kirchoff no amido era uma hidrólise cujo produto final era glicose. Entretanto, somente em 1927 é que iniciou-se a produção comercial destes adoçantes (VLITOS & IMRIA, 1975; COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

Nos últimos anos, a demanda de adoçantes líquidos tem aumentado rapidamente, assim como o seu raio de aplicações na indústria de alimentos, incluindo as bebidas, dando para estes adoçantes uma importante posição no mercado presente e futuro. Especial atenção deve ser dada ao crescimento da produção do xarope rico em frutose durante os anos 70. Em 1982 a produção industrial deste xarope já atingia um volume de 8,4 bilhões de libras/ano, que ultrapassava a US\$ 1.000.000.000,00 correspondendo a 26% do mercado de açúcar dos Estados Unidos da América (COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

Segundo BRUDER & MOROZ (1981), existem dois tipos básicos de xaropes obtidos a partir da sacarose: os xaropes de sacarose, também conhecidos como açúcar líquido e uma mistura de sacarose e açúcar invertido denominados xarope de açúcar invertido. A técnica primitiva de fabricação implicava na dissolução do açúcar granulado para obtenção do açúcar líquido, e a inversão parcial desta sacarose realizada por via ácida para obtenção dos xaropes parcialmente invertidos. A filtração, evaporação e tratamento com carvão ativado em diferentes graus são as outras etapas do processo necessárias para se obter xaropes de alta qualidade. Estas técnicas são utilizadas ainda hoje por muitos refinadores. A Revere Sugar Corporation desenvolveu nos finais da década de 40 e início da 50, uma série de novas técnicas para a fabricação do açúcar líquido, incorporando no processo as colunas de resina de troca iônica na fase de descoloração do xarope. Desde então, as refinarias da Revere, em Brooklyn e Chicago, tem produzido xaropes de alta qualidade, parcialmente invertido e totalmente invertido, para atender os seguimentos mais restritos das indústrias (BRUDER & MOROZ, 1981).

Já os adoçantes líquidos obtidos a partir do milho, teve um grande avanço com a descoberta de sistemas de enzima pelo qual a glicose pode ser isomerizada diretamente a frutose juntamente com a tecnologia da separação cromatográfica ocorrida nos anos 60 e 70

(MARIGNETTI & MANTOVANI, 1979; SMITH, 1983; COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985). A vantagem na utilização das colunas de separação é que essas são capazes de aumentar o teor de frutose, açúcar este que apresenta maior poder adoçante quando comparado a sacarose e glicose. Outra vantagem associada ao alto poder adoçante da frutose é apresentar cristalização em maiores concentrações quando comparado a sacarose e glicose (MERMESLSTEIN, 1975; BARKER & THAWAIT, 1987).

Segundo MARIGNETTI & MANTOVANI (1979), embora o potencial da conversão da glicose de amido hidrolisado para frutose tenha sido reconhecido há muitos anos, e esforços tenham sido empregados para o desenvolvimento do processo, a produção em escala industrial destes edulcorante somente foi possível recentemente. Os HFCS (higher-fructose corn syrup), no início da década de 40, eram definidos como sendo xaropes de milho onde o teor de frutose é maior que 10% (WARDRIP, 1971). A composição típica do HFCS é 42% de frutose, 50% de glicose e 8% de outros sacarídeos (em base seca) podendo apresentar de 11 a 17% de sólidos em suspensão, possui doçura comparável a da sacarose, sendo mais doce que a glicose, e pouco menos que uma solução de açúcar invertido (WARDRIP, 1971 e MERMELSTEIN, 1975). Sua composição admite algumas variações como de 42-44% de frutose, de 50 a 52% de glicose e 6% de oligossacarídeos (CHING, 1983; HASHIMOTO *et al.*, 1983; BARKER & GANETSOS, 1985).

A necessidade de aumentar o teor de frutose levou a tecnologia de produção dos HFCS de segunda geração com teor de frutose entre 50-95% (ROBINSON, 1975; BARKER & CHING, 1980; CHING, 1983; HASHIMOTO *et al.*, 1983; TEAGUE & ARNOLD, 1983; SAKIYAMA *et al.*, 1985; MILCENT, 1989).

No início dos anos 70, foram oferecidos incentivos econômicos para que os xaropes tipo HFCS se tornassem uma alternativa para o mercado de açúcares obtidos de cana-de-açúcar e beterraba, devido a grande flutuação ocorrida em seus preços nesta época. Somente quando a tonelada de açúcar atingiu preços elevadíssimos é que a produção do HFCS se viabilizou.

2.3. Tipos de Adoçantes Líquidos

2.3.1. Açúcar Líquido (Xaropes de sacarose)

2.3.1.1. Definição

Açúcar líquido é definido como sendo uma solução de sacarose em água obtido a partir de açúcar refinado granulado, dissolvido em água pura a 67,5 Brix (BAIKOW, 1967 e GADIE, 1971).

2.3.1.2. Especificações

A Tabela 1 mostra as especificações requeridas para a sacarose líquida.

Tabela 1: Açúcar líquido - Especificações

Especificações	Unidade	Açúcar Líquido
Sólidos	%	67 a 68
pH	-	6-7
Cor	ICUMSA	50
Cinzas	ppm	< 150
Poder Adoçante	-	67,5
HMF	ppm	25
Total de Açúcar	%	99,9
Sacarose	%	97,0
Açúcar Redutor	%	3,0

Fonte: BUSSIERE *et al.*, 1993

2.3.1.3. Processo de Obtenção

De uma forma geral, o açúcar líquido é obtido pela dissolução do açúcar granulado em água (JUNK & PANCOAST, 1973). Etapas subsequentes são feitas no sentido de melhorar as características do produto final.

O processo de obtenção deste xarope inclui:

1. Unidade de Clarificação

Esta unidade engloba a operação de dissolução do açúcar, flotação e filtração da calda. Esta etapa tem por finalidade eliminar materiais insolúveis e turbidez da calda de sacarose. Dependendo da qualidade da matéria-prima utilizada, a etapa de flotação pode ser eliminada, baixando o consumo de insumos e vapor. A seguir é descrito o processo utilizando açúcar de cor ICUMSA 300.

A dissolução do açúcar deve ser realizada a 80 °C sob agitação. A calda de sacarose que deixa o dissolvedor deve estar com o brix entre 60 e 65, pH entre 7,0 e 7,3 e concentração de P_2O_5 acima de 140 ppm. O pH deve ser ajustado pela adição de sacarato de cálcio.

Na flotação são adicionados agentes flocculantes, que interagem com as impurezas, formando complexos. O ar injetado faz com que os complexos formados se dirijam à superfície, de onde são retirados por um dispositivo raspador. A calda é então enviada para um filtro tipo SUCHAR. Essa calda filtrada, que deve estar isenta de turbidez, é enviada para a unidade de purificação (ANDRIETTA, 1992).

2. Unidade de Purificação

Esta unidade é responsável pela eliminação da cor e dos íons presente na calda, dando-lhe característica de um fluido límpido e transparente com valores de cinzas próximo de zero. Utiliza-se um conjunto de coluna de resina aniônica em série, sendo que a primeira é geralmente uma base forte de estrutura acrílica para uma limpeza mais grosseira e a segunda uma base fraca de estrutura estirênica para polimento (KONEN & WILSON, 1992).

3. Unidade de Polimento

Esta unidade é constituída de um filtro de carvão para remover sabor e odor e dar brilho ao produto, um pré-filtro de segurança e um sistema de micro filtração com membranas de porosidade de 0,35 μm o qual é utilizado para a esterilização do produto (BUSSIERE *et al.*, 1993).

4. Unidade Evaporadora

Nesta unidade, o xarope proveniente da unidade de polimento é concentrado até atingir a quantidade de massa seca desejada (67,5%) para o produto final.

É constituída de um evaporador à vácuo o qual permite a concentração do xarope em temperaturas inferiores a 60 °C, mantendo assim a integridade dos componentes do produto (ANDRIETTA, 1992).

2.3.1.4 Características do Produto

As vantagens em se produzir açúcar líquido está no fato de que sua obtenção é bastante simples e não requer grande investimento. No entanto, devido ao valor do ponto de saturação da sacarose em água na temperatura de 30°C ser de 68,18 g/100g, este produto tem de ser comercializado com uma concentração máxima de 67,5 %.

A baixa concentração de sacarose encontrada neste produto faz com que surjam algumas desvantagens, tais como: maior suscetibilidade a contaminação microbiana o que acarreta em menor tempo de estocagem, menor poder edulcorante quando comparado com o açúcar cristal o que acarreta uma elevação do custo de transporte, pois, transporta-se menos poder edulcorante por kg de produto (BRUDER & MOROZ, 1981).

2.3.2. Xarope de Glicose

2.3.2.1. Definição

Xarope de glicose é um líquido viscoso obtido pela hidrólise do amido (VLITOS & IMRIE, 1975).

A fonte originária de glicose nos U.S.A é o milho. O amido deste cereal é hidrolisado, dando origem a um xarope cujo uso data de 1812. Nesta época definiu-se como xarope de milho toda solução pura e concentrada de sacarídeos nutritivos obtidos de amido de milho e tendo equivalente em dextrose de 20 ou mais (o termo dextrose equivalente descreve a extensão no qual o amido foi hidrolisado). Em 1938, já eram comercializados xaropes produzidos por hidrólise ácida, com equivalente em dextrose de 56-58, porém apresentavam sabor amargo. Pouco antes da Segunda Guerra Mundial, o uso de processo enzimático aumentou o equivalente

em dextrose para 61-65, com maior poder edulcorante e menos sabor amargo. No início da década de 50, já se utilizava glucoamilase para produzir HDCS (high-dextrose corn syrup) com equivalente em dextrose de 95-97. Estes xaropes tem doçura apreciável e pelo elevado teor de carboidratos fermentecíveis era usado na produção de vinho e pão (MERMELSTEIN, 1975).

2.3.2.2. Especificações

Na Tabela 2 pode se observar as especificações do xarope de glicose.

Tabela 2: Xarope de glicose - Especificações

Especificações	Unidade	Xarope de Glicose
Sólidos	%	70 (min.)
Invert.	%	20 DE (min.)
Cinza	%	1,0
Cor	ICUMSA	n.c.

Fonte: MARIGNETTI & MANTOVANI, 1979

2.3.2.3. Processo de Obtenção

O xarope de glicose é fabricado principalmente do amido de milho, mas algumas indústrias européias utilizam fontes alternativas tais como batata, mandioca, etc.

O xarope de glicose é produzido comercialmente por dois processo:

- a) pela hidrólise ácida à dextrose equivalente desejada, ou
- b) pela hidrólise ácida seguida pela hidrólise enzimática.

A conversão ácida é realizada a baixa pressão e o grau de conversão é controlado pelas variações na temperatura, tempo e pH.

No processo ácido/enzima, o amido é parcialmente convertido pelo ácido dando baixa dextrose equivalente, onde então é tratada com a enzima apropriada para completar a conversão. A enzima normalmente empregada é a α -amilase. Após a conversão, o xarope é filtrado, descolorizado, concentrado e em alguns casos purificados através das resinas de troca iônica. Essas etapas são similares as utilizadas para a produção de açúcar líquido.

Através destes sistemas uma enorme variedade de xaropes pode ser produzido com diferentes viscosidade, doçura, higroscopicidade.

2.3.2.4. Características do Produto

Por ser composto basicamente de glicose pode ser amplamente utilizado para fermentações de diversos produtos tais como antibióticos, enzimas, etc. Por ser a glicose um açúcar o qual juntamente com um aminoácido promove o escurecimento de alguns alimentos pela reação de Maillard, este xarope pode ser utilizado nas indústrias onde este escurecimento é desejado como por exemplo na panificação (MARIGNETTI & MANTOVANI, 1975).

O grande inconveniente deste produto é o baixo ponto de saturação o que implica em um xarope com baixa concentração de sólidos e portanto com um “shelf-life” menor, uma vez que é mais suscetível a contaminação. Para ser armazenados nas concentrações requeridas na sua especificação, este deve permanecer a uma temperatura de 60 °C (MERMELSTEIN, 1975).

2.3.3. Xarope de Frutose

É considerado xarope de frutose, todo o adoçante líquido que contenha em sua composição a frutose em concentrações significativas. Estes xaropes podem ser produzidos a partir de sacarose, amido ou inulina. Atualmente os que possuem interesse industrial são aqueles obtidos a partir da sacarose de beterraba ou de cana-de-açúcar, chamados de xaropes de açúcar invertido e os obtidos do amido de milho denominados de HFCS.

A produção de xarope de frutose foi possível pelo significativo desenvolvimento na indústria de isomerização e nas tecnologias de separação cromatográfica nos anos 60. Uma outra contribuição foi o incentivo econômico oriundo da grande flutuação nos preços do açúcar de cana e beterraba ocorrida nos anos 70 e a necessidade de desenvolver uma alternativa de adoçante, que pudesse concorrer em nível de igualdade com os xaropes de açúcar invertido, usando como matéria-prima o amido de milho, o qual está disponível em abundância (WHITE, 1982; BLANCHARD & GEIGER, 1984; COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

Genericamente os xaropes ricos em frutose obtidos a partir da hidrólise do amido (milho, arroz, batata, tapioca etc.) são chamados de high fructose syrup (HFS)

O primeiro material bruto usado em escala mundial para a produção de xarope de frutose a partir do amido foi o milho. O xarope de frutose derivado desta fonte é chamado de high fructose corn syrup (HFCS) (WHITE, 1982).

O primeiro HFS produzido pela Clinton Corn Processing Company em 1967 continha 15% de frutose. Este produto foi isomerizado em batelada com enzima solúvel. Nos anos seguintes, os reatores de glicose-isomerase imobilizadas foram utilizados e a concentração de frutose alcançou 42%. O HFCS-42 então tornou-se o primeiro xarope de frutose de significado comercial. O aumento do poder adoçante dos xaropes obtidos a partir do milho foi possível utilizando-se separação cromatográfica para enriquecer estes xaropes em frutose, obtendo-se os HFCS de segunda geração com concentrações de até 95% de frutose (WHITE, 1982).

2.3.3.1. Xaropes de Frutose Obtidos a partir do Amido (HFCS)

2.3.3.1.1. Definição

Estes xaropes, também denominados de HFCS são definidos como sendo xaropes obtidos a partir do amido de milho através da isomerização da glicose para a frutose até uma concentração de 42%. Todavia, xaropes de maior concentração de frutose, denominados de HFCS de segunda geração mantiveram a mesma nomenclatura, formando portanto uma família de xaropes diferenciando somente pela concentração de frutose.

O desenvolvimento de técnicas de separação por colunas cromatográficas permitiu que estes xaropes pudessem ser oferecido em diferentes concentrações de frutose, sendo os comercialmente padronizados contendo concentrações de 42%, 55% e 90% em frutose (WHITE, 1982; BLANCHARD & GEIGER, 1984; COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985; LONG, 1986).

2.3.3.1.2. Especificações

A Tabela 3 mostra as especificações do HFCS

Tabela 3: HFCS - Especificações

Especificações	Unidades	HFCS-42	HFCS-42 alta densidade	HFCS-55	HFCS-90
Sólidos	%	71,0	80,0	77,0	80,0
pH		3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0	3,0 - 4,0
Cor	ICUMSA	5	5	5	5
Cinzas	%	0,3	0,03	0,03	0,03
Poder adoçante (Sacarose=100)		90 - 100	90-100	100 - 110	120 - 160
Frutose	%	42	42	55	90
Dextrose	%	52	52	41	8
Outros açúcares	%	6	6	4	2

Fonte: BLANCHARD & GEIGER, 1984.

2.3.3.1.3. Processo de Obtenção

O primeiro processo de xarope de milho utilizou ácidos minerais para a hidrólise do amido. Xaropes com uma alta glicose equivalente (DE) eram difíceis de serem produzidos por este método sem que ocorresse a degradação de sacarídeos e introdução de cor e flavor ao produto (WHITE, 1982).

Uma patente publicada em 1940 por Dale e Langlois utilizando hidrólise ácida-enzimática permitiu obter uma maior conversão do amido quando comparado com as obtidas pela hidrólise ácida. Pela primeira vez, concentrações de glicose de 94% e com mais de 30% de massa seca foi atingido, resultando em xaropes doces. As reações que produziam cor, flavor e degradação dos produtos foram substancialmente reduzidas, resultando em xaropes de alta pureza (WHITE, 1982).

A Clinton Corn Processing Company adquiriu uma patente de Takasaki e colaboradores (TAKASAKI, 1971) oferecendo o primeiro xarope de frutose nos USA em 1967. O desenvolvimento de seu processo, incorporou a fabricação de enzima imobilizada e o seu uso em leito fixo. Desconsiderando o uso de enzima de isomerização para obtenção de frutose o processo era convencional, empregando métodos padrões de liquefação, sacarificação, tratamento com carvão ativado, desmineralização, etc. O produto obtido possuía 42% de frutose

(SCINNYDER & LOGAN, 1974).

As companhias fabricantes de enzima em função da evolução na produção dos xaropes isomerizados começaram a trabalhar na glicose isomerase no final dos anos 60 e a enzima comercial desenvolvida pela NOVO Industri foi lançada em 1973.

Embora a utilização de enzimas seja simples, cuidados na condução do processo devem ser tomados uma vez que essas precisam de condições ótimas de pH, temperatura, etc, para que sejam eficientes (BLANCHARD & GEIGER, 1984).

