

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE
EXTRACELULAR DE *RHODOTORULA* SP. E APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Autor: Elizama Aguiar de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Engenharia de Alimentos

CAMPINAS – SÃO PAULO

MARÇO / 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Ag93i Aguiar-Oliveira, E., 1978
Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de
Rhodotorula sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos /
Elizama Aguiar de Oliveira.-- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Nióbio. 2. Zircônio. 3. Alginatos. 4. Adsorção. 5.
Transfrutossililação. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Immobilization of extracellular enzyme fructosyltransferase from
Rhodotorula sp. and application in fructooligosaccharides
production

Palavras-chave em inglês (Keywords): Niobium, Zirconium, Alginates, Adsorption,
Transfructosylation

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Aline Carvalho da Costa

Gabriela Alves Macedo

Maria Helena Andrade Santana

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa
FEQ/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana
FEQ/UNICAMP

**"Mas esforçai-vos, e não desfaleçam as vossas mãos;
porque a vossa obra tem uma recompensa."**

II Crônicas 15:7

Agradecimentos

"Bendito seja o Senhor, pois fez maravilhosa a sua misericórdia para comigo (...)"

Salmos 31:21

Agradeço ao prof. Francisco por sua orientação, por ter contribuído tanto nesse trabalho e principalmente por acreditar em mim.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a banca examinadora: Prof^a Dr^a Aline C. da Costa, Prof^a Dr^a Gabriela A. Macedo e a Prof^a Dr^a Maria Helena A. Santana; por suas sugestões e correções que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio, incentivo e amor. Agradeço a Painho por ter me ensinado o gosto pela boa música (que desenferuja o cérebro) agradeço a Mainha pelas historinhas pra dormir que me contou (que me estimularam a criatividade) agradeço a Dai que me ensinava o que ele aprendia na escola antes mesmo que eu tivesse idade pra frequentá-la (me mostrando o gosto pelo aprender).

Agradeço aos meus amigos que tenho colecionado nesses anos de Bahia, de Minas Gerais e de São Paulo. Todos esses amigos especiais tiveram participações importantíssimas na minha caminhada até aqui, e se Deus quiser ainda poderei desfrutar dos conselhos, conversas, desabafos, puxões de orelha, companheirismo... Muitos são os nomes que eu gostaria de citar, mas aí eu iria dobrar o número de páginas da minha dissertação. Portanto, vai aqui um agradecimento sincero e resumido aos meus queridos amigos da infância e adolescência regados a azeite de dendê, aos meus amigos da juventude com aroma de pão de queijo e aos meus mais recentes amigos com sabor de pizza... Muito obrigada!

Agradeço a toda equipe do LEB pelos momentos de descontração, seriedade e cooperação, mas em especial ao (Barão) Geraldo e a Mónica (Bracin) por toda ajuda nos meus experimentos, amizade e paciência. Agradeço a Fifa, nossa mãezona, por toda

eficiência e por ser assim tão adorável...! Agradeço a Saartje (gente boa demais!) por ter sido minha "co-orientadora" (rs..!!).

Agradeço aos professores Maria Isabel Rodrigues (FEA-UNICAMP), Yoshitaka Gushikem (IQ-UNICAMP), Sônia Bueno (FEQ-UNICAMP), Hélia Sato (FEA-UNICAMP), Sebastião Ribeiro (DEM-FAENQUIL), César Santana (FEQ-UNICAMP) e Silvio Andrieta (CPQBA-UNICAMP) por suas sugestões ao longo da execução dos experimentos.

Agradeço a CBMM e a Cia. Fluminense que gentilmente cederam nióbio para execução dos testes.

Agradeço a Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Enfim, vamo embora que tem ainda muita coisa pela frente...!!!!

Zama

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Figuras do Anexo I	xiii
Lista de Figuras do Anexo II	xiii
Nomenclatura	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA	1
1.2. OBJETIVOS	2
1.3. ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	3
2.1.1. Aplicações e benefícios dos frutooligossacarídeos	3
2.2. O GÊNERO <i>RHODOTORULA</i>	5
2.3. ENZIMAS COM ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO	6
2.3.1. Enzima frutossiltransferase extracelular de <i>Rhodotorula sp.</i>	7
2.4. ENZIMAS IMOBILIZADAS	8
2.4.1 Aspectos gerais	8
2.4.2. Métodos de imobilização enzimática	10
2.4.3. Suportes para imobilização	12
2.4.4. Preparo dos suportes inorgânicos para imobilização	17
2.4.5. Imobilização	18
2.4.6. Efeitos da imobilização	19
2.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA	21
2.5.1. Aspectos gerais	21

2.5.2. Cinética de desnaturação/desativação e meia-vida	23
2.5.3. Efeito da temperatura	24
2.5.4. Efeito do pH	26
2.5.5. Termodinâmica de desnaturação enzimática	27
2.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE LARGA ESCALA	30
3. METODOLOGIA	32
3.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	32
3.1.1. Produção da enzima	32
3.1.2. Síntese do suporte orgânico e imobilização	33
3.1.3. Síntese dos suportes inorgânicos para imobilização	34
3.2. METODOLOGIA ANALÍTICA	40
3.2.1. Determinação da recuperação enzimática (R_E)	40
3.2.2. Identificação e quantificação de carboidratos	40
3.2.3. Determinação do teor de proteína	40
3.2.4. Determinação de açúcares redutores	40
3.2.5. Determinação da glicose	41
3.2.6. Determinação da atividade enzimática	41
3.2.7. Determinação da razão ideal de imobilização (R_i)	42
3.2.8. Determinação da razão de atividade (R_A)	42
3.2.9. Determinação da razão de transfrutossilação (R_{TF})	43
3.2.10. Determinação da razão de proteína imobilizada (R_P)	43
3.2.11. Determinação da estabilidade	43
3.2.12. Determinação da constante k_d	44
3.2.13. Determinação da Energia de Ativação da Desnaturação (E_{ad})	44
3.2.14. Determinação da meia-vida ($t_{1/2}$) e efeito sobre a meia-vida ($t\%$)	45
3.2.15. Determinação da redução decimal (D) e valor z	45

3.2.16. Determinação das constantes cinéticas (v_{max} , K_m , K_i)	45
3.2.17. Determinação dos parâmetros termodinâmicos	45
3.2.18. Síntese de frutooligossacarídeos	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. TESTES PRELIMINARES	47
4.1.1. Recuperação da enzima	47
4.1.2. Alginato	47
4.1.3. Zircônio	48
4.1.4. Nióbio	50
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA EM NIÓBIO	54
4.2.1. Definição	54
4.2.2. Razão ideal de imobilização	54
4.2.3. Efeito da adição de sais sobre a estabilidade térmica	55
4.2.4. Efeito do pH sobre a estabilidade térmica	58
4.2.5. Perfil de pH	61
4.2.6. Perfil de temperatura	62
4.2.7. Perfil da concentração de substrato	63
4.2.8. Parâmetros de estabilidade térmica	66
4.2.9. Síntese de FOS	71
4.2.10. Custos	73
5. CONCLUSÕES	74
6. ANEXO I	76
7. ANEXO II	83
8. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Meia-vida da enzima frutossiltransferase extracelular de <i>Rhodotorula</i> sp. na forma livre (fonte: HERNALSTEENS, 2006)	8
Tabela 2:	Comparação entre os diferentes métodos de imobilização enzimática (fonte: WISEMAN, p. 189, 1985)	12
Tabela 3:	Cotação de alguns suportes para imobilização enzimática; realizada em 16 de novembro de 2006 (fonte: Acros, Merck, Sigma, CBMM)	14
Tabela 4:	Resumo das metodologias de síntese dos suportes inorgânicos para imobilização da enzima FTase de <i>Rhodotorula</i> sp.	34
Tabela 5:	Propriedades do composto sólido inorgânico NB-340 [®] (fonte: Technical Report; CBMM, 2006)	36
Tabela 6:	Resumo das metodologias avaliadas para preparo dos suportes inorgânicos e imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de <i>Rhodotorula</i> sp.	38
Tabela 7:	Recuperação da enzima frutossiltransferase extracelular de <i>Rhodotorula</i> sp. por gotejamento de álcool anidro	47
Tabela 8:	Valores médios obtidos para as metodologias de preparo do suporte e de imobilização avaliadas para o zircônio obtido pela Metodologia [Z-B]	49
Tabela 9:	Valores médios obtidos para eficiência de imobilização em zircônio obtido pela Metodologia [Z-C]	50
Tabela 10:	Codificação das metodologias aplicadas ao composto [N-B] para seleção de uma metodologia de imobilização da enzima FTase de <i>Rhodotorula</i> sp.	50
Tabela 11:	Valores médios para a meia-vida a 4-5°C e eficiência de imobilização da enzima FTase em [NB12]	51
Tabela 12:	Influência do composto de nióbio obtido pela Metodologia [N-B] no pH do meio	53
Tabela 13:	Efeito da imobilização em [NB] com duas etapas [I(2)] e três etapas [I(3g)] e [I(3gs)] sobre a eficiência de imobilização e estabilidade térmica	53
Tabela 14:	Valores médios de R_{TF} durante acompanhamento da estabilidade em meio estoque contendo sais	57
Tabela 15:	Avaliação do filtrado e proteína imobilizada conservada após monitoramento da estabilidade em soluções salinas	57

Tabela 16: Valores médios de R_{TF} da enzima imobilizada obtidos durante acompanhamento da estabilidade em meio estoque com diferentes pHs	60
Tabela 17: Avaliação da atividade enzimática no filtrado e conservação da proteína imobilizada após incubação em diferentes pHs para enzima imobilizada em [NBI2]	60
Tabela 18: Valores médios de R_A e R_{TF} obtidos para análise do efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática	62
Tabela 19: Valores médios de R_A e R_{TF} obtidos para avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática imobilizada em [NBI2]	63
Tabela 20: Valores médios de U_i e R_{TF} obtidos para avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a atividade da enzima imobilizada em [NBI2]	64
Tabela 21: Constantes cinéticas obtidas por linearização dos dados por Lineweaver-Burke e Eadie-Hofstee em pH 4,5 e 6,0 para a enzima imobilizada em [NBI2]	65
Tabela 22: Constantes cinéticas obtidas com o auxílio do software Statistica 5,5 em pH 4,5 e 6,0 para a enzima imobilizada em [NBI2]	65
Tabela 23: Valores obtidos em pHs 4,5 e 6,0 e diferentes temperaturas para k_d , $t_{1/2}$, D e parâmetros termodinâmicos para enzima imobilizada em [NBI2]	68
Tabela 24: Valores obtidos em pH 4,5 e 6,0 nas temperaturas de 48 e 50°C para k_d , $t_{1/2}$ para enzima imobilizada em [NBI2]	68
Tabela 25: Valores obtidos para E_{ad} e z em pH 4,5 e 6,0 para a enzima FTase imobilizada em [NBI2]	69
Tabela 26: Meia-vida da enzima FTase imobilizada, dados obtidos experimentalmente e preditos pelas equações e seus valores residuais	70
Tabela 27: Comparativo da meia-vida calculada a partir dos dados experimentais em pH 4,5 e 6,0 e a meia-vida obtida por extrapolação das equações	71
Tabela 28: Conversão e composição dos FOS obtidos em teste inicial de síntese por 72 horas em pH 4,5 e 6,0	72
Tabela 29: Conversão e composição dos FOS obtidos em sínteses após 96 h de sínteses em pH 4,5 e 6,0 e diferentes R_s	72
Tabela 30: Custo com reagentes químicos para cada metodologia de preparo e imobilização enzimática em suporte inorgânico	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotomicrografia de *Rhodotorula* sp. 40X (fonte: Lab. de Eng. de Bioprocessos)_____5
- Figura 2:** Representação de algumas formas de imobilização enzimática. a) ligação covalente, b) fibra, c) co-*cross-linking*, d) inclusão em esferas de gel, e) força iônica, f) micro-encapsulação, g) inclusão em filme gel, h) *cross-linking*_____11
- Figura 3:** Representação de alguns tipos de reatores para aplicação de enzimas imobilizadas: a) leito fixo, b) leito fluidizado, c) leito expandido, d) tipo mistura, e) tipo cesto_____30
- Figura 4:** Fluxograma para sugestões de metodologias de imobilização enzimática em suporte inorgânico_____39
- Figura 5:** Cálculo da meia-vida a 5°C da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. na sua forma livre (●) e imobilizada em [NBI2] (■)_____52
- Figura 6:** Determinação da razão ideal de imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. em [NBI2]_____55
- Figura 7:** Estabilidade e efeito da adição de sais sobre a meia-vida da enzima Ftase imobilizada em [NBI2]_____55
- Figura 8:** Estabilidade e efeito de diferentes pHs em diferentes temperaturas sobre a meia-vida da enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____59
- Figura 9:** Perfil de pH da enzima FTase imobilizada em [NBI2]; (◇) R_A observada, (□) R_A branco, (●) R_A real_____61
- Figura 10:** Perfis de temperatura obtidos nos pHs 4,5 e 6,0 com a enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____62
- Figura 11:** Esboço inicial dos perfis da atividade enzimática em função da concentração do substrato sacarose em pH 4,5 e 6,0 com a enzima imobilizada em [NBI2]_____64
- Figura 12:** Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da enzima imobilizada em [NBI2]. Dados obtidos experimentalmente (pontos) e dados preditos pelo software Statistica (linhas)_____66
- Figura 13:** Formalização dos dados experimentais por Arrhenius para cálculo de E_{ad} nos pHs 4,5 e 6,0 com a enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____67
- Figura 14:** Linearização da redução decimal nos pHs 4,5 e 6,0 para cálculo do valor z da enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____67
- Figura 15:** Meia-vida em pH 4,5 e 6,0 para enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____70

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO I

- Figura A:** Perfis obtidos com a enzima Ftase de *Rhodotorula* sp. na sua forma livre para as atividades hidrolítica (●) e de transfrutossilacção (*): (a) pH-atividade enzimática; (b) pH-estabilidade enzimática; (c) temperatura-atividade enzimática; (d) temperatura-estabilidade enzimática (fonte: HERNALSTEENS, 2006) _____76
- Figura B:** Linearização dos dados experimentais em pH 4,5(▲) e 6,0 (◇) pra cálculo das constantes cinéticas v_{max} e K_m da enzima imobilizada em [NBI2]_____77
- Figura C:** Linearização dos dados experimentais [pH 4,5(▲) e pH 6,0 (◇)] por Hanes para cálculo das constantes cinéticas v_{max} e K_m da enzima imobilizada em [NBI2]__78
- Figura D:** Relação entre os dados experimentais (v e S) e as constantes cinética calculadas (v_{max} e K_m) em pH 4,5(▲) e 6,0 (◇) da enzima FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. imobilizada em NBI2_____78
- Figura E:** Comparativo entre os perfis de atividade da enzima FTase imobilizada em [NBI2] em função da concentração de sacarose nos pHs 4,5 e 6,0 utilizando as constantes calculadas por linearização (pontos) e pelo software Statística 5.5 (pontos)_____79
- Figura F:** Perfil de concentração de açúcares obtidos em sínteses com pH 4,5 e diferentes R_s utilizando enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____80
- Figura G:** Perfil de concentração de açúcares obtidos em sínteses com pH 6,0 e diferentes R_s utilizando enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____81
- Figura H:** Perfil de composição dos FOS obtidos durante sínteses nos pHs 4,5 e 6,0 e diferentes R_s utilizando enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____82