A palavra *enzima* foi criada em 1878 por Kuhne, de um termo grego que significa "no fermento". Anteriormente, as enzimas foram designadas como "fermentos" por causa de sua ação semelhante à fermentação das leveduras. Uma grande controvérsia sobre este assunto ocorreu entre Pasteur e o grande químico alemão Liebig. Este dizia que as fermentações eram causadas por substâncias químicas não-associadas com células vivas, mas Pauster sustentava que o processo fermentativo era inseparável da vida. A controvérsia Pauster-Liebig foi resolvida em 1897 por Büchner, o qual demonstrou que um extrato livre de células, preparado a partir de leveduras por filtração, continha enzimas ativas (DIXON, 1979; PELCZAR *et al.*, 1980).

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica, que participam em reações químicas que ocorrem nas células vivas. Atuam acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre da reação. Uma das diferenças básicas entre enzimas e catalisadores químicos sintéticos é a capacidade daquelas em catalisar reações sob condições suaves, em soluções aquosas, à temperatura e pressão normais, reduzindo a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como reduzindo as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão do processo (DIXON, 1979; RIBEIRO, 1983; SCRIBAN, 1984).

A produção de HFCS requer o uso de três enzimas: alfa-amilase, glucoamilase e glicose isomerase (BLANCHARD & GEIGER, 1984).

A primeira enzima usada na hidrólise do amido é alfa amilase. Esta enzima é usada para controlar a viscosidade e para prover um substrato adequado para subseqüentes reações (LANDI & MANTOVANI, 1975).

O segundo passo na hidrólise do amido para glicose é a sacarificação das dextrinas, produzidas pela ação da alfa amilase. A glicoamilase catalisa a hidrólise do amido ou das

dextrinas para D-glicose (MARIGNETTI & MANTOVANI, 1975).

A terceira enzima utilizada é a glicose isomerase, corretamente conhecida como D-xilose ketol isomerase a qual catalisa a isomerização de glicose para frutose. A importância industrial desta enzima começou com a descoberta de Marshall e Kooi (JOHNSON, 1969), que a glicose isomerase catalisaria a conversão da glicose para frutose. O processo foi patenteado por Marshall em 1960 (MOLINA, 1962).

As fases para obtenção de xaropes ricos em frutose incluem:

a) Liquefação e Sacarificação do Amido

Na fabricação de xarope de frutose é essencial obter um nível de glicose (>94% de glicose) durante a sacarificação. A liquefação pode ser feita com enzima, a qual permite um nível de glicose de 3-5% maior que a realizada com ácido. Uma outra vantagem associada ao uso de enzima é a introdução de menos impureza no produto obtido (WHITE, 1982; BLANCHARD & GEIGER, 1984).

b) Filtração

O amido contém cerca de 1% de proteína e material gorduroso como impureza insolúvel no final da sacarificação que deve ser removido antes dos próximos passos de purificação. Os sólidos solúveis neste ponto consistem basicamente de glicose. A viscosidade do xarope é baixa, mas a viscosidade das impurezas dificultam a filtração (WHITE, 1982; BLANCHARD & GEIGER, 1984; COKER E VENKATASUBRAMANIAN, 1985; LONG, 1986).

Nesta etapa, utiliza-se normalmente filtros rotativos à vácuo, no qual a superfície filtrante é formada por uma pré-capa de auxiliar de filtração continuamente removida (WHITE, 1982; BLANCHARD & GEIGER, 1984).

c) Evaporação

Após a filtração o xarope é evaporado a uma concentração intermediária e purificado em filtros de carvão ativado e colunas de troca iônica.

d) Tratamento com Filtros de Carvão Ativado e Colunas de Troca Iônica

O tratamento com filtro de carvão ativado e colunas de troca iônica remove contaminantes orgânicos e inorgânicos. Nesta etapa é feita a eliminação de precursores de cor e produtos da degradação do açúcar como o hidróxi-metil-furfural (HMF) (WHITE, 1982; BLANCHARD & GEIGER, 1984).

É importante que esta etapa seja realizada anteriormente à isomerização para remoção de cálcio e outras substâncias inibidoras da enzima responsável por esta etapa.

e) Isomerização

A rota bioquímica de transformação da glicose para frutose é bem caracterizada, utilizando uma série de reações catalisada enzimaticamente e intermediários fosforizados. Entretanto, aplicação desta rota complexa para um processo industrial requer a utilização de grande quantidades de diversas enzimas. Esses requerimentos foram impedimentos significativos para o desenvolvimento de processos utilizando esta técnica (WHITE, 1982).

Em 1952 foi descrita uma enzima que catalisava a isomerização de aldosecetose diretamente sem necessitar de fosfato intermediário. Outras isomerases hexose foram subsequentemente identificadas e caracterizadas. Ao contrário do razoável custo da α -amilase e a glucoamilase usadas pelas refinarias para fazer xaropes de milho, as isomerases solúveis, inicialmente foram proibitivamente caras. TAKASAKI *et al.* (1969), finalmente combinou um método de imobilização da isomerase com um microrganismo e um sistema de fermentação eficiente para produção desta enzima. Estes avanços permitiram o aparecimento de HFCS como um produto comercialmente viável (MACALLISTER, 1980).

A isomerização da glicose para frutose é uma reação termodinamicamente controlada. A quantidade de frutose que pode ser produzida industrialmente é restrita por uma constante de equilíbrio. Começando com a concentração de glicose de 94% a quantidade de frutose teoricamente presente no equilíbrio pode ser de 47%. Entretanto, devido a quantidade de enzima e o tempo requerido para alcançar o equilíbrio em reatores comerciais, a concentração de frutose esta abaixo dos níveis teóricos (LLOYD & KHALEELUDDIN, 1976; COKER & VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

f) Enriquecimento da Frutose

O desenvolvimento de técnicas de enriquecimento de frutose se fizeram necessário devido a limitação inerente do equilíbrio da isomerização descrito anteriormente. Estas técnicas permitem a produção de xarope com mais de 95% de frutose, e as etapas de obtenção deste produto são:

Separação Cromatográfica

A técnica envolve o uso de colunas de adsorventes que tem afinidade para frutose. Uma porção do xarope isomerizado, contendo cerca de 42% de frutose, passa através de um adsorvente, seguido por uma porção de água. Como a glicose não é retida pelo adsorvente, ela elui primeiro da coluna, seguido pela frutose. Desta forma, obtém-se xaropes com até 95% de frutose (WHITE, 1982; COKER E VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

Mistura

Após a separação cromatográfica, o xarope contendo 90% de frutose é misturado ao de 42% para obter produtos com as razões desejadas de frutose/glicose (WHITE, 1982; COKER E VENKATASUBRAMANIAN, 1985).

g) Evaporação Final

O xarope depois de pronto é então concentrado até as proporções de sólidos solúveis desejados por meio de evaporadores a vácuo.

A Figura 1 ilustra um processo que envolve a produção de HFS (WHITE, 1982; BLANCHARD E GEIGER, 1984; COKER E VENKATASUBRAMANIAN, 1985; LONG, 1986).

2.3.3.1.4. Características do Produto

As características dos HFCS variam um pouco de acordo com o seu processo de obtenção. De uma maneira geral, o HFCS é um líquido límpido, livre de turvação tendo baixo teor de cinzas, se for tratado com resina trocadora de íons, não deixa resíduo ou precipitado quando adicionado em bebidas (WARDRIP, 1971 E MERMELSTEIN, 1975).

Os HFCS assim como todos os adoçantes líquidos não podem ser usados para adoçar alimentos que requeiram o uso de adoçantes seco e sólido. Por outro lado, pode ser usado praticamente em qualquer produto úmido tendo influência sobre a textura e outras propriedades físicas do produto, ou servindo simplesmente como substituinte da sacarose, aumentando a doçura do produto e reduzindo seu poder calórico (WARDRIP, 1971; MERMELSTEIN, 1975).

Apresenta-se em uma faixa de concentração que varia de 71% a 76% de sólidos solúveis, apresentando maior pressão osmótica quando comparado com o açúcar líquido (xarope de sacarose) o que prejudica o crescimento de microrganismos (WARDRIP, 1971; ROBINSON, 1975).

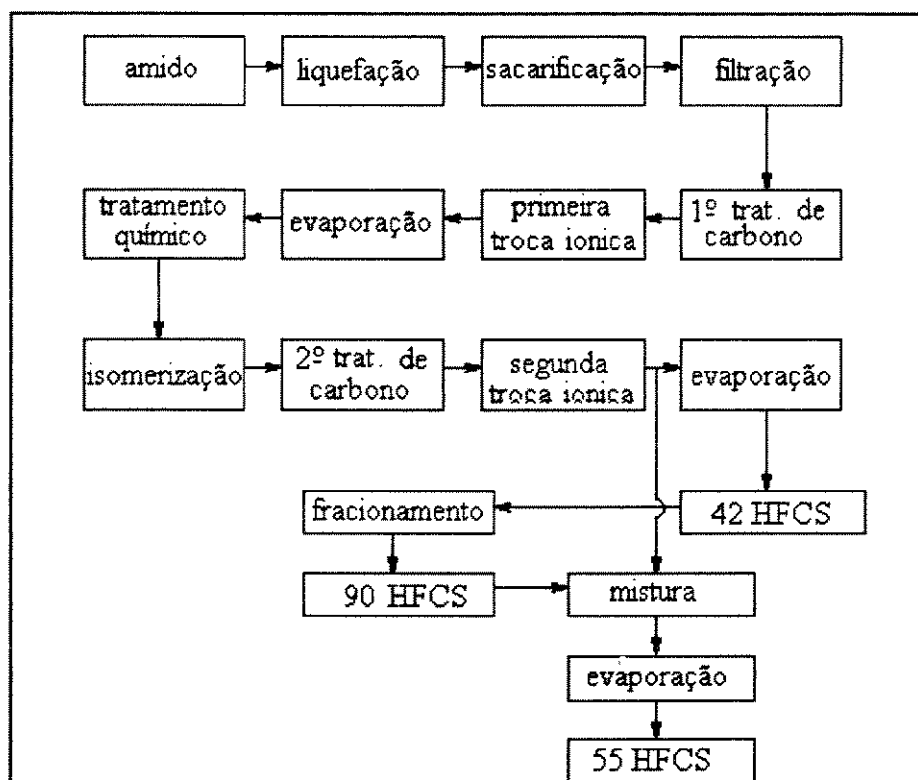


Figura 1. Fluxograma de obtenção do HFCS, trat. de carbono → carvão ativado

2.3.3.2. Açúcar Invertido

2.3.3.2.1. Definição

Xarope de açúcar invertido é obtido através da reação de hidrólise total ou parcial da sacarose proveniente da cana-de-açúcar ou da beterraba. Essa reação de hidrólise da molécula de sacarose recebe o nome de inversão, devido a mudança no sentido de rotação no plano da luz polarizada, ao atravessar uma solução do açúcar hidrolisado.

Estes produtos são formados por glicose, frutose e sacarose, em diferentes concentrações. Segundo JUNK & PANCOAST (1973), os xaropes de açúcar invertido mais comumente encontrados no mercado são os de 50% de inversão e o totalmente invertido.

2.3.3.2.2. Especificações

A Tabela 4 mostra as especificações de mercado para cada tipo de xarope de açúcar invertido.

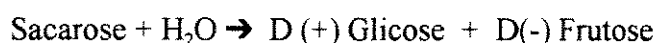
Tabela 4: Xaropes de açúcar invertido - Especificações

Especificações	Unidades	50% invertido	66% invertido	Totalmente invertido
Sólidos	%	75-77	73,0	73,0
pH		4,5	4,5	4,5
Cor	ICUMSA	< 50	< 50	< 50
Cinzas	ppm	<150	< 150	< 150
HMF	ppm	25	25	25
Frutose	%	25	33	47,5
Glicose	%	25	33	47,5
Sacarose	%	50	34	< 5

Fonte: BUSSIERE *et al.*, 1993

2.3.3.2.3. Processo de Obtenção

Em países onde a sacarose é abundante pode-se produzir o xarope rico em frutose a partir da mesma. A sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação glicosídica entre o carbono 1 da glicose e o carbono 2 da frutose, sendo portanto um açúcar não redutor, mas sua hidrólise leva a formação de uma mistura equimolar de açúcares redutores, glicose e frutose, como descrito na reação abaixo (RIBEIRO, 1983).



As fases envolvidas na produção de xaropes invertidos incluem etapas de: Clarificação; Purificação; Inversão; Polimento final e Evaporação. Apenas a fase de inversão será descrita uma vez que as outras etapas já foram descritas para produção de outros tipos de adoçantes líquidos.

Inversão

Segundo BUSSIERE *et al.* (1993), a hidrólise da sacarose como citada anteriormente pode ser realizada de duas formas:

- catálise ácida, quer pela adição direta de ácido ou com resinas de troca iônica na forma H^+ ; ou
- catálise enzimática, usando enzimas livres ou imobilizadas.

Catálise Ácida

A sacarose quando submetida à altas temperaturas e baixo pH, hidrolisa-se dando como produto glicose e frutose. Esta reação não é específica, podendo gerar outros produtos que afetam a qualidade final do xarope, tais como, hidróxi-metil-furfural (HMF) que é uma impureza que contribui para o desenvolvimento da cor na estocagem (BLANCHARD & GEIGER, 1984).

A catálise ácida pode ser realizada de duas formas:

A) Inversão homogênea

Esta hidrólise é realizada em reatores de aço carbono revestido com ebonita, com agitação mecânica e sistema de aquecimento.

Segundo PERCIVAL & SCHULER (1980), o xarope invertido produzido no Brasil atinge um grau de inversão de 99% com tempo de residência de 4 horas, em pH de 1,8 e temperaturas de 70°C.

Dados recentes retirados de unidade piloto descrevem que para caldas contendo 58% de massa seca pode-se atingir 93,26% de inversão após 4h30, em temperaturas de 85 °C e concentração de ácido clorídrico a 100% de 0,00875% (ANDRIETTA, 1992).

Após o término da inversão, o pH do xarope invertido deve ser ajustado para uma faixa de 4,5 a 5,0. Esta operação envolve a adição de hidróxido de sódio, aumentando o teor de cinzas no produto final.

Para controle dos níveis de cinza e remoção de cor pode ser usado uma resina de base fraca (Amberlita IRA-93 ou Duolita A-392S) para neutralizar o ácido usado na inversão. PERCIVAL & SCHULER (1980), realizaram experimentos em diferentes arranjos e obtiveram os seguintes resultados:

Condição A

Xarope no Brasil invertido com HCl, pH 1,8 e temperatura =70°C por 4 horas (99% de inversão)

1. Xarope invertido e neutralizado com NaOH

pH final	= 5,1
Brix	= 59,3
Cor	= 189 mau
Condutividade cinzas	= 2579 ppm
HMF	= 344 ppm

2. Xarope invertido neutralizado na coluna de troca iônica Duolite a 4 bv/hr e 40°C

pH final	= 8,1
Brix	= 59,7
Cor	= 30 mau
Condutividade cinzas	= 509 ppm
HMF	= 46 ppm

Condição B

Xarope invertido no Brasil com HCl a pH=1,8 e temperatura = 40°C por 10 horas (55% inversão)

1. Xarope invertido e neutralizado com NaOH

pH final	= 5,3
Brix	= 58,4
Cor	= 121 mau
Cinzas condutimétrica	= 2046 ppm
HMF=	= 19 ppm

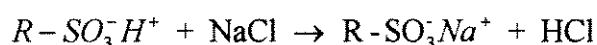
2. Xarope invertido e neutralizado com Duolite A-392S por 4bv\hr e 40 °C

pH final	= 8,9
Brix	= 58,4
Cor	= 9 mau
Cinzas condutimétrica	= 552 ppm
HMF	= 9 ppm

Esses dados demonstraram que quando a inversão é efetuada a baixa temperatura e com a neutralização através de resina de troca iônica, a qualidade do xarope produzido melhora sensivelmente como pode ser observado pela cinzas, cor e concentração de hidroximetilfurfural (HMF). Os valores altos de pH para o sistema de troca iônica são devidos as cinzas no xarope original, reagindo com um pequeno número de sítios de base forte presente na resina de base fraca durante o estágio inicial da operação do ciclo (PERCIVAL & SCHULER, 1980).

B) Inversão heterogênea por troca iônica

É comum o uso de resina de troca de cátions para inverter a sacarose. Se o xarope não for completamente livre de cinzas, os eletrólitos presentes no xarope gerarão ácidos solúveis pela reação da resina de troca de cátions (na forma ácida) com a cinza presente no xarope (PERCIVAL & SCHULER, 1980).



O ácido mineral livre liberado servirá como excelente catalisador para a inversão homogênea da sacarose. A quantidade ou concentração de ácido gerado dependerá do nível de cinzas no açúcar. A inversão da sacarose pode ser catalisada pela própria resina catiônica sem aumentar o teor de cinzas do xarope.

A coluna de troca de cátion é regenerada com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico depois de sua exaustão. Muitos sistemas de inversão utilizam uma resina de troca de ânion de base fraca (ex: Amberlite IRA-93 ou Duolita A-392S) operando em série com uma resina catiônica. Os grandes poros da resina de troca de ânions não somente neutralizam o ácido e abaixam o nível de cinzas, mas também removem uma quantidade significativa de ácidos orgânicos e corpos coloridos (PERCIVAL & SCHULER, 1980). Testes visando obter um xarope invertido com pH já corrigido, evitando assim a necessidade de se adicionar hidróxido de sódio, diminuindo portanto o teor de cinzas do produto final foram feitos usando um sistema de inversão com um conjunto de três colunas de resinas sendo que a primeira coluna continha a resina catiônica IR-120, a segunda a IR-118 e a terceira uma resina aniônica Duolita A-392S.