LISTA DE TABELAS DO ANEXO II

- Tabela A:** Constantes cinéticas calculadas por linearização de Hanes para enzima FTase imobilizada em [NBI2]_____83
- Tabela B:** Desvios absolutos no cálculo das constantes cinéticas pelo Statística 5.5 com enzima FTase imobilizada [NBI2]_____83
- Tabela C:** Resumo das informações disponíveis no banco de dados BRENDA (2007) sobre as duas classificações atualmente conflitantes na literatura, frutossiltransferase e frutofuranosidase_____84

NOMENCLATURA

A_a	constante de Arrhenius para ativação enzimática
A_d	constante de Arrhenius para desativação enzimática
AR	concentração de açúcares redutores ($\mu\text{mol/L}$)
ART	concentração de açúcares redutores totais ($\mu\text{mol/L}$)
D	redução decimal da atividade enzimática (min^{-1})
ΔG	variação da Energia Livre de Gibbs (kJmol^{-1})
ΔH	variação da Entalpia (kJmol^{-1})
ΔS	variação da Entropia ($\text{kJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
E_a	Energia de ativação enzimática (kJmol^{-1})
E_{ad}	Energia de ativação da desnaturação enzimática (kJmol^{-1})
F	concentração de frutose ($\mu\text{mol/L}$, g/L)
F	constante de Faraday
F_T	concentração de frutose transferida ($\mu\text{mol/L}$)
FOS	concentração de frutooligossacarídeos (g/L)
G	concentração de glicose ($\mu\text{mol/L}$, g/L)
GF₂	concentração de kestose (g/L)
GF₃	concentração de nistose (g/L)
GF₄	concentração de 1-frutossilnistose (g/L)
h	constante de Planck (Jmin)
H⁺	concentração de íons H ⁺
K_B	constante de Boltzmann (J.K^{-1})
k_a	constante de ativação enzimática
k_d	constante de desnaturação enzimática
K_i	constante de inibição ($\mu\text{mol/L}$, g/L)
K_m	constante de Michaelis-Menten ($\mu\text{mol/L}$, g/L)
Nb	nióbio
P_i	proteína imobilizada (mg)
P_{fil}	proteína do filtrado (mg)
P_o	proteína oferecida para imobilização (mg)
R	constante ideal dos gases ($\text{J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
R_A	razão de atividade [$\%(U_i/U_o)$]

R_A^{filt}	razão de atividade do filtrado [%(U_{fil}/U_o)]
r_d	taxa de desnaturação enzimática (U/t)
R_i	razão ideal de imobilização (U_{TF}/g)
R_P	razão de proteína [%(P_i/P_o)]
R_P^{filt}	razão de proteína do filtrado [%(P_{fil}/P_o)]
R_S	razão de síntese (U_i/ml)
R_{TF}	razão de transfrutoseilação [%(U_{TF}/U_H)]
R_{TF}^{filt}	razão de transfrutoseilação do filtrado [%(U_{TF}/U_H)]
S	concentração do substrato ($\mu mol/L$, g/L)
T	temperatura ($^{\circ}C$, K)
t	tempo (min, h, dias)
t_{1/2}	meia-vida enzimática (min, h, dias)
Ψ	potencial eletrostático
U_{TF}^{fil}	unidades de atividade enzimática do filtrado (U_{TF})
U_H	unidade de atividade hidrolítica (μmol glicose/min)
U_i	unidades de atividade enzimática imobilizada (U_{TF}/g suporte)
U_o	unidades de atividade oferecidas para a imobilização
U_{TF}	unidade de atividade de transfrutoseilação (μmol frutose/min)
U_t	unidades de atividade enzimática imobilizadas (tempo t)
v	velocidade de reação enzimática (U_{TF} , U_i)
v_{max}	velocidade máxima (U_{TF} , U_i)
V_{reação}	volume da reação (mL, L)
z	valor z para desnaturação enzimática ($^{\circ}C$)
Z	valência
Zr	zircônio

RESUMO

A obtenção de frutooligossacarídeos (FOS) por enzimas imobilizadas abrange dois conceitos em grande expansão nos últimos anos: aplicação industrial de enzimas imobilizadas e alimentos funcionais. A opção de imobilização é principalmente induzida pela facilidade de controle da reação e possibilidade de reutilização do sistema, além de permitir escalonamento industrial. Dentre os alimentos funcionais estão os FOS que agem como prebióticos ao induzirem o crescimento de uma microflora desejável e benéfica ao organismo. As leveduras do gênero *Rhodotorula* apresentam bom potencial de transfrutossilacção e sua enzima extracelular recuperada do meio de cultivo por precipitação com álcool anidro foi imobilizada em diferentes suportes para seleção de uma metodologia adequada de imobilização. Os melhores resultados foram obtidos ao se imobilizar a enzima por adsorção em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite, comercializado pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração. A eficiência de imobilização foi de 97,76% para uma razão de 164 U/g suporte. O perfil de pH da enzima imobilizada foi deslocado e estendido para valores mais básicos do que o apresentado pela enzima livre, indicando efeito causado pela carga negativa do suporte. A adição de sais a 10 mM no meio de incubação demonstrou aumentar a estabilidade térmica do imobilizado, especialmente para o sal CuSO_4 . Em pH 4,5 e 6,0 foi observada alta atividade enzimática e estabilidade em diferentes temperaturas, e ambos os pHs foram selecionados para caracterização do sistema. A meia-vida da enzima imobilizada a 50°C em pH 4,5 e 6,0 foi respectivamente de 24 e 48 dias e a temperatura ótima para cada pH foi de 61°C e 63°C. A cinética enzimática apresentou inibição pelo substrato sacarose, efeito não observado com a enzima livre. Sínteses de FOS tendo sacarose a 50% como substrato inicial, foram realizadas em micro-reatores do tipo batelada nos pHs selecionados, a conversão de FOS obtida apresentou valores em torno de 60%, não muito diferentes da enzima livre. Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que a metodologia selecionada é viável para aplicação da enzima imobilizada em biorreatores para produção de FOS.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) production by immobilized enzymes encloses two concepts that have faced great expansion in the last few years: industrial application of enzymes and functional foods. The option for enzyme immobilization is mainly induced by the easiness of controlling the reaction and the possibility of reusing the biocatalyst, besides the fact of allowing industrial scale-up. Amongst functional foods, there are the FOS for acting as a prebiotic inducing the growth of a desirable and beneficial microflora to our organism. Yeasts from the genre *Rhodotorula* has demonstrated a great transfructosilation potential and its extracellular enzyme recovered from fermented medium by alcohol precipitation were immobilized on different supports and by different methodologies in order to select the most adequate of them. The best results were achieved immobilizing the enzyme by adsorption on a solid acid support consisted of niobium ore and graphite, commercialized for Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração. The immobilization efficiency reached 97,76% at a rate of 164 U_i/g of support. Considering the immobilized enzyme, the pH profile changed to more basics values comparing to free enzyme, indicating an effect caused by negative charge of the support. Salt addition at 10 mM to incubation medium demonstrated to increase thermal stability, especially for CuSO₄ salt. At pH 4,5 and 6,0 high activity and good stability were observed in different temperatures, and both were selected for system characterization. The half-life obtained at 50°C and pH 4,5 and 6,0 were respectively 24 and 48 days and the maximum activities for each pH were at temperature of 61°C and 63°C. Enzymatic kinetic for the immobilized enzyme presented inhibition by substrate concentration, effect not observed with free enzyme. FOS synthesis with sucrose at 50% as starting substrate were conducted in micro-reactors in both pH and the FOS conversion obtained were around 60%, similar to free enzyme. Based in these results it is possible to say that this methodology for enzyme immobilization is viable for application in large scale bioreactors for FOS production.

1. INTRODUÇÃO

Biotecnologia, como ciência, abrange desde engenharia genética e de proteínas a catálises enzimáticas; a transformação de uma propriedade pesquisada em produto disponível deve sempre levar em consideração fatores como custo, efeitos colaterais e aceitação do consumidor alvo em relação às técnicas biotecnológicas. O mercado global para enzimas industriais foi estimado em \$2 bilhões em 2004 e espera-se que atinja \$2,4 bilhões até 2009. Devido a freqüentes preocupações com o meio-ambiente e custo de projetos, processos químicos convencionais têm sido cada vez mais abandonados e processos biotecnológicos têm sido rapidamente valorizados e indicados como seus substitutos (THAKORE, 2004; van-BELIEN & LI, 2002; GOLDBERG *et al.*; 1994).

1.1. JUSTIFICATIVA

A obtenção de enzimas de origem microbiana é bem mais aplicada e difundida do que a de origem vegetal, isto devido ao fato de que os microrganismos têm um ciclo curto quando comparados com os vegetais e não apresentam sazonalidade, além do baixo custo de obtenção. Até o momento, sabe-se que a enzima extracelular de *Rhodotorula sp.* (HERNALSTEENS, 2006) apresentou alto potencial para a síntese de frutooligossacarídeos, maior que a inulinase produzida pelo gênero *Kluyveromyces sp.* (SANTOS, 2002). Desde 2002, os frutooligossacarídeos e microrganismos com alto potencial de transfrutossilção têm sido alvo de pesquisas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA-FEA-UNICAMP) tendo como resultado atual as seguintes patentes: PI 0404152-6 (MAUGERI *et al.*, 2004) e PI 0202602-3 (MAUGERI & PINHEIRO, 2002).

Os frutooligossacarídeos, por suas propriedades funcionais têm encontrado grande nicho de mercado e crescente aplicação industrial, atualmente no mercado estão disponíveis poucas marcas deste composto, sendo a técnica de produção dominada pelo Japão. Sua produção industrial é normalmente realizada por enzimas imobilizadas de origem fúngica, mas enzimas livres também podem ser empregadas (SANTOS, 2002; COLLINS *et al.*, 1997; YUN, 1996). Como exemplo da produção de FOS por fungos, podemos citar a patente US Patent 20020182682 (PARK & PASTORE; 2002) de um dos laboratórios da FEA-UNICAMP, onde é feita uma das sugestões de trabalho para a enzima imobilizada em meio semi-sólido composto por farelo de trigo.

A obtenção tanto dos frutooligossacarídeos como dos suportes e reagentes comumente empregados dificulta o consumo e reprodução das metodologias aplicadas em outros países. Muitas técnicas apresentam uma série de inconvenientes, como por exemplo,

etapas muito complexas a serem realizadas em larga escala ou até mesmo o uso de reagentes perigosos. Estes inconvenientes em pequena escala (laboratório) não chegam a ser um problema uma vez que são conduzidos por uma equipe capacitada e realizados em condições controladas. O sucesso da aplicação de um biorreator contendo enzima imobilizada para produção de frutooligossacarídeos depende da viabilidade do reator desenvolvido, bem como de cada componente desse sistema. Dessa forma, faz-se necessário a investigação de técnicas viáveis que envolvam processos simplificados e reagentes de baixo custo. O uso de suportes que apresentem um longo tempo de manipulação, tanto durante como antes e após a imobilização, é um fator de extrema importância.

1.2. OBJETIVOS

É de interesse científico e industrial que a aplicação de suportes de baixo custo e alta disponibilidade no Brasil em um procedimento de imobilização enzimática apresente resultados tão satisfatórios quanto os de suportes convencionais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi pesquisar uma técnica adequada de imobilização da enzima frutotransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. aplicada à produção de frutooligossacarídeos em biorreator, que seja viável economicamente e de fácil reprodução e manutenção. Os estudos conduzidos neste trabalho tiveram adicionalmente a importância de fornecer conhecimentos básicos do comportamento enzimático após a imobilização.

1.3. ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO

Este trabalho foi dividido em duas etapas:

A) Testes preliminares para seleção do suporte e metodologia adequados que possibilitassem a caracterização da enzima imobilizada. Foram avaliadas:

A.1) diferentes metodologias de imobilização, e de obtenção e preparo dos suportes alginato, zircônio e nióbio,

A.2) características físicas e de estabilidade do imobilizado bem como sua viabilidade e reprodutibilidade.

B) Estudos específicos para caracterização da enzima imobilizada com o suporte e metodologia selecionada. Foram avaliados:

B.1) comportamento bioquímico após imobilização referente ao pH e adição de sais,

B.2) seleção dos pHs de maior estabilidade e atividade enzimática para avaliação de:

- aspectos de bioengenharia referentes a temperatura e concentração de substrato
- estudos de síntese em pequena escala com a enzima imobilizada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Os frutooligossacarídeos são oligossacarídeos em que 1 ou 4 moléculas de frutose estão ligadas na posição β -(2→1) da sacarose, seus principais componentes são: kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-frutosilnistose (GF₄), onde GF corresponde a um grupo sucrosil e o subscrito ao número de resíduos extra-sucrosil. Essas moléculas não são susceptíveis a digestão enzimática animal ou humana, por essa razão eles são considerados agentes não calóricos e não cariogênicos (não são metabolizados por *Streptomyces* sp. presentes na cavidade bucal e que são as causadoras de cáries e placas) além de serem bons agentes prebióticos (CABRAL *et al.*, 1993; YUN, 1996; SANTOS, 2002; STEINBERG *et al.*, 2002).

Podem ser encontrados naturalmente em uma grande infinidade de vegetais, mas nem todos são viáveis para fins alimentícios, sendo as fontes mais conhecidas: cebola, alho, aspargos, banana, alcachofra, tomate, banana, etc. (TANRISEVEN & ASLAN, 2005; ROBERFROID, *et al.*, 2001; TOMOMATSU, 1994). Comercialmente podem ser obtidos por duas vias (PASSOS & PARK, 2003):

(1) hidrólise enzimática da inulina, comercialmente disponíveis pela Orafit Ltda. (Raftilose®) e pela Imperial-Suikner Unie (Frutafit®),

(2) reação enzimática de transfrutosilação em resíduos de sacarose, comercialmente disponíveis pela Meiji-Seika Ltda. (Neosugar®) e Béghin Meiji Industries (Actilight®).

Comercialmente no Japão, existem o Neosugar G e o P. O tipo G apresenta 55% de frutooligossacarídeos e grau de doçura de 60% em relação à sacarose, já o tipo P apresenta 95% de frutooligossacarídeos e 30% de doçura em relação à sacarose (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991).

2.1.1. Aplicações e benefícios dos frutooligossacarídeos

A legislação brasileira define alimentos funcionais como "... aqueles que desempenham papel metabólico ou fisiológico no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção ou outras funções normais do organismo ..." (BRASIL, 1999). Os produtos funcionais vão bem além dos efeitos prometidos pela classe dietética ou light, pois eles apresentam em suas formulações componentes que exercem influência específica e podem promover melhoria de qualidade de vida ao auxiliar no tratamento de determinadas disfunções (KROLL, 1997; ANGELIS, 2001).

De acordo com GIBSON & ROBERFROID (1995), os prebióticos são ingredientes alimentares que quando ingeridos afetam de forma benéfica o organismo uma vez que estimula o crescimento e/ou atividade de algumas bactérias desejáveis existentes no cólon (*Bifidobacterias sp.*, *Lactobacilus sp.*, etc.) e inibindo conseqüentemente populações de *Clostridium sp.* que fazem parte da flora denominada putrefativa e indesejável (GOLDBERG *et al.*; capt. 10; 1994). Os frutooligossacarídeos por não serem absorvidos no intestino delgado, chegam ao intestino grosso, onde apresentam a propriedade funcional de estimular o crescimento da microflora benéfica sendo, portanto, classificados como prebióticos (GIBSON, *et al.*, 2004; PASSOS & PARK, 2003; TOMOMATSU, 1994; LASKIN, 1985).