Os resultados para este sistema com diferentes taxas de aplicações e temperaturas podem ser observados a seguir:

A. Xarope de sacarose clarificado (58,0 Brix; pH=7,9; cor=144 mau; cinzas=719 ppm e HMF=15 ppm)

Fluxo (BV/h)	Temp. (°C)	Brix (%)	pH	Cor (mau)	Cinza (ppm)	HMF (ppm)	Inversão (%)
1,2	40	60,1	4,2	11	6	53	87
1,2	50	59,7	4,6	21	10	110	96
4,0	40	60,4	4,4	3	7	24	57

As condições de hidrólise são muito mais brandas (temperaturas entre 40 e 50 °C), e uma menor quantidade de produtos secundários e menor formação de cor são observados, como pode ser verificado acima.

Catálise Enzimática

Ao contrário dos catalisadores sintéticos comum, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo dessa forma os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluentes (SEGEL, 1975).

Segundo CONTIERO (1992), o uso das enzimas pode ser visto como benefício sob vários aspectos:

- as condições suaves quando se trabalha com enzimas, tais como temperatura, pH, etc.
- especificidade da enzima em relação ao substrato utilizado.
- o processo onde se usa enzima, requer um baixo custo do tratamento do efluente, pois enzima são proteínas e portanto biodegradáveis, e são usadas em doses muito baixas, geralmente na faixa de 0,1 a 1% do peso do substrato.

Na produção de xaropes invertidos a enzima normalmente utilizada para a inversão é a invertase. Uma outra enzima pode executar esta mesma tarefa, pois atua nas ligações glicosídicas entre o carbono 1 da glicose e o carbono 2 da frutose que formam a sacarose, esta enzima é a inulinase (CONTIERO, 1995).

A invertase ataca a sacarose liberando glicose e frutose. Esta é uma das enzimas conhecidas há mais tempo, sendo produzida, por várias plantas e microrganismos (REED, 1975; KAWASHIMA & UMEDA, 1976; REED & DUNN's, 1983).

Segundo DRAETTA (1971-71), essa enzima foi descoberta em 1833 por Persoz, em leveduras e isolada em 1860 por Berthelot, por precipitação com álcool e, é uma das enzimas que mais tem sido estudada.

A maioria da invertase produzida por levedura está localizada na parede celular, havendo também uma forma intracelular. A invertase extracelular é uma glicoproteína, contendo 50% de carboidrato, principalmente fosfomanana, apresentando um peso molecular de 135.000 (WISEMAN & WOODWARD, 1975).

A limitação no uso da invertase na produção de xarope de açúcar invertido está no preço da enzima e na falta de condição de instalar de imediato nas unidades industriais de reatores enzimáticos mais econômicos, tais como os de enzima imobilizada de leito fixo.

A inulinase comercial é normalmente uma mistura de endo e exo-inulinase (CARNITI *et al.*, 1991). O comportamento desta enzima aparentemente é similar ao da invertase, sendo que seus efeitos possam ser mais ou menos pronunciados em determinadas condições.

A Figura 2 mostra o fluxograma de obtenção de xarope de açúcar invertido.

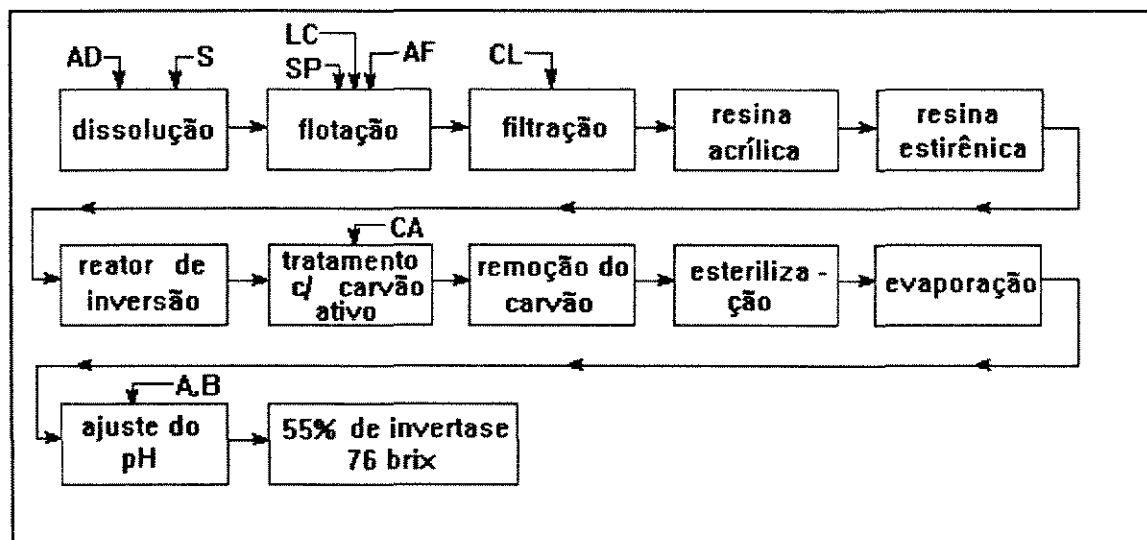


Figura 2. Processo de obtenção de xarope de açúcar invertido

onde: A - Ácido clorídrico

AD - Água deionizada à 90°C

AF - Ácido fosfórico diluído

B - Hidróxido de sódio

CA - Carvão ativado em pó

CL - Auxiliar de filtração (celite, terra diatomácia)

LC - Leite de cal diluído

S - Sacarose cristal de cor ICUMSA menor que 300 e temperatura de 20°C

SP - Solução de polímeros (talofloc e taloflot)

2.3.3.2.4. Característica do Produto

A solubilidade da glicose é menor que a da sacarose e frutose, por esta razão a solubilidade do açúcar invertido depende da solubilidade da D-glicose na solução de D-frutose. A solubilidade máxima a 30 °C é 69,7% de açúcar invertido na ausência de sacarose (a solubilidade da sacarose é de 68,11%) no qual a solução é saturada com D-glicose.

Apesar da solubilidade do açúcar invertido e da sacarose reduzirem quando encontrados em uma mesma solução, é possível se obter soluções mais concentradas nessas condições quando comparado ao açúcar líquido (sacarose líquida) ou xarope de açúcar invertido sem sacarose. Desta forma o xarope de açúcar invertido de máxima solubilidade a 30°C é aquele que apresenta um grau de inversão de 55%, contendo 33,57% de sacarose e 45,44% de açúcar invertido para um total de açúcar de 79,01%. Esta solução é saturada com sacarose e glicose.

Em função das informações citadas o produto de maior interesse para o mercado é aquele cujo nível de inversão atinja valores próximos a 55%, pois nesta faixa a solubilidade dos açúcares é máxima e portanto pode-se trabalhar com concentrações em torno de 76,5% de sólidos solúveis, diminuindo a suscetibilidade do produto a contaminação microbiana. Além disso, é possível estocar maior quantidade de produto em um tanque de mesmo volume quando comparado com o açúcar líquido (xarope de sacarose). Outra vantagem ainda, é a economia no transporte, onde pode-se transportar maiores quantidades de poder adoçante em um mesmo volume.

2.4. Usos e Aplicações dos HFCS e Açúcares Invertido

Os xaropes tipo HFCS e os de açúcares invertidos apresentam basicamente as mesmas propriedades, desta forma suas aplicações são bastante similares, podendo um substituir o outro na maioria dos segmentos onde este tipo de adoçante é utilizado. Desta forma a utilização do açúcar líquido é uma questão de desenvolvimento de mercado.

As propriedades como alto poder edulcorante, alta solubilidade da D-frutose e da baixa cristalização da sacarose em mistura, contribuem para aumentar o valor destes xaropes para sua utilização na obtenção de vários produtos alimentícios. Devido a alta pureza química

destes produtos (é isento de traços de ferro, cobre e cálcio) evita a precipitação e formação indesejável de cor nos produtos onde esses são adicionados (CHANDRASEKARAN & KING, 1971).

Esses xaropes são utilizados pelos fabricantes de compotas e geléias, condimentos e molhos líquidos ou pastosos (Ketchup, "dressing salad" etc.) pelas indústrias de conservas (picles), de doces (sorvetes, recheios, caldas de chocolate etc.) (WARDRIP, 1971; MERMELSTEIN, 1975; ROBINSON, 1975; MILCENT, 1989).

Esses xaropes são usados para restringir a tendência do confeito a secar e cristalizar na estocagem.

Podem ser usados em produtos de baixo pH (ácidos) evitando o que ocorreria com a sacarose: uma futura inversão, que alteraria o produto, durante o processamento ou em sua armazenagem (MERMELSTEIN, 1975).

Em produtos lácteos e sobremesas congeladas proporcionam textura lisa, aumento do "corpo". Permitem o processamento a uma temperatura mais baixa, sem que ocorra uma cristalização dos recheios fluidos (efeito crioscópico) (MERMELSTEIN, 1975).

Os monossacarídeos os quais compõem esses xaropes difundem-se melhor entre as células das frutas e dos vegetais do que as moléculas de polissacarídeos, melhorando a produção de conservas doces (WARDRIP, 1971; MERMELSTEIN, 1975; SURI *et al.*, 1984). Além disso os monossacarídeos tem menor poder "mascarador" do sabor das frutas, diminuindo o gasto com aditivos. Em geléias, doces e conservas produzem estabilidade quanto a cristalização ou alteração da composição, aumentando o "shelf life" destes produtos (ROBINSON, 1975).

Uma especial atenção deve ser dada ao grande consumidor dos xaropes que são as indústrias de refrigerante ("soft drinks") que os utiliza tanto em seus xaropes como no produto final. É interessante lembrar que o Brasil é o 3º consumidor mundial de refrigerante (WARDRIP, 1971; MERMELSTEIN, 1975; MILCENT, 1989).

Em 1983, a Pepsi Co Inc. substitui 50% da sacarose de sua produtos por HFCS (contendo 55% de frutose). Em Novembro de 1984, o HFCS passou a ser o único adoçante nos refrigerantes Coca-Cola e Pepsi-Cola nos EUA. Pode ser usado como adoçante único ou co-adoçante, bebidas de baixo teor de sólidos, de 50 a 100% (ROBINSON, 1975). A vantagem

do uso desses xaropes está na maior higroscopicidade, menor cristalização, auxilia na formação do "corpo" da bebida. Pela ausência de traços de adsorventes e agentes floclantes, ajuda a manutenção de gás carbônico nestes produtos (MILCENT, 1989).

Nos produtos de panificação fermentados, estes xaropes aumentam a velocidade do crescimento da massa, por serem os monossacarídeos facilmente assimiláveis pelo "fermento". Participam ainda da reação de Maillard para formação de cor típica destes produtos (MERMELSTEIN, 1975 e MILCENT, 1989).

Os xaropes são excelentes como humectante e por isso evitam o ressecamento precoce dos produtos farináceos, aumentando desta forma o "shelf life" deste tipo de produto (MILCENT, 1989). Apesar do vasto mercado consumidor deste tipo de xarope, os fabricantes de doces duros não fazem uso destes uma vez que são altamente higroscópio causando assim, o amolecimento do mesmo além de torná-los pegajosos. Uma outra restrição do uso é quando o escurecimento do produto não é desejado, uma vez que os açúcares redutores presentes nos xaropes reagem com as proteínas e causam esse escurecimento (reação de Maillard) (MERMELSTEIN, 1975).

2.5. Planejamento Fatorial e Otimização

O planejamento fatorial é uma ferramenta a qual visa facilitar o estudo de um sistema, minimizando a quantidade de experimentos necessários para obtenção de informações sobre o comportamento do mesmo. Segundo BOX & DRAPPER (1987), o planejamento experimental fatorial facilita a elaboração de modelos interagindo os dados, fazendo comparações, buscando similaridades, diferenças e tendências.

Para aplicar esta metodologia, foi necessário, primeiramente programar os experimentos. O tipo de planejamento experimental escolhido, foi o planejamento fatorial de dois níveis (BOX *et al.*, 1978). Este planejamento consiste na seleção de dois níveis para cada variável de entrada (variável independente), e na execução de experimentos para todas as possíveis combinações.

O planejamento fatorial de dois níveis é de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a

resposta (variável dependente), sem que se tenha uma descrição muito rigorosa dessa influência.

O planejamento fatorial foi ampliado com mais $2n$ ensaios, ou seja, seis experimentos, em “configuração estrela” para o ajuste dos modelos quadráticos. Este planejamento é idêntico ao já existente, porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida. Geometricamente, estes novos pontos estão a uma distância de 1,682 do ponto central (em variáveis codificadas). O cálculo foi feito usando a equação determinada por BOX & WILSON (1951):

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^k)^{1/4}$$

onde:

F: corresponde ao conjunto fatorial

K: número de variáveis independentes

Nos últimos anos, esta técnica vem sendo utilizada na otimização de diferentes processos biotecnológicos. Como exemplo, pode-se citar vários trabalhos encontrados na literatura. ROUSSEL *et al.* (1991) otimizaram a gelatinização sequencial e hidrólise enzimática do amido de milho para o máximo de glicose equivalente (DE), utilizando a metodologia de superfície de resposta. RODRIGUES *et al.* (1993) utilizaram análise de superfície de resposta para otimização de um processo contínuo de purificação de enzimas. SZOMSZED *et al.* (1992), otimizaram a produção via fermentativa de alcalóides ergot. SARRA *et al.* (1993) aplicaram o planejamento fatorial para otimização de meio de cultivo para a produção de antibiótico híbrido por *streptomyces lividans* TK21.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Enzimas

3.1.1. Invertase (Beta D-Fructofuranosidase)

A enzima utilizada foi a Invertina® produzida e comercializada pela Merck, cujas características foram fornecidas pelo fabricante e estão descritas a seguir.

- Temperatura ótima	60°C
- pH ótimo	4,5
- Temperatura de estabilidade: Início de inativação	65°C
Inativação total	80°C
pH de estabilidade	3,0 - 6,0
Atividade declarada:	*200.000 S.U.
Estável por 1 ano quando estocada a 10°C	

3.1.2. Inulinase (Frutanolhidrolase 1,2)

A enzima utilizada foi a Novozym 230® produzida e comercializada pela Novo Nordisk, cujas características foram fornecidas pelo fabricante e estão descritas a seguir.

- Temperatura ótima	60°C
- pH ótimo	4,5
- Temperatura de estabilidade: Início de inativação	65°C
Inativação total	não declarada
pH de estabilidade	não declarado
Atividade declarada:	*1800 INU/g
Não declarada estabilidade	

** Unidades não encontradas para nível de comparação.*

As enzimas foram preparadas em balão volumétrico em uma solução tampão de acetato de sódio 0,02 M, pH 4,5. As concentrações utilizadas foram 0,3 e 0,2 g/l para invertase e inulinase respectivamente.

3.2. Substrato Utilizado

O substrato utilizado foi a sacarose (comercial) preparada em balão volumétrico na mesma solução tampão em que as enzimas, em concentração igual a 50g/l para os testes iniciais (ponto de operação para temperatura e pH). Para os testes de otimização as concentrações de sacarose foram variadas em função do planejamento experimental. A solução foi filtrada em celite para retirada de impurezas da solução, uma vez que a utilizada foi a comercial.

3.3. Análise de Açúcares Redutores

Os Açúcares redutores foram medidos por método colorimétrico utilizando o ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Para checagem do método foram feitas análise em cromatografia líquida de alta pressão utilizando-se cromatógrafo Dionex modelo DX-300 operando nas seguintes condições:

Coluna: CarboPac PA1 (250x4mm) e pré-coluna (4x50mm)

Eluente: 150mM de NaOH

Fluxo: 1ml/min

Deteção: Amperometria Pulsada (eletrodo de ouro)

3.4. Sistema de Hidrólise da Sacarose

A hidrólise da sacarose foi realizada em reator de vidro encamisado de volume igual a 300 ml. A agitação foi feita com auxílio de um agitador magnético e a temperatura foi controlada através de banho termostatizado com bomba de recirculação de precisão 0,1 °C. O esquema deste sistema é mostrado na Figura 3.