Os prebióticos são amplamente comercializados no Japão e na Europa como adoçantes funcionais e também como ingredientes na produção de bebidas lácteas, balas, doces, chocolates, biscoitos, geléias, pudins e goma de mascar (SANGHEETA *et al.*, *Trends in Food Science & Technology*, 2005; LASKIN, 1985). Seu consumo pode ser como complemento alimentar ou como ingrediente de um alimento. Estudos realizados no Brasil, assim como em outras partes do mundo, sugerem a adição destes compostos em barras de cereais (SKLIUTAS, 2002), iogurtes (ANTUNES, 2004), sucos de frutas (FREITAS, 1999), biscoitos (TUOHY, *et al.*, 2001) e em produtos de panificação (MOSCATTO *et al.*, 2004) etc.

Há ainda a possibilidade de serem empregados em alimentação animal, com as mesmas funcionalidades, conforme citação de PASSOS & PARK (2003) e TANRISEVEN & ASLAN (2005), ou em uso cosmético e farmacêutico (LASKIN, 1985). Estudos sobre a aplicação de prebióticos em alimentação infantil em países europeus (VEEREMAN-WAUTERS, 2005; VANDENPLAS, 2002; RIVERO-URGRELL & SANTAMARIA-ORLEANS, 2001) e no Brasil (NÓBREGA *et al.*, 2004) apresentam resultados satisfatórios e semelhantes. Da mesma forma, há estudos sobre os benefícios da ingestão de prebióticos para pacientes idosos (GUIGOZ *et al.*, 2002). Existem muitos outros estudos referentes aos possíveis benefícios que a ingestão regular de prebióticos pode causar como: prevenção ao câncer de mama (Roberfroid *et al.*, 1998 em: TANRISEVEN & ASLAN, 2005), aumento da absorção de cálcio pelo organismo (GRIFFIN *et al.*, 2002), redução do risco de câncer de cólon (POOL-ZOBEL *et al.*, 2002), além de uma série de outros benefícios (SAAD, 2006; LOO, 2004; CUMMINGS & MACFARLANE, 2002; SCHLEY & FIELD, 2002).

De forma geral, o consumo indicado é de 8 a 10 g/dia de acordo com LASKIN (1985) ou até mesmo de 12 a 20 g/dia (Bouhnik *et al.*, 1996, em: FREITAS, 1999). Sabe-se, portanto, que o consumo elevado destes compostos pode causar flatulência, dores intestinais e diarréia devido a sua ação fermentativa e efeito osmótico (LASKIN, 1985). Os

oligossacarídeos são ainda solúveis em água e possuem baixo poder calórico, cerca de 0,4 a 0,6 vezes o poder adoçante da sacarose, o que os torna interessantes para utilização em produtos onde o uso de sacarose é restrito. Além do poder adoçante, eles não são metabolizados pelo organismo humano, portanto não agindo como fonte de energia (YUN, 1996; SANTOS, 2002).

2.2 O GÊNERO *RHODOTORULA*

As leveduras do gênero *Rhodotorula* (Figura 1) podem apresentar coloração rosa, vermelha ou amarela e são responsáveis por colorações anormais em alimentos e alteração de açúcar líquido e azeitonas. São comumente relacionadas a produção de carotenóides (PARK *et al.*; 2006), tanto de coloração vermelha quanto amarela, e produção de lipídeos (SACCHETTI *et al.*, 2005) sendo a *R. glutinis* muito empregada para este fim; são também comuns em bebidas não alcoólicas (sucos de maçã, laranja, etc.). Podem ser encontradas no solo, ar, lagos, vegetais diversos, no homem e outros mamíferos. Este gênero inclui 3 espécies ativas: *R. glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginosa* e são consideradas “leveduras falsas” ou fungos imperfeitos, pois não produzem esporos sexuais (FRANCO & LANDGRAF, 2003; FRAZIER & WESTHOFF, 1991).

Em ZHENG *et al.* (2005), DAVOLI *et al.* (2004), e YECH (1996) podemos ver aplicações como em processos de bio-remediação e produção de biomassa a partir de subprodutos da indústria agro-alimentar e na fabricação de queijos, como os do tipo cheddar, conferindo a coloração alaranjada ao produto.



fonte: Laboratório de Engenharia de Bioprocessos

Figura 1. Fotomicrografia de *Rhodotorula* sp. (40X)

Diversos autores têm estudado a produção dos frutooligossacarídeos por diversos fungos e bactérias, conforme citados em SANGEETHA *et al.* (*Trends in Food Science & Technology*, 2005). E de acordo com estudos realizados no Laboratório de Bioprocessos

(DEA-FEA-UNICAMP), a enzima deste microrganismo mostrou bom potencial de transfrutoseilação e sua aplicação tem sido indicada (HERNALSTEENS, 2006).

2.3 ENZIMAS COM ATIVIDADE DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

A denominação da enzima responsável pela reação de transfrutoseilação ainda é conflitante, em L'HOCINE *et al.* (2000) pode-se encontrar uma discussão sobre as denominações β -D-frutoseiltransferase (EC 2.4.1.9) e a β -frutofuranosidase ou invertase (EC 3.2.1.26), nesse caso, os autores definem a nomenclatura correta como sendo β -D-frutoseiltransferase já que inicialmente a atividade de frutoseiltransferase foi identificada no decorrer da preparação de invertase em altas concentrações de sacarose. Neste mesmo trabalho é feita a purificação dos dois tipos de enzima de *A. niger*, acima citadas.

Em RUBIO *et al.*, (2002) a denominação da enzima de *Rhodotorula glutinis* é feita como invertase e apresenta atividade de transfrutoseilação em concentrações de sacarose a partir de 10%. Trabalhos como os de TOMOTANI & VITOLO (2007) e EMREGUL *et al.* (2006) se referem a aplicação da invertase de fungos imobilizada, para hidrólise da sacarose como medida preventiva a cristalização de açúcares em alimentos processados. CHEN & LIU (1996) a denominaram como β -frutofuranosidase, de *A. japonicus*, cuja concentração ótima de sacarose foi, nesse caso, de 26,6%. YUN, (1996) apresenta para a enzima frutoseiltransferase a faixa de pH ótimo de 5 a 6,5 e de temperatura ótima de 50 a 60°C, sendo que a reação é conduzida em concentrações de sacarose acima de 60%. HIDAKA *et al.*, (1988) e JUNG *et al.*, (1989) constatam que para a β -frutoseiltransferase de *A. niger* a formação de FOS em altas concentrações de sacarose é favorecida, porém a baixas concentrações de sacarose a ação hidrolítica é predominante. CHIANG *et al.* (1997) descrevem a imobilização de uma β -frutofuranosidase de *A. niger* e *A. japonicus* para produção de FOS a partir de meio contendo 50% de sacarose.

Muitos autores como GHAZI *et al.*, (2005) citam a dificuldade de definição da nomenclatura que muda muitas vezes dependendo da fonte de origem. Em ANTOŠOVÁ & POLAKOVIČ (2001), encontra-se uma definição bastante clara entre as duas nomenclaturas. De acordo com esse trabalho, a β -frutofuranosidase apresenta basicamente atividade hidrolítica, mas dependendo da sua origem ela pode exibir significativa atividade de transfrutoseilação. A produção máxima de FOS é observada em altas concentrações de sacarose. Já a β -D-frutoseiltransferase é definida por apresentar baixa atividade hidrolítica e alta atividade de transfrutoseilação e a obtenção de grandes quantidades de FOS ocorre até

mesmo em soluções diluídas do substrato. Em trabalho recente de GHAZI *et al.*, (2006), é discutido que independente da fonte de origem e da denominação, tanto a β -D-frutossiltransferase, quanto a β -frutofuranosidase apresentam tanto a atividade de hidrólise quanto a atividade de transferase, em graus diferentes, mas que limitam a produção de FOS ao uso de altas concentrações de sacarose. A Tabela C do Anexo II apresenta um resumo das informações disponíveis sobre as duas classificações conflitantes desta enzima, obtidas no banco de dados enzimático BRENDA (2007). De acordo com este banco de dados, a única referência ao gênero *Rhodotorula* é feita com a classificação β -frutofuranosidase.

O mecanismo de ação desta enzima depende da fonte; se a fonte for vegetal ou para alguns microrganismos, a ação da enzima ocorre em conjunto com uma série de outras enzimas. Mas em outros casos, sua ação é isolada. A atividade de transferase pode ser resumida como a transferência de um grupo (aldeídico, cetônico, acil, açúcar, fosforil ou metil) de uma molécula para outra, no nosso caso, de grupos frutossil. Até o momento existem 720 enzimas com atividade de transferases identificadas e destas apenas 90 estão disponíveis comercialmente (FABER, 1997; DIXON & WEBB, 1979).

2.3.1 Enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp.

Estudos conduzidos por HERNALSTEENS (2006) no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA-FEA-UNICAMP) com a enzima extracelular de *Rhodotorula* sp. na sua forma livre nos forneceram os dados referentes a enzima livre para efeito comparativo. A cinética enzimática de transfrutossililação obedeceu a equação de Hill (equação 01) sendo os valores obtidos para v_{\max} , $K_{0,5}$ e h respectivamente: 236,1 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$; 299,0 g.L^{-1} e 2,2.

$$v = v'_{\max} \frac{S^h}{K_{0,5}^h + S^h} \quad (01)$$

Mediante aplicação de metodologia de planejamento experimental, a maior atividade enzimática foi obtida em torno do pH 4,0 e 65°C. No entanto foi observado que a maior estabilidade enzimática é obtida em torno do pH 5,0 e em temperaturas inferiores a 60°C. A cinética enzimática não apresentou inibição pela sacarose, mas, de acordo com ALVARADO (2007) observou-se inibição competitiva pela glicose em concentrações acima de 75%. Obteve-se ainda para a enzima livre os valores de meia-vida representados na Tabela 1. De acordo com estes estudos, E_{ad} para a atividade de transfrutossililação foi de 627,88 kJmol^{-1} (R^2 de 0,9374). A Figura A do Anexo I foi obtida por HERNALSTEENS (2006) e demonstra os

perfis apresentados pela enzima na sua forma livre para as duas atividades, de hidrólise e de transfrutossilacção.

Tabela 1. Meia-vida da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. na forma livre

T (°C)	t _{1/2} (h)
60	577,62
66	165,04
68	115,52
70	57,76
72	16,40
75	0,75

Fonte: HERNALSTEENS, 2006

2.4 ENZIMAS IMOBILIZADAS

2.4.1. Aspectos gerais

De acordo com BICKERSTAFF (1997) e ROSEVEAR (1984), imobilização é a técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, prevenindo assim sua migração para o meio, ou fase móvel, onde se encontram o substrato e produto. Este sistema, denominado biorreator, consiste da enzima física ou quimicamente associada a um suporte. De acordo com MESSING (1975) um dos primeiros relatos sobre a utilização de enzimas imobilizadas é de 1916 (Nelson & Griffin; 1916) sobre a imobilização de β -D-frutofuranosidase. Na década de 50 houve considerável difusão dessa técnica, mas foi a partir da década de 70 que houve grande crescimento tanto do número de artigos publicados como do número de patentes registradas referentes ao emprego de enzimas imobilizadas (ROSEVEAR, 1984). Em 1997, estimava-se que existiam cerca de 25000 enzimas na natureza, e destas, 3000 já haviam sido identificadas e apenas 10% encontravam-se disponíveis comercialmente (FABER,1997).

Enzimas são catalisadores de reações e diferentemente da grande maioria dos catalisadores inorgânicos, possuem a vantagem de serem facilmente encontradas na natureza e apresentarem maior atividade catalítica e alta especificidade, além de uma maior sensibilidade ao controle catalítico. Com algumas exceções, a purificação de enzimas de tecidos, frutos, flores etc. é um processo extremamente caro; elas são também sensíveis a solventes, agitação, temperatura, pH, etc. Com base nisso, custo e instabilidade, a imobilização vem em muitos casos atuar como solução e possível aplicação em larga escala.

Uma vez imobilizada, cria-se a possibilidade de uso contínuo, ou seja, bateladas múltiplas de reação para uma única batelada de enzima. Como as enzimas são solúveis, na grande maioria dos casos, é praticamente impossível recuperá-las do meio o que encarece o processo (van-BELIEN & LI, 2002; ARROYO, 1998; ROYER, 1980; DIXON & WEBB, 1979; MESSING, 1975).

Outros materiais particulados, como células (HULST & TRAMPER, 1989; BRODELIUS & MOSBACH, 1982), também podem ser imobilizadas ao invés da enzima, no entanto, estes sistemas apresentam atividade catalítica inferior quando comparadas às enzimas - em grande parte devido a dificuldade de o substrato alcançar o sítio reativo. Além disso, estes sistemas são menos resistentes física e quimicamente e a quantidade de reações que ocorrem em paralelo pode impossibilitar a obtenção de um determinado produto (ROSEVEAR, 1984).

Outro fator relevante à utilização de enzimas imobilizadas é que se estabelece um maior controle sobre o processo, pois torna-se possível parar a reação quando necessário alterando algum parâmetro de reação ou fechando-se a vazão do biorreator, por exemplo, onde não haveria qualquer contaminação do meio com as moléculas. O emprego de enzima livre acarreta a inevitável presença do biocatalisador como parte integrante do meio (se não houver uma etapa de separação da enzima) o que em muitos casos pode gerar alteração de *flavor* e ainda a necessidade de uma nova batelada de biocatalisador como em trabalho conduzido por SANGEETHA *et al.* (*Process Biochemistry*, 2005). Traços de enzima no produto final, em alimentos ou medicamentos, podem ainda, ser um fator de risco, ao desencadear reações alérgicas em seus usuários finais.

Baseando-se em SHULER & KARGI, (1992), podemos apresentar algumas das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas como por exemplo:

- 1- altas concentrações por espaço e alta produtividade por volume,
- 2- reutilização do suporte e redução de custos com o processo contínuo,
- 3- pode, em muitos casos, promover uma melhor performance do biocatalisador,
- 4- não há riscos de mutação genética.

Com base em todos esses argumentos, a imobilização é uma técnica que vem sendo cada vez mais convertida do ambiente laboratorial para o industrial permitindo a automação da produção com um melhor controle da qualidade e redução de espaço físico necessário. Sabe-se, portanto, que não existem técnicas universais ou totalmente eficientes, mas sim uma gama de possibilidades, parâmetros e aplicações.

2.4.2. Métodos de imobilização enzimática

Considerando enzimas solúveis e baseando-se em HARTMEIER (1998), FABER (1997), WISEMAN (1985), ROSEVEAR (1984) e ROYER (1980) os métodos possíveis de imobilização são:

2.4.2.a Retenção física

a) Inclusão: as enzimas são incluídas ou contidas em cavidades interiores ou nas malhas de uma matriz, como por exemplo, géis de colágeno, ágar, alginato, etc. ou fibras. No caso dos géis, a mistura obtida pode ou não ser mecanicamente dispersa em partículas de tamanhos variados. No caso das fibras, estas podem ser confeccionadas em aparatos de certa forma muito parecidos com os de uma indústria têxtil. Exemplo: micro-esferas de alginato em CATANA *et al.* (2005).

b) Microencapsulação: as enzimas são rodeadas por membranas semipermeáveis (permeáveis apenas ao substrato e ao produto). Pode-se encapsular uma variedade de enzimas ao mesmo tempo. Esta técnica pode vir a causar inativação da enzima durante a encapsulação. Por exemplo: cápsulas inertes de matriz de sílica pelo método sol-gel em SOARES *et al.* (2004).

c) Membranas: utilizam-se membranas permeáveis ao produto final e logicamente, não as enzimas. Esta técnica é de grande interesse industrial. Para alguns autores, a imobilização em miscelas encaixa-se neste método. Exemplo: membrana de diálise em GASPARI *et al.* (1999).