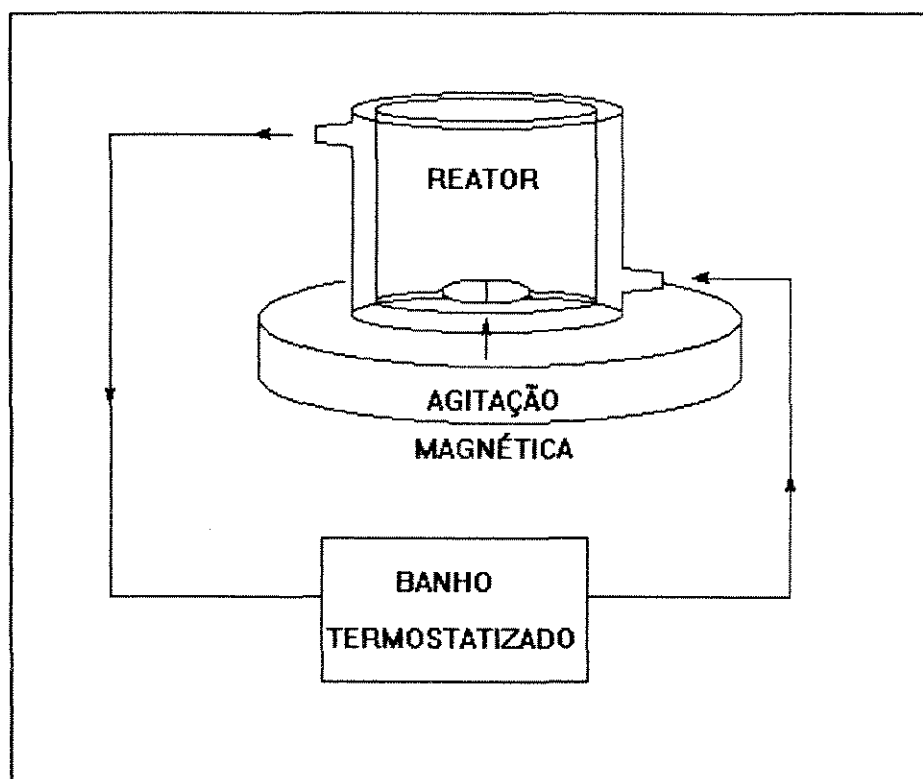


Figura 3. Fluxograma esquemático do reator demistura com enzima livre

3.5. Caracterização das Enzimas

3.5.1. Temperaturas e pH Testados

Primeiramente foi feito um “screening” para a temperatura no pH 4,5 para verificar as informações fornecidas pelos fabricantes das enzimas (invertase: temperatura 60 °C e inulinase: temperatura 60 °C). A faixa de temperatura testada foi de 25 a 70 °C sendo a variação de 5°C. Após ser determinada a temperatura de maior atividade para cada enzima, variou-se o pH entre 3,5 e 5,5. Esta faixa foi escolhida uma vez que os fabricantes forneceram para invertase pH 4,5 e para inulinase pH 4,5 como sendo os de maior atividade.

3.5.2. Condução dos Ensaios

No reator foram colocados 220 ml de solução de sacarose, e após atingir a temperatura desejada, acrescentou-se 20 ml da solução de enzima no pH a ser testado. Foram coletadas cinco amostras para cada ensaio. O intervalo de tempo para a retirada foi feito em função de cada ensaio. As amostras foram inativadas em água em ebulição.

A atividade da enzima é dada pela inclinação da reta de concentração de açúcares redutores em função do tempo e, é expressa em unidades internacionais, cuja definição é: uma unidade internacional (U) de enzima é aquela quantidade que catalisa a transformação de 1 µmol de substrato por minuto, sob condições definidas (AZHARI *et al.*, 1989; RIBEIRO, 1989)

3.5.3. Determinação da Temperatura e pH Ótimo das Enzimas

Para avaliar o ponto ótimo de pH e temperatura de cada enzima, utilizou-se o planejamento experimental fatorial de dois níveis, assumindo o ponto central àqueles determinados no item 3.5.1. As condições de cada ensaio para a invertase e inulinase estão relacionados nas Tabelas 5 e 6 respectivamente. Os ensaios foram conduzidos como descrito no item 3.5.2.

A finalidade deste ensaio foi traçar a curva de conversão de cada ponto com o objetivo de obter-se um valor mais preciso.

Tabela 5: Determinação da temperatura e pH ótimo da invertase

Ensaio	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	pH
1	-1	-1	50	3,5
2	+1	-1	70	3,5
3	-1	+1	50	5,5
4	+1	+1	70	5,5
5	0	0	60	4,5
6	0	0	60	4,5
7	-1,41	0	46	4,5
8	0	+1,41	60	5,9
9	+1,41	0	74	4,5
10	0	-1,41	60	3,1

Tabela 6: Determinação da temperatura e pH ótimo da inulinase

Ensaio	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	pH
1	-1	-1	60	3,5
2	+1	-1	80	3,5
3	-1	+1	60	5,5
4	+1	+1	80	5,5
5	0	0	70	4,5
6	0	0	70	4,5
7	-1,41	0	56	4,5
8	0	+1,41	70	5,9
9	+1,41	0	84	4,5
10	0	-1,41	70	3,1

3.5.4. Determinação da Meia Vida das Enzimas

A meia vida é definido como sendo o tempo necessário para que a atividade da enzima atinja a metade do valor inicial.

Este tempo foi determinado colocando-se a enzima nas condições de pH e temperatura previamente estabelecidas pelos resultados obtidos no item 3.5.3. Foram recolhidas amostras desta enzima em intervalos de tempo adequado a cada ensaio e desta foi determinada a atividade conforme descrito no item 3.5.2. As amostras foram coletadas até que o valor da atividade atingisse a metade do valor inicial.

3.6. Otimização do Reator de Mistura com Enzima Livre

Para determinar o ponto ótimo de operação do reator de mistura operando com enzima livre, foi utilizado o planejamento experimental fatorial com dois níveis e análise de resultado através de superfície de resposta. As variáveis estudadas foram: concentração de enzima, concentração inicial de sacarose e temperatura, totalizando 17 ensaios, sendo que 3 são repetições do ponto central. Os pontos centrais destas variáveis foram assumidos de acordo com as possibilidades de operação industrial e dos resultados obtidos nos itens anteriores. As Tabelas 7 e 8 mostram as condições nos quais cada ensaio foi conduzido.

A variável resposta utilizada para otimização deste reator foi a porcentagem de inversão, obtida da seguinte forma:

Utilizando o sistema de inversão descrito no item 3.4., determinou-se a curva de hidrólise da sacarose para todas as condições descritas nas Tabelas 7 e 8. Foram coletadas amostras de 1 ml do reator em intervalos de 30 minutos, transferido para tubo de ensaio os quais eram colocados em água fervente para inativação da enzima. Em seguida, o material contido no tubo de ensaio era transferido para balões volumétricos de volume adequado a fim de se fazer as diluições necessárias para as determinações da concentração dos açúcares redutores. O ensaio era interrompido após decorrida 6 horas. A porcentagem de inversão para cada ponto foi obtida dividindo-se a concentração de açúcares redutores no tempo t , pela concentração inicial do mesmo.

Tabela 7: Ensaios de otimização para enzima invertase

Ensaio	Temp.	Conc.	Conc. Sac.	Temp.	Conc. Enz.	Conc. Sac.
01	-1	-1	-1	50	0,490	35,0
02	-1	-1	+1	50	0,490	49,0
03	-1	+1	-1	50	1,480	35,0
04	-1	+1	+1	50	1,480	49,0
05	+1	-1	-1	60	0,490	35,0
06	+1	-1	+1	60	0,490	49,0
07	+1	+1	-1	60	1,480	35,0
08	+1	+1	+1	60	1,480	49,0
09	-1,68	0	0	47	0,990	41,0
10	+1,68	0	0	63	0,990	41,0
11	0	-1,68	0	55	0,150	41,0
12	0	+1,68	0	55	1,830	41,0
13	0	0	-1,68	55	0,990	30,9
14	0	0	+1,68	55	0,990	51,1
15	0	0	0	55	0,990	41,0
16	0	0	0	55	0,990	41,0
17	0	0	0	55	0,990	41,0

Tabela 8: Ensaio de otimização para enzima inulinase

Ensaio	Temp.	Conc.	Conc. Sac.	Temp.	Conc. Enz.	Conc. Sac.
01	-1	-1	-1	50	0,248	35,0
02	-1	-1	+1	50	0,248	49,0
03	-1	+1	-1	50	0,743	35,0
04	-1	+1	+1	50	0,743	49,0
05	+1	-1	-1	60	0,248	35,0
06	+1	-1	+1	60	0,248	49,0
07	+1	+1	-1	60	0,743	35,0
08	+1	+1	+1	60	0,743	49,0
09	-1,68	0	0	47	0,495	41,0
10	+1,68	0	0	63	0,495	41,0
11	0	-1,68	0	55	0,081	41,0
12	0	+1,68	0	55	0,910	41,0
13	0	0	-1,68	55	0,495	30,9
14	0	0	+1,68	55	0,495	51,1
15	0	0	0	55	0,495	41,0
16	0	0	0	55	0,495	41,0
17	0	0	0	55	0,495	41,0

3.6.1. Determinação da Conversão de Sacarose

Para maior confiabilidade dos resultados, o valor da porcentagem de conversão após 6 horas de reação, foram ajustados por modelos quadráticos utilizando o método de Quasi-Newton e Hooke Juves.

Com o modelo é possível obter valor de conversão após 6 horas de reação, levando-se em consideração todas as medidas efetuadas e não somente a de um ponto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das Enzimas Comerciais

Foi determinado o ponto de maior atividade de cada enzima. Estudando-se isoladamente os parâmetros temperatura e pH. Este ensaio teve como finalidade confirmar as informações fornecidas pelo fabricante.

4.1.1. Invertase

Os resultados de atividade obtido para esta enzima em pH 4,5 e temperatura variando de 25 a 70°C (variação de 5°C) estão mostrados na Tabela 9 e Figura 4.

Tabela 9: Valores de atividade da invertase comercial (Invertina) para diferentes temperaturas e pH 4,5.

Temperatura (°C)	Atividade (U/g)	Temperatura (°C)	Atividade (U/g)
25	2728,07	50	8014,62
30	3482,46	55	8880,12
35	4505,85	60	9698,83
40	6409,36	65	9438,59
45	7192,98	70	2415,20

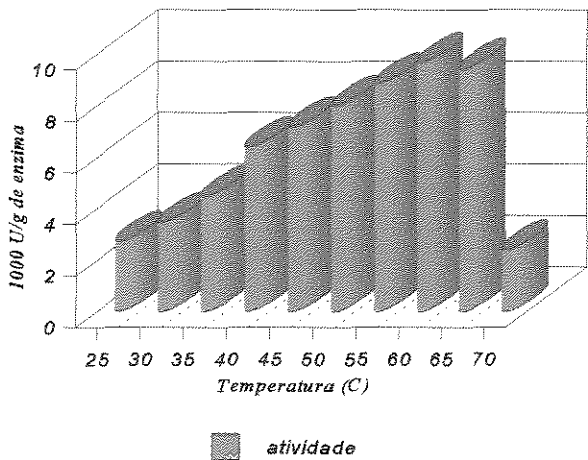


Figura 4. Atividade da invertase a pH 4,5 em função da temperatura

Com base nestes dados, observa-se que a temperatura de maior atividade da enzima em pH 4,5 é de 60°C.

Para estudar o comportamento da atividade desta enzima em função do pH, manteve-se a temperatura fixa em 60°C e variou-se o pH de 3,5 a 6,5 (variação de 1,0). Os resultados estão mostrados na Tabela 10 e na Figura 5.

Tabela 10: Resultados de atividade da invertase em função do pH em temperatura de 60°C

pH	Atividade (U/g)
3,5	3912,28
4,5	9017,54
5,5	7423,98
6,5	5096,49

Como esperado, os resultados mostram que o pH de maior atividade a 60°C é o de 4,5, coincidindo com os dados obtidos na determinação da temperatura ótima.

Em função dos resultados obtidos, optou-se por se trabalhar com método de múltiplas variáveis para obtenção do ponto de maior atividade da invertase. Escolheu-se como ponto central pH 4,5 e temperatura de 60 °C.

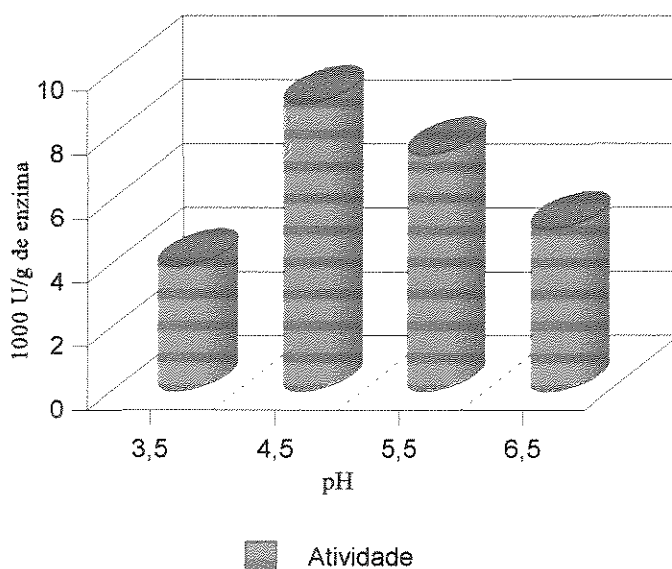


Figura 5. Atividade da invertase em função do pH com temperatura de 60°C.

Comparando-se o valor da atividade da invertase a 40°C obtido neste trabalho (6409,36 U/g) com o aquele obtido por RIBEIRO (1989) nesta mesma condição (505900 U/g), nota-se que o valor da atividade é 79 vezes menor. Isto provavelmente está associado a dois fatores: (a) forma de comercialização da enzima. Neste trabalho utilizou-se um concentrado de enzima na forma líquida, a qual via de regra é menos estável, enquanto Ribeiro utilizou-a na forma seca; (b) A enzima estudada por RIBEIRO (1989) é fabricada pela NOVO Ferment, enquanto neste trabalho a enzima estudada é procedente da MERCK.

4.1.2. Inulinase

Os resultados de atividade obtidos para esta enzima em pH 4,5 estão mostrados na Tabela 11 e Figura 6.

Tabela 11: Valores de atividade da inulinase comercial (Novozyn 230) para diferentes temperaturas em pH 4,5.

Temperatura (°C)	Atividade (U/g)	Temperatura (°C)	Atividade (U/g)
30	4766,08	65	18695,91
40	8350,88	70	19318,71
50	10008,71	75	13628,65
55	11888,89	80	514,62
60	18657,89	-	-

A temperatura de maior atividade da enzima é de 70°C para pH 4,5. Nota-se pela Figura 6 que na faixa de temperatura entre 60 e 70°C, os valores de atividade são próximos. As mesmas observações feitas para a invertase são válidas para a inulinase, uma vez que variando-se o pH com a temperatura de 70°C, encontrou-se o valor de 4,5 como sendo o de maior atividade. Desta forma, optou-se, assim como para enzima invertase, pela utilização do método de múltiplas variáveis para obtenção do ponto máximo de atividade desta enzima. Assumiu-se como ponto central temperatura de 70°C e pH 4,5.

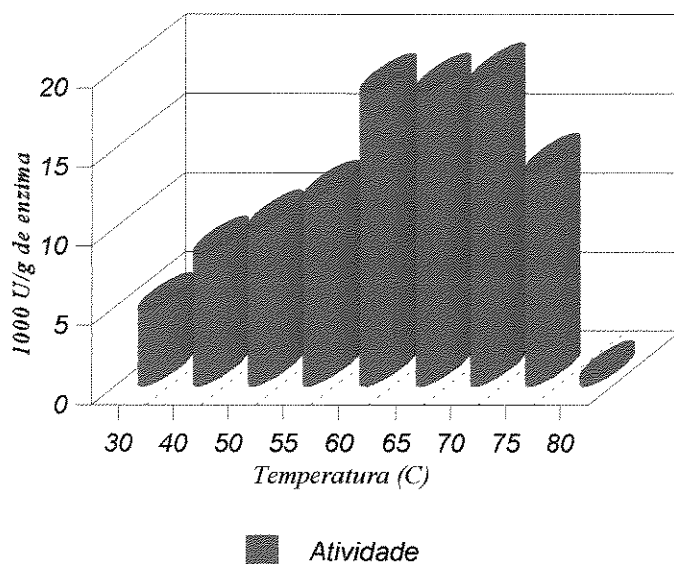


Figura 6. Atividade da inulinase em função da temperatura com pH 4,5.

AZHARI *et al.* (1989), trabalhando com Novozym 230 encontraram 8,1 U/mg de atividade para esta enzima a 37°C e pH 4,1. Quando comparado com o valor encontrado neste trabalho a 40°C e pH 5,0 (8350,88 U/g ou 8,35 U/mg), observa-se que os valores encontrados são similares.

4.2. Determinação do Ponto Central para Otimização do Reator de Mistura

4.2.1. Invertase

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para a determinação da temperatura e pH de maior atividade para a invertase, utilizando-se planejamento fatorial e análise por superfície de resposta.

Tabela 12: Atividade da invertase (U/g) em função da temperatura (°C) e pH

Ensaio	Temperatura	pH	Atividade
1	50	3,5	2982,46
2	70	3,5	1502,92
3	50	5,5	6637,43
4	70	5,5	5587,72
5	60	4,5	8388,89
6	60	4,5	8713,45
7	46	4,5	5634,50
8	60	5,9	6219,30
9	74	4,5	435,67
7	46	4,5	5634,50
10	60	3,1	0

A Tabela 13, mostra os resultados estatísticos obtidos para o planejamento fatorial.