2.4.2.b União Química

d) Adsorção: interações químicas fracas entre a enzima e a matriz como: força de van der Waals, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc. Este é o mais simples dos métodos e um dos mais antigos, considerado por muitos autores como uma “imobilização acidental”. Exemplo: imobilização em hidróxido de alumínio gelatinoso por Nelson e Griffin, 1916 citado em ROYER (1980) e MESSING (1975).

e) Forças iônicas: a diferença entre este método e o de adsorção está na força das ligações, sendo este caso a força maior, porém ainda assim bem menor que a ligação covalente. Exemplo: DAEA-celulose em MANOLOV *et al.* (1993)

f) Ligação covalente: são interações mais estáveis que as citadas nas técnicas de adsorção e força iônica; em muitos casos necessita-se de um espaçador entre a enzima e a

matriz, conferindo uma maior mobilidade à enzima. Por exemplo: zircônio e nióbio em CASTRO *et al.* (2000).

a) Efeito quelante: para alguns autores trata-se de uma ligação covalente parcial. Envolve o uso de um componente metálico na ativação da matriz permitindo o acoplamento direto da enzima, como por exemplo: titânio (III) e (IV) e zircônio (IV). A desorção pode ocorrer facilmente. Por exemplo: sílica porosa ativada com cloreto de titânio (IV) em CABRAL *et al.* (1983).

b) Cross-linking: formação de uniões intermoleculares entre as enzimas, gerando ligações irreversíveis e agregados com conformação tridimensional. Essas ligações podem ser apenas entre as enzimas ou entre a enzima e um segundo composto (chamada *co-cross-linking*, como exemplo: a cristalização de enzimas e *co-cross-link* com albumina). O *co-cross-linking* é indicado quando há efeitos difusionais causados pelo *cross-linking*, aplica-se então uma segunda proteína não enzimática como a albumina. Exemplo: glutaraldeído citado em ROSEVEAR (1984).

2.4.2.c Métodos combinados

No caso de um único método ainda não apresentar estabilidade suficiente, pode-se aplicar métodos em seqüência como *cross-linking* da enzima seguido da imobilização ou o *cross-linking* da enzima já imobilizada. Esta prática é indicada pois, evita-se a perda de propriedades mecânicas além de produzirem compostos estáveis a extremos de pH e temperatura. Porém, o uso do *cross-linking* pode causar alterações conformacionais, impedimento dos sítios ativos no centro do agregado, etc. Portanto, cada um dos métodos selecionados necessita ser criteriosamente conduzido. Por exemplo: quitosana e *cross-linking* com glutaraldeído em MANOLOV *et al.* (1993) e suportes aminados e *cross-linking* com glutaraldeído (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

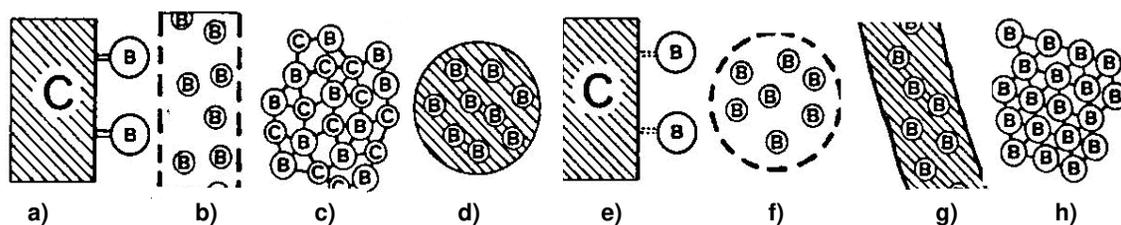


Figura 2. Representação de algumas formas de imobilização enzimática.
a) ligação covalente, b) fibra, c) *co-croscilink*, d) inclusão em esferas de gel,
e) forças iônicas, f) micro-encapsulação, g) inclusão em filme gel, h) *cross-linking*.

De acordo com ARROYO (1998), quanto mais complexo e de maior custo for o método escolhido, mais duradouros e estáveis serão os sistemas obtidos. WISEMAN (1985) afirma que os métodos que envolvem forças de ligação são mais fracos que os de força química. A Tabela 2 nos fornece um resumo relativo aos métodos acima citados:

Tabela 2. Comparação entre os diferentes métodos de imobilização enzimática

Método Característica	Inclusão	Efeito quelante	Corss-linking	Adsorção	Ligação covalente	Força iônica
Preparo	Difícil	Simples	Intermediário	Simples	Difícil	Simples
Força de ligação	Média	Média	Forte	Fraca	Forte	Média
Atividade enzimática	Baixa	Alta	Baixa	Média	Alta	Alta
Regeneração	Impossível	Possível	Impossível	Possível	Difícil	Possível
Custo	Médio	Médio	Médio	Baixo	Alto	Baixo
Estabilidade	Alta	Média	Alta	Baixa	Alta	Média
Aplicabilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Proteção da enzima a taque microb.	Sim	Não	Não	Não	Não	Não

WISEMAN (p. 189; 1985)

2.4.3. Suportes para imobilização

A escolha do suporte deve considerar as seguintes características:

- 1- estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano,
- 2- funcionalidade química,
- 3- durabilidade e capacidade de reutilização
- 4- compatibilidade aceitável com a enzima e substrato,
- 5- custo,
- 6- facilidade de manuseio.

Se a afinidade do suporte com a enzima não for estável o suficiente, pode vir a ocorrer, por exemplo, perda de enzima para o meio ao longo do processo. Ou ainda, se a afinidade da enzima com o suporte for maior do que com o substrato a eficiência do processo estará comprometida. A escolha do suporte deve ser feita ainda considerando-se o tipo do reator, substrato e produto e os parâmetros de processo (LASKIN, 1985).

Os suportes classificam-se em orgânicos e inorgânicos

a) Suportes orgânicos

- polímeros naturais: polissacarídeos como celulose, amido, dextranos, ágar-ágar, agarose, alginatos etc.
- polímeros sintéticos: poliestireno, poliacrilatos, poliacrilamida, álcool polivinílico, etc.

- proteínas : colágeno, albumina, gelatina, seda, etc.

b) Matrizes inorgânicas

- minerais: bentonita, pedra pomes, areia, celite, etc.
- manufaturados: óxidos metálicos, vidro de porosidade controlada, cerâmicas, géis de sílica, etc.

Dentre os suportes orgânicos, a kappa-carragena, quitosana, e alginato são indicados por seu baixo custo, segurança e bom potencial de uso, apesar de apresentarem baixa resistência mecânica. O alginato é uma das matrizes orgânicas mais empregadas conforme citações de HULST & TRAMPER (1989), KUEK & ARMITAGE (1985) e CHEETHAM (1979). Nestes mesmos trabalhos são apresentadas as vantagens de sua utilização: baixo custo, fácil manuseio, boa reprodutibilidade e uniformidade de gel. Mas também a sua desvantagem principal é apresentada: o decréscimo de sua estabilidade mecânica com o tempo de uso (BRUKE, 1984). Outro estudo realizado com alginato define o método como recomendado na hidrólise de sacarose pela enzima inulinase e descreve o procedimento de imobilização da enzima (CATANA *et al.*, 2005) e também a imobilização de micelas de *Aspergillus japonicus* para produção de frutooligossacarídeos (CRUZ *et al.*, 1998). Uma sugestão feita por BRUKE (1984) indica o uso de alginato de bário ou estrôncio ao invés dos comumente utilizados: cálcio e sódio, devido a sua maior estabilidade química uma vez que estes são facilmente sujeitos a agentes quelantes, causando ruptura do gel.

Os suportes inorgânicos permitem maior variação de parâmetros de processo devido a sua maior resistência, química, física, térmica e microbiológica. Num estudo realizado por GASPARI *et al.* (1999) foi realizada a imobilização de inulinase, uma das enzimas utilizadas na obtenção de frutooligossacarídeos, em suportes diferentes como quitina, alginato de sódio e de cálcio, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada. A recomendação nesse caso foi feita apenas para a sílica de porosidade controlada, devido a uma maior estabilidade e resistência física comparada aos outros suportes avaliados; BACIU *et al.* (2005) também utilizou sílica porosa com bons resultados. A sílica pode ser um dos mais indicados suportes inorgânicos, porém, sua grande desvantagem é o custo, como pode ser observado na Tabela 3.