Tabela 13: Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)

STAT. EXPERIM. DESIGN		ANOVA; Var.: ATIV; R-sqr = 0,93248; Adj: 0,87847				
Factor		SS	df	MS	F	p
(1) TEMP	(L)	1,21x10 ⁷ *	1*	1,21x10 ⁷ *	230,59*	0,041863*
TEMP	(Q)	2,77x10 ⁷ *	1*	2,77x10 ⁷ *	525,23*	0,027761*
(2) pH	(L)	3,41x10 ⁷ *	1*	3,41x10 ⁷ *	648,45*	0,024987*
pH	(Q)	2,68x10 ⁷ *	1*	2,68x10 ⁷ *	509,31*	0,028191*
Lack of Fit		6,08x10 ⁶ *	4	6,08x10 ⁷ *	28,85*	0,138635*
Pure Error		52670	1	52670		
Total SS		9,08x10 ⁷	9			

* Termos estatisticamente significativos
F_{0,99;1,5} = 16,26

O modelo obtido para estes dados, já desprezando os termos não significativos é:

$$ATIV = -132772 + 2866 * TEMP - 25 * (TEMP)^2 + 24159 * pH - 2454 * (pH)^2$$

(1)

onde:

ATIV: Atividade da invertase [U/g]

TEMP: Temperatura [°C]

pH: pH

A Figura 7 mostra o comportamento da atividade da invertase em função do pH e temperatura.

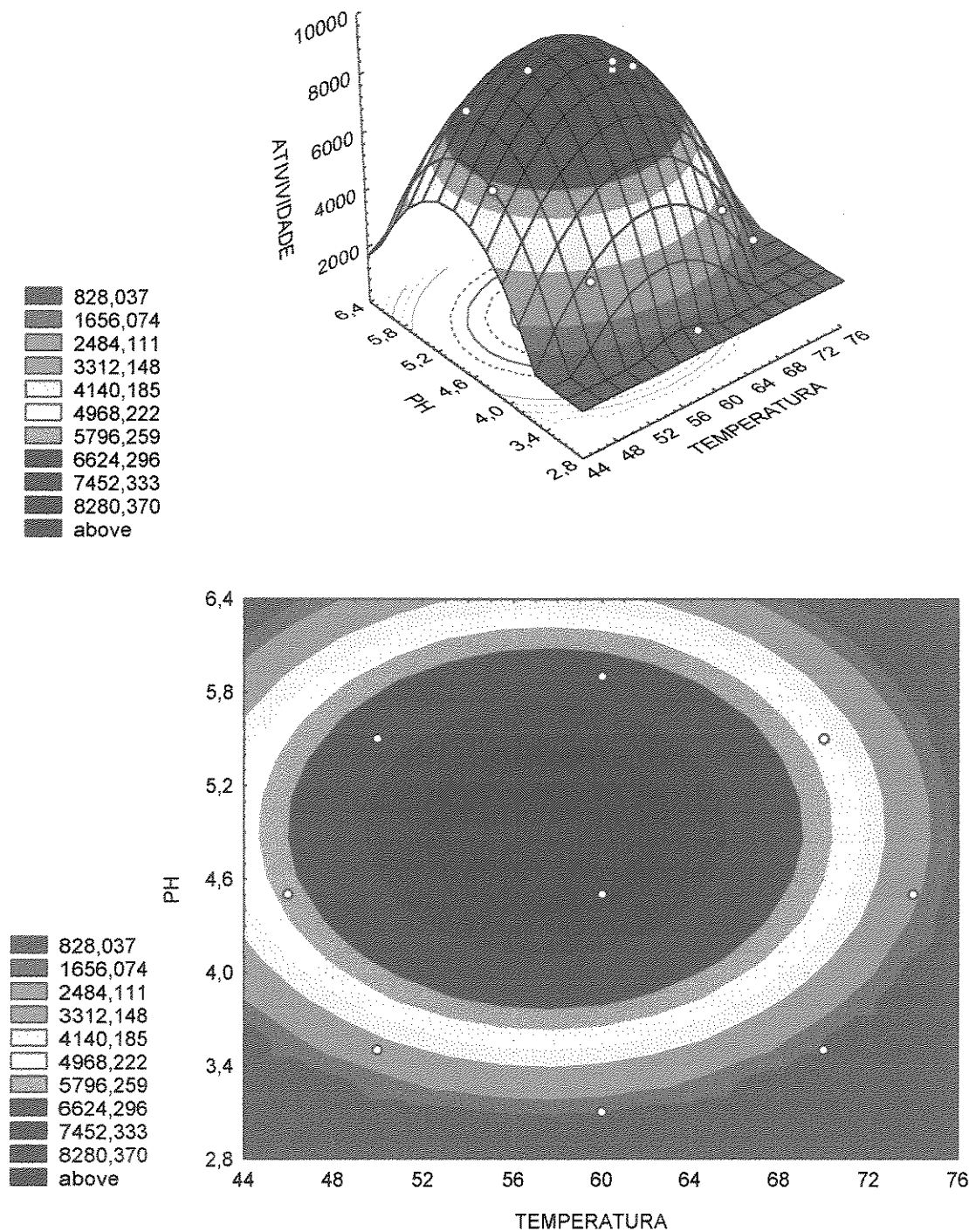


Figura 7: Atividade da invertase em função da temperatura e do pH

O ponto de máxima atividade foi determinado derivando-se a equação (1) em função da temperatura e do pH, igualando-se a equação a zero. Os valores de temperatura e pH onde a atividade é máxima são respectivamente 57,3°C e 4,9 como pode ser observado pela Figura 7, os quais diferem dos obtidos quando os parâmetros temperatura e pH foram isolados separadamente. Levando-se em consideração a meia vida desta enzima (Tabela 14), a qual é baixo em temperatura de 60 °C (0,94 horas), optou-se por trabalhar em uma faixa de temperatura menor assumindo-se como ponto central do experimento de otimização do reator a temperatura de 55°C e pH de 5,0 onde a meia vida desta enzima é maior que 6 horas. Os dados encontrados por BERTI *et al.*, (1995) para a meia vida da invertase de procedência da NOVO Nordisk do Brasil coincide com os encontrados neste trabalho. Esses autores relatam a sensibilidade desta enzima à altas temperaturas. MAUGERI *et al.*, (1991) também relatam a sensibilidade da invertase à altas temperaturas. O valores de meia vida encontrados por esses autores para invertase da NOVO Ferment em pH 4,7 são baixos quando em altas temperaturas. Para uma temperatura de 58 °C a meia vida encontrada foi de 3 horas.

Tabela 14: Valores de meia vida da invertase para diferentes temperaturas e pH igual a 5,0

Temperatura (°C)	pH	Meia vida (h)
50	5	estável até 6 horas
55	5	estável até 6 horas
57,5	5	1,79
60	5	0,94

4.2.2. Inulinase

As Tabelas 15 e 16 mostram respectivamente os resultados obtidos para a determinação da temperatura e pH de maior atividade para a inulinase e a estatística deste ensaio.

Tabela 15: Atividade da inulinase (U/g) em função da temperatura (°C) e pH

Ensaio	Temperatura	pH	Atividade
1	60	3,5	15067,25
2	80	3,5	4698,83
3	60	5,5	13283,63
4	80	5,5	198,83
5	70	4,5	19266,08
6	70	4,5	19201,75
7	56	4,5	14283,63
8	70	5,9	10266,08
9	84	4,5	649,12
10	70	3,1	0

Tabela 16: Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)

STAT. EXPERIM. DESIGN		ANOVA; Var.: ATIV; R-sqr = 0,87611; Adj: 0,7214 2 factors, 1 Block, 10 Runs; MS Pure Error = 2069,174				
Factor		SS	df	MS	F	p
(1) TEMP	(L)	2,29x10 ⁸ *	1*	2,29x10 ⁸ *	110434,3*	0,00192*
TEMP	(Q)	1,30x10 ⁸ *	1*	1,30x10 ⁸ *	62802,5*	0,00254*
(2) pH	(L)	8,26x10 ⁶ *	1*	8,26x10 ⁶ *	3992,6*	0,01007*
pH	(Q)	1,94x10 ⁸ *	1*	1,94x10 ⁸ *	93543,7*	0,00208*
1L by 2L		1,84x10 ⁶ *	1*	1,84x10 ⁶ *	891,5*	0,02132*
Lack of Fit		6,64x10 ⁷ *	3*	6,64x10 ⁷ *	10698,7*	0,00711*
Pure Error		2069	1	0		
Total SS		5,36x10 ⁸	9			

* Termos estatisticamente significativos

$$F_{0,99;1,5} = 16,26$$

Pelos dados da Tabela 16 nota-se que nenhum parâmetro do modelo foi desprezível. A equação que relaciona a atividade da inulinase com a temperatura e pH é descrita abaixo:

$$ATIV = -367275 + 7329 * TEMP - 54 * (TEMP)^2 + 65092 * pH - 6591 * (pH)^2 - 68 * TEMP * pH \quad (2)$$

onde:

ATIV: Atividade da inulinase [g sacarose/ g de enzima x mim]

TEMP: Temperatura [°C]

pH: pH

A Figura 8 mostra o comportamento da atividade da inulinase em função do pH e temperatura.

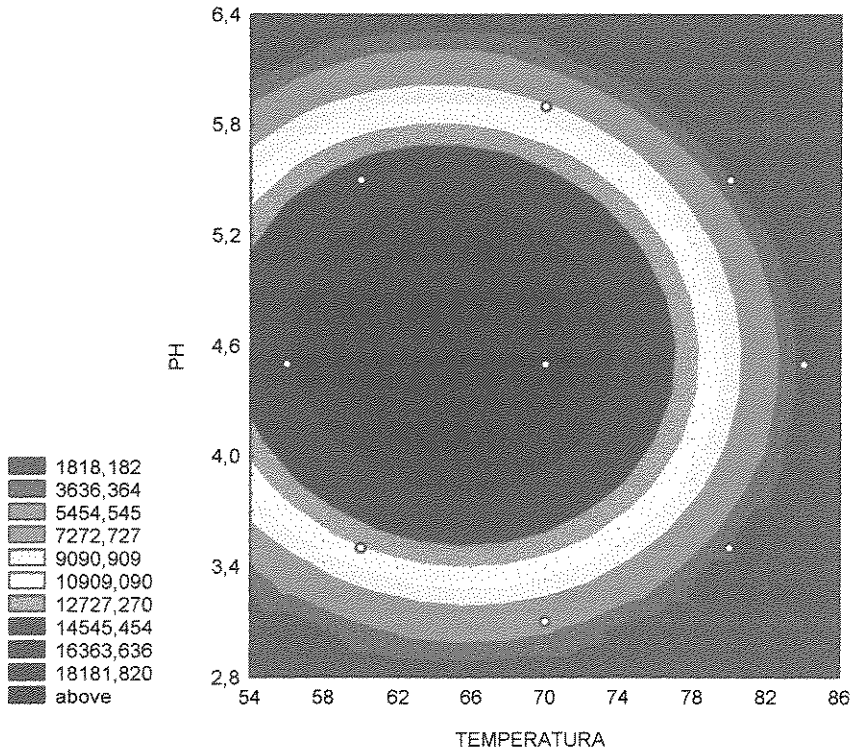
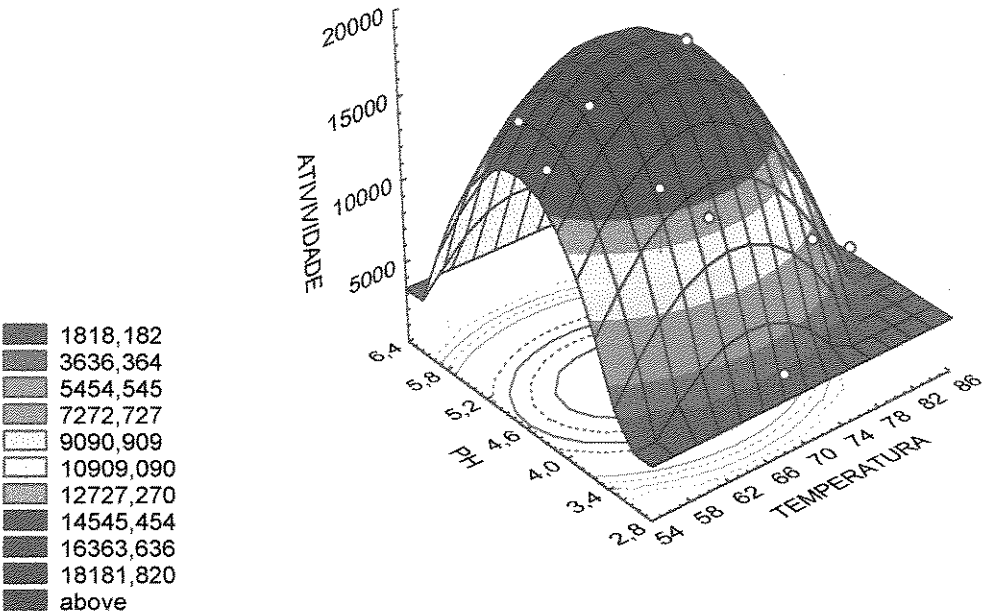


Figura 8: Atividade da inulinase em função da temperatura e pH

O ponto de máxima atividade foi determinado derivando-se a equação 2 da mesma forma que para invertase. Os valores de temperatura e pH onde a atividade é máxima são respectivamente 65,0 °C e 4,6 como pode ser observado pela Figura 8, os quais diferem dos obtidos quando os parâmetros temperatura e pH foram isolados separadamente

Como para a invertase o valor de meia vida obtido para inulinase é baixa quando em temperatura de 65 °C (Tabela 17). Em função disto, assumiu-se como ponto central para a otimização do reator utilizando inulinase a temperatura de 55°C e pH = 4,5.

Tabela 17: Valores de Meia Vida da Inulinase para Diferentes Temperaturas e pH igual a 4,5

Temperatura (°C)	pH	Meia Vida (h)
55	4,5	8,17
60	4,5	5,94
65	4,5	1,11
70	4,5	0,06

FURLAN *et al.* (1995), trabalhando com produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* constatou que o caldo fermentado quando em pH 4,0 tem a atividade máxima desta enzima em temperaturas variando de 32 a 37 °C. Enquanto a atividade máxima determinada neste trabalho com a inulinase obtida por *Aspergillus niger* foi em temperaturas de 60 a 70°C.

4.3. Otimização do Reator de Mistura com Enzima Livre

4.3.1. Invertase

A Tabela 18 mostra: os modelos, os coeficientes de correlação e os valores de conversão obtidos através destes modelos após 6 horas de reação da enzima invertase para diferentes temperaturas, concentração de enzima e concentração de sacarose.

Tabela 18: Modelos ajustados, coeficiente de correlação e conversão após 6 horas de reação para cada ensaio, onde se variou: temperatura, concentração de enzima e de sacarose

Ensaio	Temp. (°C)	Conc Enz. (g/l)	Conc Sac. (%p/p)	Modelo $a \cdot t^2 + b \cdot t + c$	R-sqr	Conversão (%)
1	50	0,49	35	a = -0,413 b = 12,196 c = 0,403	0,999	58,05
2	50	0,49	49	a = -0,122 b = 5,649 c = -0,226	0,999	29,27
3	50	1,48	35	a = -2,702 b = 31,332 c = 1,856	0,996	92,57
4	50	1,48	49	a = -0,713 b = 13,632 c = 0,113	0,998	56,01
5	60	0,49	35	a = -1,151 b = 19,346 c = 0,946	0,993	73,71
6	60	0,49	49	a = -0,221 b = 7,849 c = 0,251	0,997	39,38
7	60	1,48	49	a = -4,161 b = 38,788 c = 4,505	0,992	94,83
8	60	1,48	49	a = -1,627 b = 22,273 c = 0,652	0,999	75,7

Tabela 18: Continuação

Ensaio	Temp. (°C)	Conc Enz. (g/l)	Conc Sac. (%p/p)	Modelo $a \cdot t^2 + b \cdot t + c$	R-sqr	Conversão (%)
9	47	0,99	41,0	$a = -0,489$ $b = 14,192$ $c = -0,249$	0,998	67,32
10	63	0,99	41,0	$a = -1,449$ $b = 22,947$ $c = 2,918$	0,995	84,43
11	55	0,15	41,0	$a = 0,012$ $b = 5,902$ $c = 0,501$	0,998	36,34
12	55	1,83	41,0	$a = -1,930$ $b = 27,116$ $c = 3,305$	0,994	96,53
13	55	0,99	30,9	$a = -3,488$ $b = 37,921$ $c = 0,699$	0,999	100
14	55	0,99	51,1	$a = -1,040$ $b = 15,314$ $c = 2,219$	0,997	56,67
15	55	0,99	41,0	$a = -0,870$ $b = 17,571$ $c = 1,407$	0,996	73,71
16	55	0,99	41,0	$a = -1,093$ $b = 18,711$ $c = 0,794$	0,997	72,97
17	55	0,99	41,0	$a = -1,213$ $b = 19,335$ $c = 0,619$	0,997	75,51

A Tabela 19, mostra os resultados estatísticos obtidos após 6 horas de reação da enzima invertase para diferentes temperaturas, concentração de enzima e concentração de sacarose.

Tabela 19: Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)

STAT. EXPERIM. DESIGN		ANOVA; Var.: CONV; R-sqr = 0,95397; Adj: 0,93862 3 factors, 1 Block, 17 Runs; MS Pure Error = 1,706533				
Factor		SS	df	MS	F	p
(1) TEMP	(L)	430,970*	1*	430,970*	252,541*	0,00394*
(2) M ENZ	(L)	3475,757*	1*	3475,757*	2036,735*	0,00049*
	M ENZ (Q)	306,846*	1*	306,846*	179,807*	0,00552*
(3) C SAC	(L)	2727,655*	1*	2727,655*	1598,360*	0,00063*
Lack of Fit		332,047*	10*	33,205*	19,457*	0,04985*
Pure Error		3,413	2	1,707		
Total SS		7287,223	16			

* Termos estatisticamente significativos
 $F_{0,99 - 1,9} = 10,56$

A Tabela 19 mostra os parâmetros que devem ser considerados no modelo para a invertase. Sendo assim, o modelo pode ser representado da seguinte forma:

$$CONV=35,30+1,20*TEMP+86,89*ME-26,57*(ME)^2*-2,09*CS$$

(3)

onde:

- CONV:Conversão
- [%]
- TEMP:Temperatura
- [°C]
- ME:Massa de enzima
- [g/l de xarope]
- CS:Conc. inicial sacarose
- [g/100g]

As Figuras 9, 10 e 11 mostram o nível de conversão em função da temperatura e massa de enzima para diferentes valores de concentração de sacarose; temperatura e concentração de sacarose para diferentes massa de enzima; e massa de enzima e concentração de sacarose para diferentes temperaturas respectivamente. Os dados contidos nestas figuras mostram que o nível de conversão é crescente em função do aumento da temperatura, da massa de enzima e da diminuição da concentração de sacarose.

Pela análise estatística nota-se que os efeitos de interação entre as variáveis estudadas são independentes, ou seja, a variação de uma não interfere nas outras.

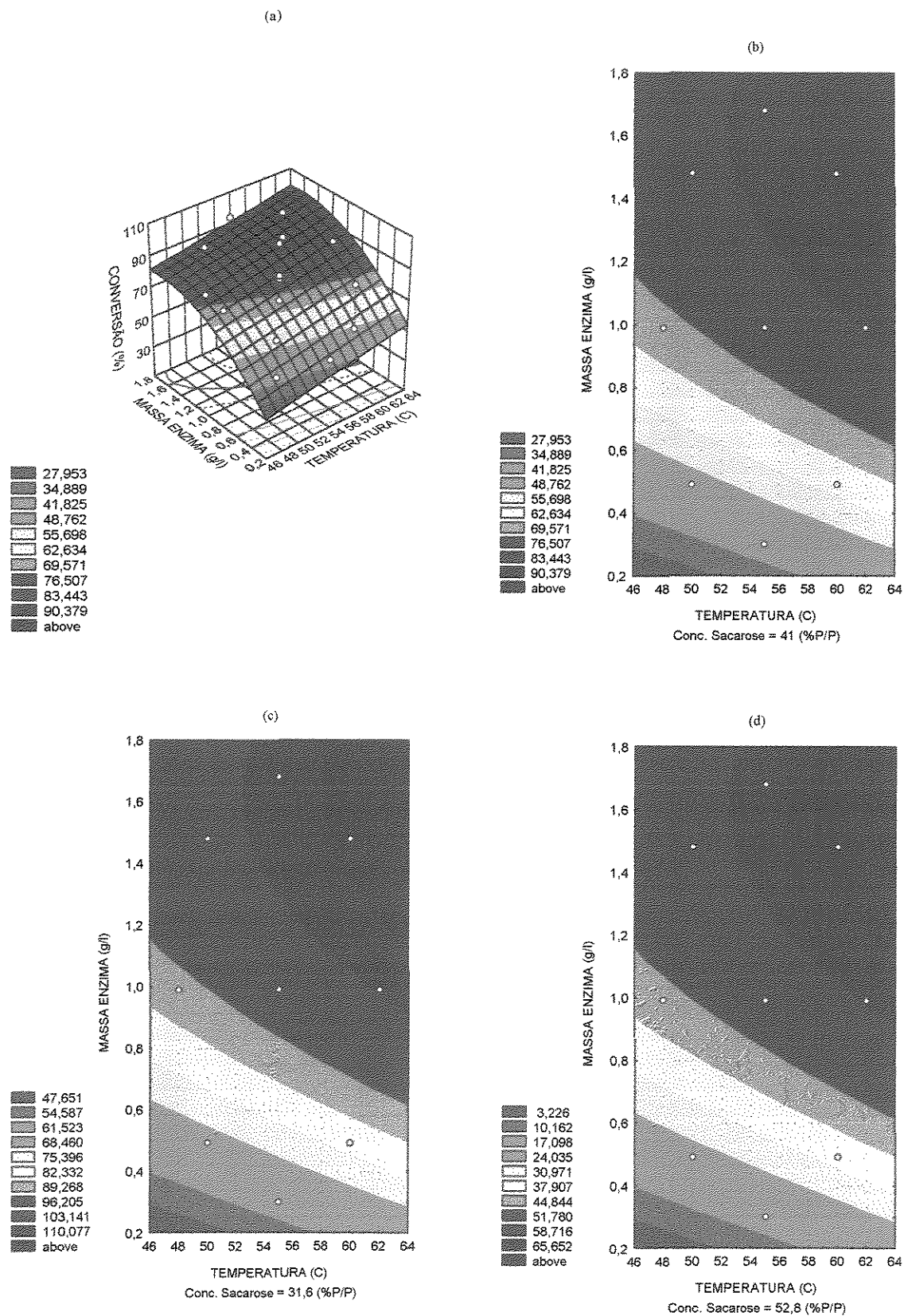


Figura 9: Conversão em função da temperatura e da massa de enzima para invertase

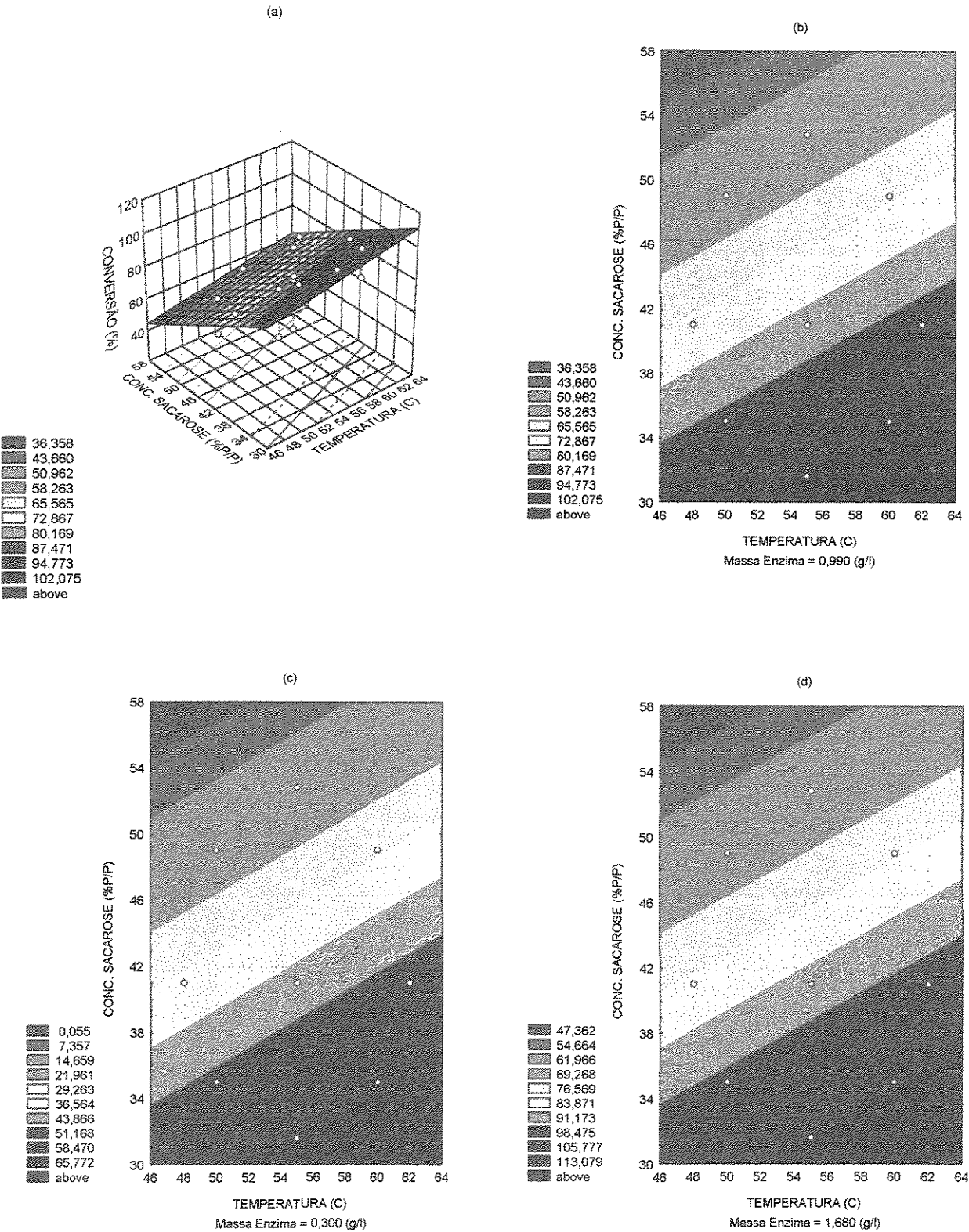
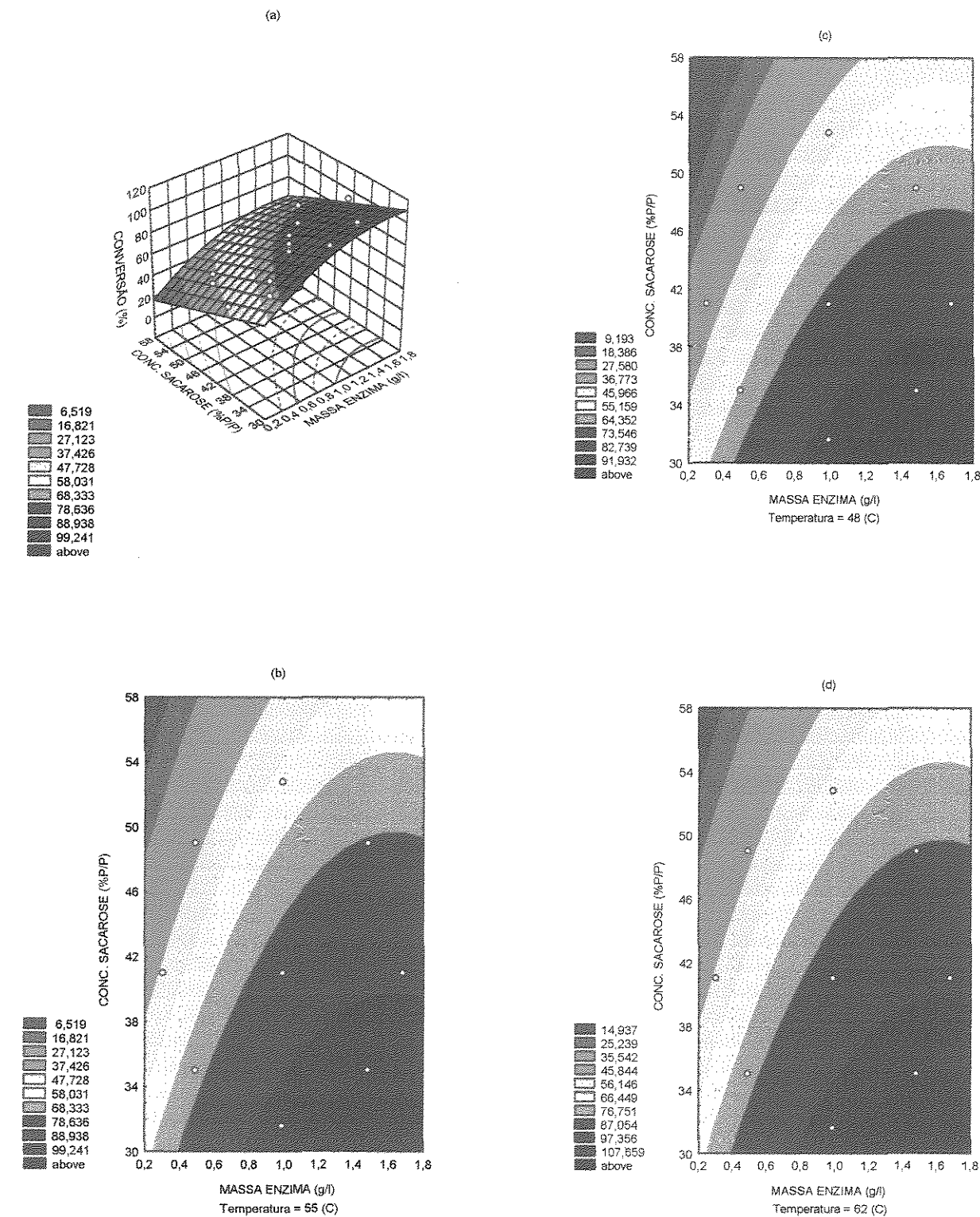


Figura 10: Conversão em função da temperatura e da concentração de sacarose para invertase



4.3.2. Inulinase

A Tabela 20 mostra: os modelos, os coeficientes de correlação e os valores de conversão obtidos através destes modelos após 6 horas de reação da enzima inulinase para diferentes temperaturas, concentração de enzima e concentração de sacarose.

Tabela 20: Modelos ajustados, coeficiente de correlação e conversão após 6 horas de reação para cada ensaio onde se variou a temperatura, concentração de enzima e sacarose.

Ensaio	Temp. (°C)	Conc Enz. (g/l)	Conc Sac. (%p/p)	Modelo $a \cdot t^2 + b \cdot t + c$	R-sqr	Conversão (%)
1	50	0,248	35,0	a = -0,537 b = 12,084 c = 2,543	0,996	55,71
2	50	0,248	49,0	a = -0,496 b = 8,590 c = 0,813	0,996	34,51
3	50	0,743	35,0	a = -2,449 b = 29,057 c = 4,814	0,997	90,97
4	50	0,743	49,0	a = -1,518 b = 19,216 c = 3,311	0,995	63,96
5	60	0,248	35,0	a = -0,983 b = 16,778 c = 4,667	0,995	69,95
6	60	0,248	49,0	a = -0,532 b = 11,360 c = 1,433	0,997	50,43
7	60	0,743	35,0	a = -4,151 b = 40,485 c = 6,040	0,995	99,49
8	60	0,743	49,0	a = -1,806 b = 23,348 c = 4,633	0,997	79,70
9	47	0,495	41,0	a = -1,012 b = 15,548 c = 2,820	0,995	59,66

Tabela 20: Continuação

Ensaio	Temp. (°C)	Conc Enz. (g/l)	Conc Sac. (%p/p)	Modelo $a \cdot t^2 + b \cdot t + c$	R-sqr	Conversão (%)
10	63	0,495	41	$a = -2,019$ $b = 24,446$ $c = 3,432$	0,997	77,43
11	55	0,081	41	$a = -0,497$ $b = 9,297$ $c = 0,581$	0,994	38,47
12	55	0,910	41	$a = -2,051$ $b = 26,091$ $c = 4,635$	0,997	87,34
13	55	0,495	30,9	$a = -2,570$ $b = 29,960$ $c = 4,402$	0,998	91,64
14	55	0,495	51,1	$a = -1,040$ $b = 15,314$ $c = 2,219$	0,997	56,67
15	55	0,495	41	$a = -1,237$ $b = 21,381$ $c = 3,220$	0,997	86,97
16	55	0,495	41	$a = -1,095$ $b = 19,812$ $c = 2,993$	0,998	82,38
17	55	0,495	41	$a = -1,234$ $b = 20,806$ $c = 3,864$	0,996	84,29

A Tabela 21, mostra os resultados estatísticos obtidos para enzima inulinase em diferentes temperaturas, concentração de enzima e concentração de sacarose.

Tabela 21: Análise da Variância (ANOVA - Analysis of Variance)

STAT. EXPERIM. DESIGN	ANOVA; Var.: INVER; R-sqr = 0,97024; Adj: 0,95671 3 factors, 1 Block, 17 Runs; MS Pure Error = 5,316433				
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) TEMP (L)	527,531*	1*	527,531*	99,227*	0,00993*
TEMP (Q)	180,667*	1*	180,667*	33,983*	0,02819*
(2) M ENZ (L)	3090,973*	1*	3090,973*	581,400*	0,00172*
M ENZ (Q)	452,176*	1*	452,176*	85,053*	0,01155*
(3) C SAC (L)	1582,319*	1*	1582,319*	297,628*	0,00334*
Lack of Fit	168,307*	9	18,701	3,518	0,24094
Pure Error	10,633	2	5,316		
Total SS	6012,541	16			

* Termos estatisticamente significativos

$$F_{0,99 - 1,9} = 10,56$$

A Tabela 21 mostra os parâmetros que devem ser considerados no modelo para a inulinase. Sendo assim, o modelo pode ser representado da seguinte forma:

$$CONV = -592,04 + 23,21 * TEMP - 0,20 * (TEMP)^2 + 192,33 * ME - 128,42 * (ME)^2 - 1,60 * CS \quad (4)$$

onde:

CONV: Conversão [%]

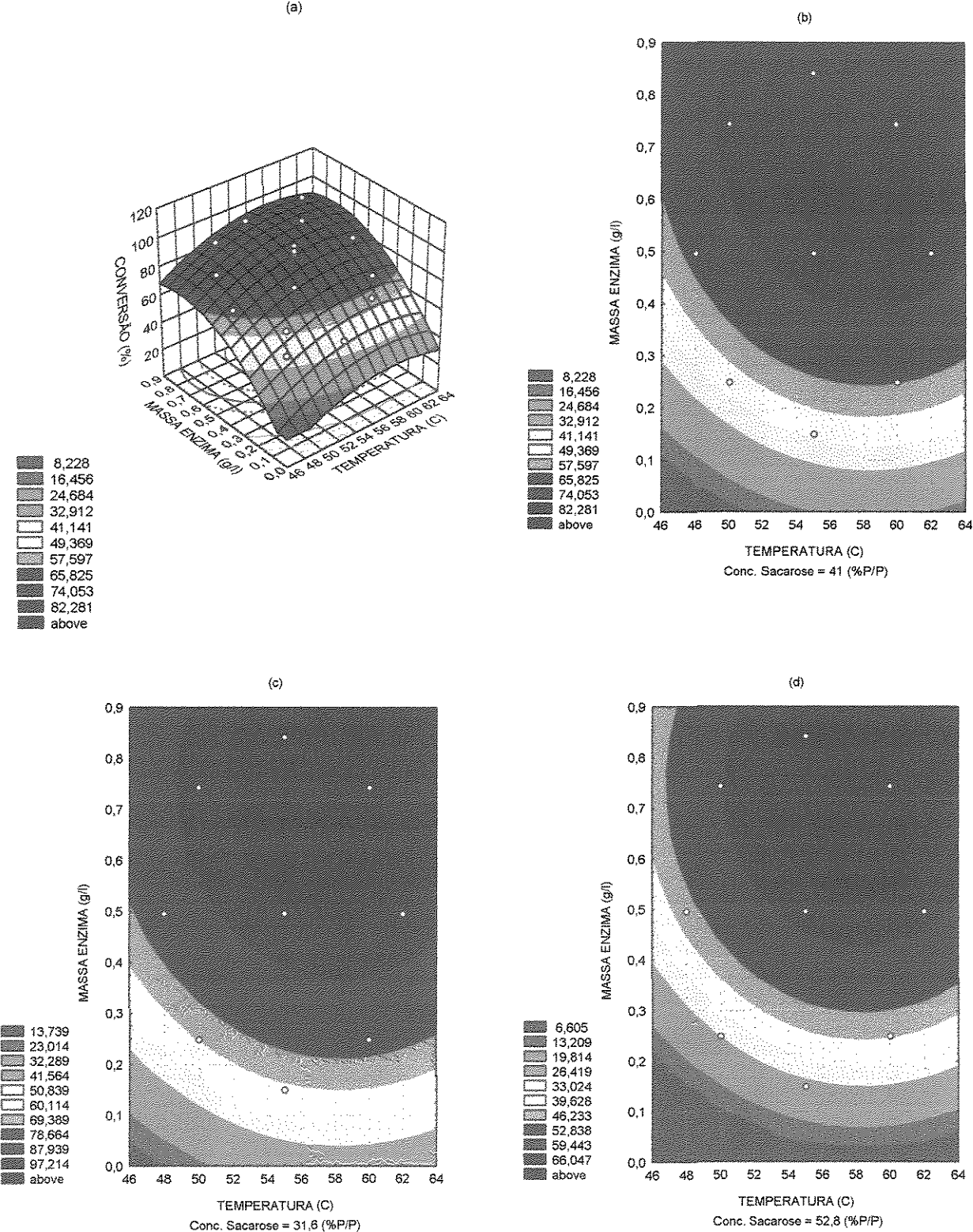
TEMP: Temperatura [°C]

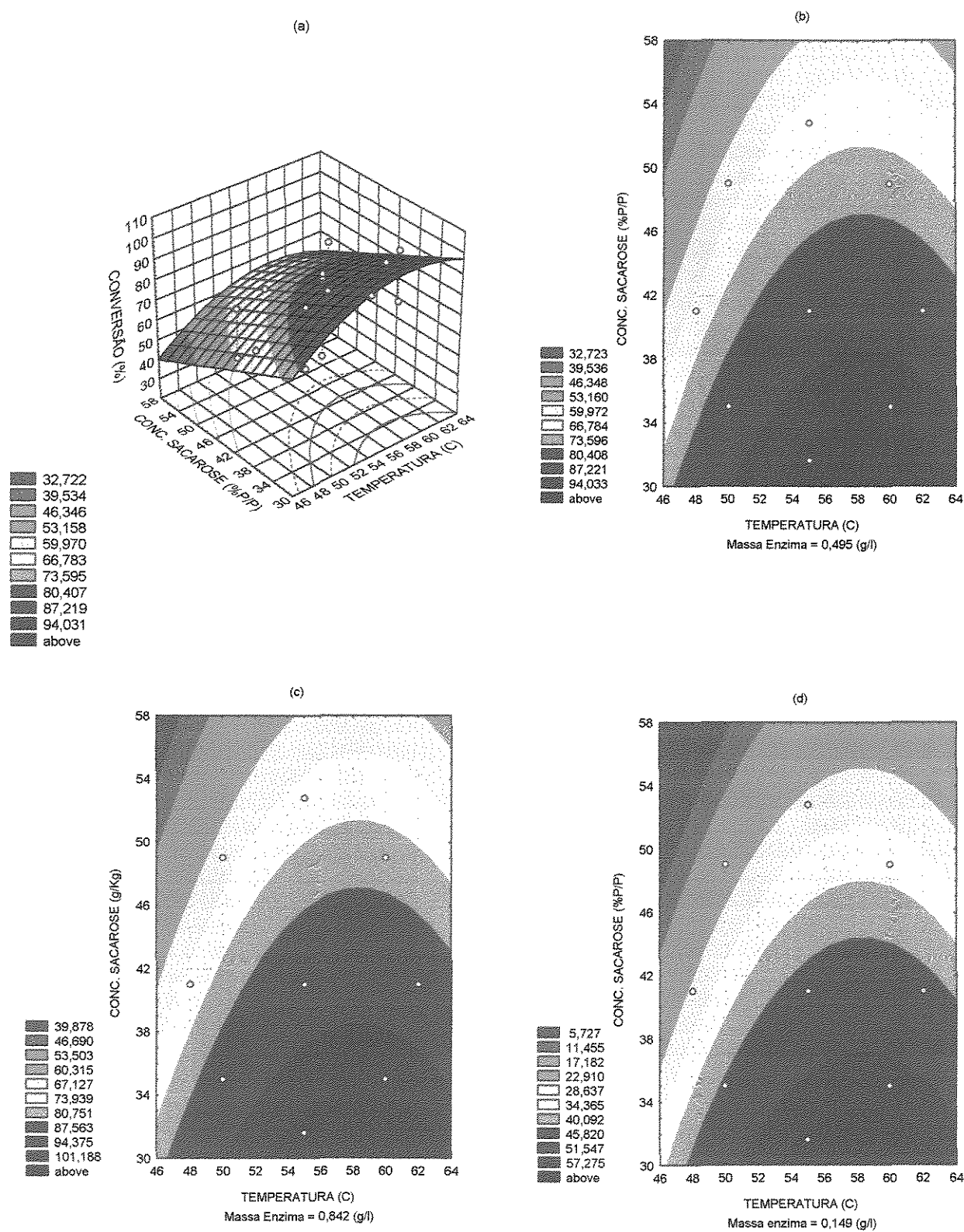
ME: Massa de enzima [g/l de xarope]

CS: Conc. inicial sacarose [g/100g]

As Figuras 12, 13 e 14 mostram o nível de conversão em função da temperatura e massa de enzima para diferentes valores de concentração de sacarose; temperatura e concentração de sacarose para diferentes massa de enzima; e massa de enzima e concentração de sacarose para diferentes temperaturas respectivamente.

Da mesma forma que para a invertase, os efeitos observados pela análise estatística dos dados obtidos para inulinase mostraram ser independentes entre si às variáveis estudadas.





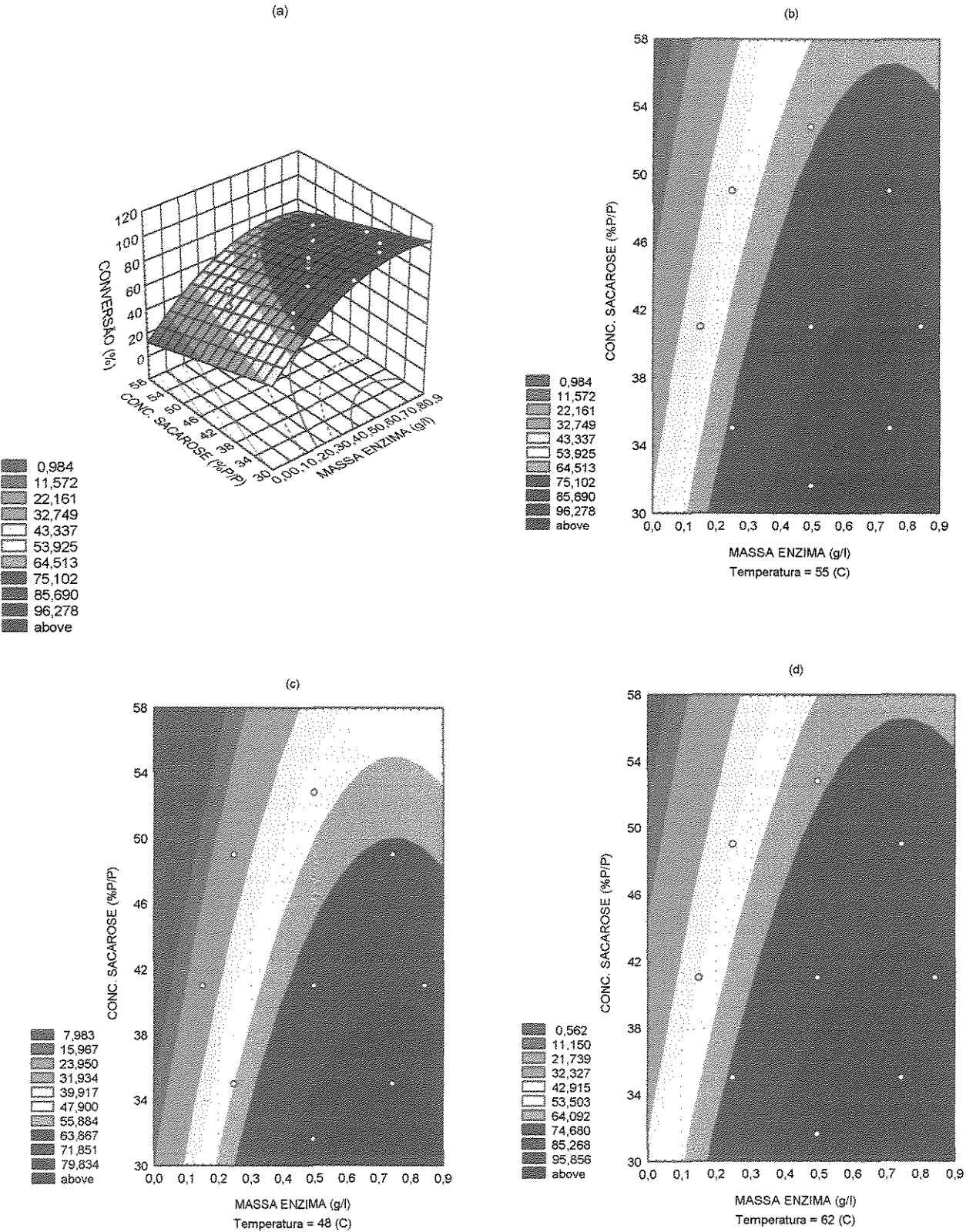


Figura 14: Conversão em função da massa de enzima e concentração de sacarose para inulinase

4.3.3. Considerações Gerais

Com base nos dados obtidos, pretendeu-se ajustar o ponto de operação, onde o consumo de enzima seja o menor possível, sem que isto cause problemas de ordem operacional, de qualidade do produto final ou econômicos.

Pelos dados contidos nas Figuras 9, 10 e 11 nota-se que o máximo de conversão é obtido quando aumenta-se a concentração de enzima, a temperatura e diminui-se a concentração inicial de sacarose para a invertase. As mesmas considerações podem ser feitas para inulinase, as quais estão mostradas nas Figuras 12, 13 e 14.

Apesar do descrito acima no que se refere os parâmetros (temperatura, concentração de enzima e sacarose) ótimos para utilização das enzimas estudadas, algumas considerações devem ser feitas no que diz respeito a:

(a) Concentração de Sacarose

Esta concentração em uma planta industrial deve estar próxima de 60% (p/p) na saída do diluidor, pois, concentrações inferiores levam a um maior custo na concentração do xarope, tanto no que diz respeito ao consumo de vapor como no investimento inicial na aquisição do equipamento. Existe ainda o problema de que caldas de açúcar pouco concentradas são sujeitas a contaminação microbiológicas que comprometem a qualidade do produto final, assim como, aumentam o custo de lavagem e desinfecção dos equipamentos.

(b) Temperatura

Em plantas onde a reação de hidrólise da sacarose é realizada por via ácida, quando executadas em temperaturas elevadas podem comprometer a qualidade do produto final aumentando a concentração de HMF e favorecendo o desenvolvimento de cor. No caso da utilização de enzimas apenas o desenvolvimento de cor é relevante, sendo que a formação de HMF não ocorre. Em relação a temperatura, as plantas que utilizam inversão ácida, operam em torno de 40°C são as mais indicadas. Já para àquelas que utilizam hidrólise enzimática, temperaturas mais elevadas podem ser utilizadas desde que o tempo de reação não seja muito longo.

(c) Concentração de Enzimas

A quantidade de enzima empregada no processo é de grande importância para a viabilização econômica de unidades industriais. A principal vantagem deste tipo de hidrólise é a qualidade do produto final, sendo a desvantagem o elevado custo deste insumo.

Para melhor comparar os resultados, foi elaborado um balanço de massa e energia para uma unidade de produção de xaropes de açúcares invertido com 55% de conversão, o qual é o melhor produto para ser comercializado devido a maior solubilidade dos açúcares que o compõe, podendo ser fornecido em concentrações de 76,0% de sólidos solúveis.

(d) Balanço de Massa, Energia e Insumos

Foi utilizado como base de cálculo a produção de 1.000 kg xarope parcialmente invertido com uma concentração de 76% (p/p) a partir de açúcar cristal com cor ICUMSA de 300. Os balanços foram realizados por setor para melhor visualização (ANDRIETTA,1992).

1. Dissolução

Açúcar	749,16 kg
Água desmineralizada	499,17 kg
Calda	1248,35 kg
Vapor	77,91 kg

2. Clarificação**Correção de temperatura**

Vapor	23,97 kg
-------	----------

Correção de pH

Cal virgem	0,19 kg
Ácido fosfórico	0,19 kg

Floculação

Talo Floc	0,230 kg
Talo Flot	0,018 kg
Calda	1250,12 kg
Borra	0,64 kg
15,26 kg Açúcar	
Lodo	14,62 kg

3. Filtração

Celite (com reaproveitamento)			0,024 kg
Borra	1,77 kg	Açúcar	0,71 kg
		Lodo	1,06 kg
Calda			1248,35 kg

4. Descoloração

NaCl			0,97 kg
NaOH			0,97 kg
Açúcar perdido na lavagem			1,44 kg
Calda			1248,35 kg

5. Inversão

Ácido clorídrico			0,96 kg
Açúcar perdido na lavagem			0,60 kg
calda			1248,35 kg

6. Polimento

Carvão ativado			0,75 kg
Calda			1248,35 kg

7. Concentração

Vapor			310 kg
Calda			1000 kg

A Tabela 22 mostra de forma reduzida os insumos consumidos para a produção de 1.000 kg deste xarope.

Tabela 22: Insumos utilizados para a produção de 1000 kg de xarope parcialmente invertido a partir de açúcar de cor ICUMSA 300

Insumo	Consumo (kg)
Açúcar	749,16
Água deionizada	499,17
Cal virgem	0,19
Ácido fosfórico	0,19
Talo Floc	0,23
Talo Flot	0,018
NaCl	0,97
NaOH	0,97
HCl	0,96
Carvão Ativado	0,75
Vapor	411,82
Açúcar perdido no processo	3,39
Celite	0,024

Utilizando-se açúcar de cor ICUMSA de 150, pode-se eliminar a etapa de clarificação, sendo portanto o consumo de insumos reduzido. A Tabela 23 mostra os insumos necessários para este procedimento.

Tabela 23: Insumos consumidos para a produção de 1.000 kg de xarope parcialmente invertido utilizando açúcar de cor ICUMSA 150

Insumo	Consumo (kg)
Açúcar	749,16
Água deionizada	499,17
NaCl	0,97
NaOH	0,97
HCl	0,96
Carvão Ativado	0,75
Vapor	411,82
Açúcar perdido no processo	3,39
Celite	0,024

Segundo BUSSIERE (1993), o gasto de insumos para a produção de 1.000 kg de xarope, utilizando-se açúcar de cor 150 é de aproximadamente US\$ 7,38.

De uma forma geral o comportamento da invertase e da inulinase é similar nas condições testadas, sendo assim o uso de uma ou de outra indiferente, em relação ao comportamento cinético da reação.

Para a inulinase, a massa de enzima necessária para se atingir 55% de conversão em 6 horas é de 0,16 g/kg de xarope. Este valor é duas vezes menor que a massa de invertase necessária.

Com base nestas informações buscou-se trabalhar com consumo mínimo de enzimas, uma vez que o limitante para a viabilização econômica do processo é o consumo desta cujo preço por kg pode alcançar R\$ 70,00 para invertase e R\$ 220,00 para inulinase. A estratégia utilizada para isto, foi a variação da concentração de sacarose e a temperatura. Em função do preço adotou-se utilizar a invertase para o cálculo do custo final do xarope de açúcar invertido.

As Figuras 9 (a), (b), (c) e (d) mostram os níveis de conversão obtido em função da temperatura e da massa de enzima utilizada para diferentes concentrações de sacarose.

A Figura 9 (d) mostra as curvas de níveis da conversão de sacarose a 52,8% (p/p). Adotou-se esta concentração por ser próxima da mais utilizada industrialmente (60%) (BUSSIERE *et al.*, 1993). Para uma temperatura de 50°C, a massa de enzima necessária é de aproximadamente 1 grama por litro de xarope, o qual equivale a 0,82 g/kg de xarope. Segundo levantamento realizado no mercado, o custo médio deste xarope é de R\$ 380,00 por tonelada. Desta forma, o preço da enzima por tonelada de produto seria de R\$ 57,40, ou seja, 15% do valor do produto final.

A utilização da enzima neste processo, desprezando-se o aumento de custo devido ao maior consumo de vapor, elevaria o preço de insumos em 88,6% em relação ao processo com inversão ácida. Para este mesmo caso, se a temperatura fosse aumentada para 60°C a massa de enzima necessária diminuiria para 0,58g/kg, diminuindo o custo por tonelada para R\$ 40,60 ou 10,7% do custo do produto final.

Embora, os catalisadores químicos representam no máximo 1% do preço final do xarope, esses resultam em um produto de qualidade inferior quando comparado com o produto obtido por via enzimática. Para que o reator de enzima livre se torne viável seria necessário que o custo da enzima se aproximasse ao custo dos catalisadores, ou seja perto de R\$ 3,80 por

tonelada de produto. Isto significa um consumo de 0,054 g de enzima por kg de produto ou 0,082 g/ l de xarope. Este valor só poderá ser atingido quando se trabalha com temperaturas elevadas (60°C) e concentração de sacarose abaixo de 30% (p/p), o que não é indicado para uma planta industrial como discutido anteriormente.

Em uma condição intermediária, considerando uma concentração de sacarose em torno de 45% e 62°C (Figura 11d), é possível diminuir o consumo de enzima para aproximadamente 0,33g de invertase/kg de produto. Desta forma, os insumos utilizados estão mostrados na Tabela 24. Nestas condições, o custo de insumos por tonelada de produto atingiria o valor de R\$ 32,45, 4 vezes maior que o processo com inversão ácida.

Tabela 24: Insumos Consumidos para a Produção de 1.000 kg de Xarope

Insumos	Consumos (kg)
Açúcar	749,16
Água deionizada	499,17
NaCl	0,97
NaOH	0,97
Invertase	0,33
Carvão Ativado	0,75
Vapor	745,38
Açúcar perdido no processo	3,39
Celite	0,024

O incremento total no custo de insumos por tonelada de xarope

Acréscimo no consumo de vapor	R\$ 2,59
Custo da enzima	R\$ 23,10
Economia em ácido clorídrico	R\$ 0,46
Acréscimo total	R\$ 25,23

5. CONCLUSÕES

✓ Os métodos de otimização que estudam uma única variável por ensaio pode levar a pontos de máximos que não representam a realidade.

✓ As temperaturas de máxima atividade foram de 57,3 e 65,0°C para invertase (pH = 4,9) e inulinase (pH = 4,6) respectivamente. Essas não foram adotadas devido aos baixos valores de meia vida das enzimas a estas temperaturas. Para invertase foi de 1,79 horas e para inulinase foi de 1,11 horas. Utilizou-se temperatura de 55 °C, onde a meia vida é maior que 6 horas para as duas enzimas.

✓ O nível de conversão da sacarose no reator de enzima livre operando em batelada aumenta em função do aumento da temperatura, da massa de enzima e baixa concentração de substrato.

✓ O ponto ideal de operação para obtenção do produto (50-55% de inversão) pode ser definido como sendo aquele onde o custo da enzima é menor ou igual a 1% em relação ao custo do produto final, o que seria atingido para a invertase quando em temperatura de 60 °C, concentração de sacarose abaixo de 30% (p/p) onde o consumo de enzima seja de 0,082g/l de xarope. As condições descritas não são adequadas para a produção à níveis industriais.

✓ As condições operacionais mínimas requeridas para produção industrial do xarope invertido inclui: concentração de sacarose em torno de 45%, temperatura de 62 °C e massa de enzima de 0,5g/l de xarope. Essas ainda não são as condições que viabilizam o uso do reator de enzima livre, pois este processo eleva o custo de insumos em 4 vezes quando comparado a inversão ácida.

✓ No caso da inulinase o preço é 3 vezes superior ao da invertase, o que desqualifica essa enzima pois, apesar de possuir uma atividade duas vezes maior que a invertase, a inulinase apresentou o mesmo comportamento cinético que a invertase para as condições testadas.

✓ Nas condições mínimas de operação o custo do catalisador no processo enzimático representa 6,1% do custo final do produto, contra menos de 1% quando da utilização da catálise ácida.

✓ Através deste trabalho pôde se concluir que a hidrólise enzimática em reatores de enzima livre não é viável economicamente. Embora existam vantagens, como por exemplo a menor formação de cor e a não produção de produtos secundários, o não reaproveitamento desta enzima inviabiliza esta prática.

6. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

Em um primeiro momento o uso de reatores de enzima livre não parece ser viável em função do custo deste catalisador. O estudo de processos de produção de enzimas no Brasil, o que inclui melhoramento de linhagem, otimização de meios de cultivo e ajuste de parâmetros de controle de processo, podem em um segundo momento viabilizar estes processos.

A utilização de reatores que permitam o reaproveitamento do catalisador (enzimas imobilizadas) deve ser estudada como uma alternativa para viabilização econômica da produção de xaropes de açúcar invertido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIETTA, S.R. **Manual de Operação - Planta Piloto - EngibioI**. CPQBA/UNICAMP, 1992 Caixa Postal 6171 Cep: 13082-970, Campinas/SP.

ALEWIJN, W.F., HONIG, P. **Principles of Sugar Technology**. Amsterdam:Elsevier, 1959. v.2, Cap. 9, p. 375.

AZHARI, R., SZLAK, A.M., ILAN, E., SIDEMAN, S., LOTAN, N. Purification and Characterization of endo-and-exo-Inulinase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.11, p. 105-117, Feb.1989.

BAIKOW, V.E. **Manufacture and Refining of Raw Cane Sugar**. Amsterdam:Elsevier, 1967 Cap. 25, p. 375.

BARKER, P.E., CHING, C.B. A continuous liquid chromatographic process for the separation of glucose/fructose mixtures. **Int. Cong. Scand. Chem. Eng.**, p. 357-365, 1980. Apud:CEPPA, v.8, n.1, p. 47-73. Curitiba, 1990.

BARKER, P.E., GANETSOS, G. Production of high purity fructose from Barley syrups using semi-continuous chromatography. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v.35B, n.4, p. 217-228, Dec. 1985.

BARKER, P.E., THAWAIT, S. Separation of fructose from carbohydrate mixture by batch and semi-continous chromatographic operation. **Chemical Engineering Science**, v.42, n.11, p. 2547-55, 1987.

BERTI, C., BERGAMASCO, R., ZANIN, G.M., MORAES, F.F. Modelagem cinética da hidólise da sacarose pela invertase. In: 2º SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 1995, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro:ENZITEC, 1995. v.2.

BLANCHARD. P.H., GEIGER, E.O. Production of high fructose corn syrup in the USA. **Sugar Technology Reviews**, Amsterdan, v.11, p. 1-94, 1984.

BOX, G.E.P., WILSON, K.B. On the experimental of optimum condition. **J. Royal Stat**, v.13 p. 1-45, 1951.

BOX, G.E.P., HUNTER, S.W., HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters**, New York: John Wiley & Sons, 1978.

BOX, G.E.P., DRAPPER, N.R. **Empirical Model-Building and Response Surfaces**, New York:John Wiley & Sons, 1987.

BRUDER, F., MOROZ, R.D. Production of Liquidar Sugar from Raw Sugar. **Sugar y Azucar**, v.76, n. 3, p. 34-119, Mar. 1981.

BUSSIERE, G., NOWAK, P., COTILLON, M. Production of Liquid Sugars from White Crystal Sugar. **Applexion Génie chimique D'échanges D'Ions**, France 1993.

CARNITI, P., BELTRAME, P.L., GUARDIONE, D., FOCHER, B., MARZETTI, A. Hydrolysis of Inulin: A Kinetic Study of the Reaction Catalyzed by an Inulinase from *Aspergillus ficuum*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 37, n. 6, p. 575-579, Mar. 1991.

CHANDRASEKARAN, S.K., KING, C.J. Solid-Liquid Phase Equilibria in Multicomponent Aqueous Sugar Solutions. **Journal of Food Science**, v. 36, n.4, p. 699-704, 1971.

CHING, C.B. A theoretical model for the simulation of the operation of the semi-continuous chromatographic refiner for separating glucose and fructose. **Journal Chem. Eng. Jpn.**, v.16, n.1, p. 49-53, 1983.

COKER, L.E., VENKATASUBRAMANIAN, K. High Fructose Corn Syrup. **Biotechnonology Application and Research**, v. 221, p. 165-171, 1985.

COMBES, D., MONSAN, P. Sucrose Hydrolysis by Invertase Characterization of Products and Substrate Inhibition. **Carbohydrate Research**, v.117, p. 229-239, Sept. 1983.

CONTIERO, J. Invertase X Inulinase.In: 2º SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 1995, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro:ENZITEC, 1995. v.2.

CONTIERO, J. **Estudo da Produção da Enzima Invertase Extracelular por *Kluveromyces bulgarius***. Campinas:FEA, UNICAMP, 1992. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

DICKENSHEETS, P.A., CHEN, L. F., TSAO, G.T. Characteristics of Yeast Invertase Immobilized on Porous Cellulose Beads. **Biotechnology and Bioengineering**. v.19, p. 365-375, Mar. 1977.

DIXON, M., WEBB, E.C. **Enzymes**. 3 ed. London: Longman Group Limited, 1979. Cap.I: Introdução, p. 1-7.

DRAETTA, I.S. Isolamento, Purificação e Cinética da Invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. **Colet. Inst. Tecnol. Alim.**, Campinas, v.4, p. 23-37, 1971/72.

FURLAN, S.A., SCHNEIDER, A.L.S., PASSADOR-GURGEL, G.C., LOPEZ, J.A., GERN, R.M.M., CARVALHO-JONAS, M.F. Produção de inulinases por microrganismos. In: 2º SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 1995, Rio de Janeiro. **Anais** Rio de Janeiro:ENZITEC, 1995. v.2.

GADDIE, R.S. **Beet Sugar Technology, Beet Sugar Dev. Found.** 2 ed. McGinnis, R.A. Cap.XV, p. 500, 1971.

HASHIMOTO, K., ADACHI, S., NOUJIMA, H., MARUYAMA, H. Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber. **J.Chem.Eng.Jpn.**, v.16, n.5, p. 400-406, 1983.

ICC, INTERNATIONAL COMMERCE CORP. **Informações de Mercado de Edulcorantes e Polióis.** Jun.,1993. End. Av. Nove de Julho, 5345 cj. 22. São Paulo.

JOHNSON, A.R., STURDIVANT, A.T. Sugar and sugar products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.52, p. 1-4, 1969.

JUNK, W.R., PANCOAST, H.M. **Handbook of Sugar for Processors, Chemist and Technologists**, Westport: The Avi Publishing Company, INC., 1973.

KAWASHIMA, K., UMEDA, K. Preparation of Membranous Immobilized Invertase and It's Characteristic. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n.6, p. 1151-1157, 1976.

KONEN, J.C., WILSON, J.R. Replacing carbonaceous adsorbents with acrylic and styrenic strong base anion resins in cane sugar decolorization applications. **INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR**, XXI, 1992, Bangkok, Thailand.

LANDI, S., MANTOVANI, G. Ion exchange in the beet-sugar industry. **Sugar Technology Review**, v.3, n.1, p. 1-67, Feb. 1975.

LONG, J.E. High Fructose Corn Syrup. **Cereal Foods World**, v.31, n.12, p. 863-865, Dec. 1986.

LLOYD, N.E., KHALEELUDDIN, K. A kinetic comparison of *Streptomyces* glucose isomerase in free solution and adsorbed on deae-cellulose. **Cereal Chemistry**, v.53, n.2, p. 270-282, Mar.-Apr. 1976.

MACALLISTER, R.V. **Immobilized Enzymes for Food Processing**. W.H.Pitcher, Jr.(Ed), 1980, p. 81-111.

MARIGNETTI, N., MANTOVANI G. Liquid Sugar. **Sugar Technology Reviews**, v.7, n.1, p.3-47, Dec. 1979.

MAUGERI, F., CABRAL, F.A., RIBEIRO, E.J. Estabilidade térmica da invertase imobilizada por oclusão em gel e imobilizada por ligação covalente. In: XIX ENCONTRO SOBRE ESCOAMENTO EM MEIOS POROSOS, 1991, Campinas, SP. **Anais** Campinas, SP: UNICAMP, SP, 1991. v.II, p. 688-697.

MERMELSTEIN, N.H. Immobilized enzymes produce high-fructose corn syrup. **Food Technology**, v.29, n.6, p. 20-26, Jun. 1975.

MILCENT, P.F. **Contribuição ao Estudo da Hidrólise Contínua da Sacarose por Catálise Heterogênea em Leito de Resina Trocadora de Íons**. Curitiba, 1989. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 1989.

MILLEER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v.31, p. 426-428, 1959.

MOLINA, M.E. **21st. Annu. Meet. Sugar Ind. Technol.**, p.121, 1962. Apud: Sugar Thecnology Review, v.7, n.1, p3-47, Dec. 1979.

PELCZAR, M., REID, R., CHAN E.C.S. **Microbiologia**, São Paulo: McGraw-Hill, 1980.

PERCIVAL, R.W., SCHULER J.E. The production of Liquid Invert Sugar with Ion Exchange Resins. **Rohm and Haas Company, Latin American Region**, 1980.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2. ed. Milwaukee: Academic Prees, 1975.

REED, G. **PRESCOTT & DUNN's industrial microbiology**. 4. ed. Westport: AVI Publishing Company, Inc, 1983.

RIBEIRO, E.J. **Imobilização de Invertase em Resinas Trocadoras de Íons e Estudo Cinético de Inversão de Sacarose em Reator Tubular**. Campinas: FEA, UNICAMP, 1983. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1983.

ROBINSON, J.W. Will high-fructose corn syrup sweeten your future? **Food Engineering**, v.47, n.5, p. 57-61, May 1975.

RODRIGUES, M.I., FILHO, R.M., MAUGERI, F. Optimization of a process of continuous enzyme purification by surface response analysis. **Food-Control**, v.4, n.3, p. 144-148, Jul.1993.

- ROUSSEL, L., VIEILLE, A., BILLET, I., CHEFTEL, J.C. Sequential heat gelatinization and enzymatic hidrolysis of corn starch in an extrusion reactor. **Lebensmittel- Wissenschaft & Technologie**, v. 24, n.5, p. 449-458, 1991.
- SAKIYAMA, T., NAKAMURA, K., YANO, T. Characterisation of cation exchange resin as to separation of glucose and fructose using the moment analysis technique. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.9, p. 2619-2625, Sept. 1985.
- SARRA, M., REDIN, J., OCHIN, F., GODIA, F., CASAS, C. Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of *Streptomyces lividans* TK21producing a hybrid antibiotic. **Biotechnology Letters**, v.15, n.6, p. 559-64, Jun.1993.
- SEGEL, I.H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. New York: John Wiley, 1975. Cap.I: Enzymes as biological catalysts, p. 1-17.
- SCHNYDER, B.J., LOGAN, R.M. Presentation at 77th National AIChE, Pittsburgh, PA, 1974. Apud: *Sugar Technologie Reviews*, v.11, p. 1-94, 1984.
- SCRIBAN, R. **Biotecnologia**, São Paulo: Manole Ltda., 1984. Cap. 1: Enzimologia e Biocatálise. p. 179-207.
- SMITH, I. The Development of Natural Sweeteners as Alternative to Cane and Beet Sugar. **Journal of Agricultural Economics**, v.29, n.2, p. 155-163, 1978

SURI, S.K., BHATT, S., BOSE, S. Separation of Glucose-fructose Mixture by Anion Exchange Resin Chromatography. **India Sugar**, v. 33, n.12, p. 807-812, 1984.

TAKASAKI, Y., KOSUGI, Y., KANABAYASHI, A. **Fermentacion Advances**, New York:Academic Press, 1969.

TAKASAKI, Y., TANABE, O. Patent 3,616,221. USA, 1971.

TEAGUE, J.R., ARNOLD, E.C. UOP technology for the production of fructose sweetners. **Sugar y azucar**, v.78, n.8, p. 18-19, Aug. 1983.

VLITOS A.J., IMRIE F.K.E. **Materials and Technology**. Longman, 1975. v.VII, Cap. 8, p.559.

WARDRIE, E.K. High-fructose corn syrup. **Food technology**, v.25, n.5, p. 501-504, 1971.

WHITE, J.S. **Fructose Syrup: Production, Properties, and Applications**, 1982.

WISEMAN, E.J., WOODWARD, J. Industrial Yeast Invertase Stabilization. **Process Biochemistry**, p. 24-30. July/August, 1975.