GHAZI *et al.* (2005) aplicou um polímero polimetacrilado (Sephabeads[®] EC) na imobilização de um preparado enzimático comercial contendo frutossiltransferase. Este suporte também foi empregado satisfatoriamente por TANRISEVEN & ASLAN (2005) para obtenção de frutooligossacarídeos e por BRUINS *et al.* (2003) na imobilização de

β -glicosidase de *Pirococcus furiosus*, tendo como substrato a lactose, e também BACIU *et al.* (2005) na imobilização da frutossiltransferase de *B. subtilis*.

Em muitos dos estudos acima citados, os suportes selecionados e indicados não são facilmente disponíveis no Brasil, o que encarece muito o processo e o torna inviável para aplicação nacional. A Tabela 3 apresenta cotação de preços realizada em novembro de 2006 para alguns dos suportes avaliados neste trabalho.

Tabela 3. Cotação de alguns suportes para imobilização enzimática (realizada em 16 de novembro de 2006)

Suporte	Cotação média (\$/kg)
Sílica gel	230,00
Alginato	260,00
Oxicloreto de zircônio	2457,00
Cloreto de zircônio (IV)	800,00
NB340 [®]	50,00

Fonte: Acros Organics, Merck, Vetec, Sigma, CBMM

Compostos sólidos ácidos podem ser empregados como suportes biocatalíticos desde que seus sítios ácidos possam atuar como centros de imobilização capazes de interagir com os grupos amino das enzimas. Trabalhos como o de RESHMI *et al.* (2007) sobre imobilização enzimática em sólidos ácidos são escassos. Neste trabalho, foi avaliado o minério zircônio, mas uma série de outros minérios podem ser empregados.

2.4.3.a Zircônio

O zircônio é um metal azul escuro, refratário com elevada resistência à tração, alta dureza e resistente a corrosão. Embora formas de zircônio fossem conhecidas desde os tempos bíblicos, o químico alemão Klapproth em 1789 isolou o óxido chamando-o de “zirkonertz”. Do radical árabe, o termo “zargun” tem o estranho significado de cor de ouro. É muito empregado em reatores nucleares, lâmpadas para flashes fotográficos, ligas supercondutoras com nióbio, em vidros e cerâmicas, tubos a vácuo e em locais onde agentes corrosivos são aplicados.

Como óxido, ZrO_2 , apresenta força ácida de $H_0 = +1,5$, podendo chegar a até $H_0 = +3,3$. Trata-se de um óxido ácido fraco mas sua aplicação é ampla como catalisador e como suporte catalisador. Como exemplo de sua aplicação na indústria química podemos citar: substituição do hidrogênio por um grupo metil, síntese de α -olefina a partir de um sec-álcool,

isomerização de 1-buteno, formação de 1-buteno e amônia a partir de butanamino, hidrogenização do butadieno, síntese de metanol e iso-buteno, como suporte de MoO_3 para redução de NO com H_2 ; como suporte de Rh para hidrogenização do CO e CO_2 e como suporte de $\text{La}_{0,8}\text{Sr}_{0,2}\text{CoO}_3$ para completa oxidação do propano (TANABE *et al.*; 1989).

O fosfato de zircônio, obtido da zirconita brasileira, tem sua aplicação se tornado cada vez mais crescente, como por exemplo, em diálise renal, como trocador iônico de água de refrigeração de reatores e procedimentos de cromatografia (CLEARFIELD, 1982; MEDEIROS, 1994). Estudos realizados por CASTRO *et al.* (2000) avaliaram o nióbio e o zircônio na imobilização de lípase e os melhores resultados foram obtidos com o zircônio.

Devido a sua alta capacidade de troca iônica, estudos como os de ZAITSEVA *et al.* (2002) e ALFAYA *et al.* (2000) empregam o zircônio juntamente com a sílica sob a forma de um composto sólido obtido pelo método sol-gel a partir do tetrabutóxido de zircônio e do fosfato de zircônio, respectivamente. CABRAL *et al.* (1983), avaliou a imobilização de enzimas como α -amilase de fungos e de bactérias, β -D-frutofuranosidase, papaína e células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes inorgânicos ativados por soluções de sais de metais como o cloreto de zircônio(IV) [ZrCl_4].

Conforme citação em YAMAGUCHI *et al.* (1999), óxido de zircônio pode ser aplicado sob a forma de monocamadas em materiais diversos, compondo um sistema catalítico eficiente. Essa técnica é conhecida como *grafting* ou enxerto, e foi aplicada também com o nióbio em: CHEN *et al.* (2001), PEREIRA *et al.* (2000), YOSHIDA *et al.* (1996), JEHNG & WACHS (1993); DATKA *et al.* (1992). O enxerto de metais em sílica tem grande aplicação em: processos de pré-concentração e análises químicas; suporte para HPLC; sensores eletroquímicos e bio-sensores, como para frutose e glicose em soro sanguíneo (GUSHIKEM & ROSATTO, 2001).

2.4.3.b Nióbio

De acordo com a mitologia grega, Níobe era filha de Tântalo e, como punição por ter comparado sua beleza com a deusa Diana, teve seus 14 filhos mortos a flechadas. Petrificada pela dor, Níobe se transformou em uma rocha (FRANCHINI & SEGANFREDO, 2003). O minério nióbio foi descoberto em 1801 por Charles Hatchett sendo inicialmente denominado columbio (Cb); o nome nióbio foi oficialmente adotado em 1950 pela IUPAC. Estima-se que sua concentração na superfície da Terra seja de 20 ppm e é encontrado naturalmente combinado com o minério tântalo sob a forma de columbite ou tantalite. O Brasil possui a maior reserva natural do mundo e é o maior produtor de nióbio, maior que

Canadá, Nigéria e Zaire. Este minério foi descoberto no Brasil na região de Araxá-MG em 1953 por Djalma Guimarães. Em 1955 foi fundada a Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) e sua produção atual é de 50 tons/mês de ácido nióbio (CBMM, 2006; NOWAK & ZIOLEK, 1999). Outro exemplo de companhia extratora deste minério seria a Companhia Industrial Fluminense fundada em 1912 que começou a explorar nióbio em 1960 no estado de Minas Gerais (CIF, 2006).

Muitos estudos têm sido conduzidos e já existem diversas aplicações para o nióbio, devido a uma série de peculiaridades química e física como:

- em combinação com outros minérios apresenta incrível resistência física,
- é extremamente resistente aos mais agressivos compostos e à corrosão, sendo atacado apenas por ácidos minerais concentrados como HF e HF/HNO₃,
- sob a forma de ácido nióbio (Nb₂O₅.nH₂O) apresenta força ácida equivalente a uma solução de 70% de ácido sulfúrico [H₀ ≤ -5,6] e como NbPO (fosfato de nióbio) sua força ácida equivale a uma solução de 90% do mesmo ácido [H₀ ≤ -8,2],
- a presença de água no meio de reação não afeta sua força ácida, diferentemente da grande maioria dos sólidos ácidos (TANABE *et al.*, 1989; CHEN *et al.* 1984).

De acordo com BORDIGNON *et al.*, (2006); TANABE (2003); NOWAK & ZIOLEK, (1999); TANABE, & OKAZAKI, (1995) e TANABE *et al.*, (1989), as aplicações para o nióbio são atualmente:

a) Efeito promotor: em pequenas quantidades, óxidos de nióbio são adicionados a conhecidos catalisadores promovendo maior atividade catalisadora e seletividade e prolongamento da vida útil do catalisador. Ex: desidrogenação oxidativa de alcanos, ligação oxidativa de metano, remoção de óxido de nitrogênio e *cracking* de cumenos. Ou ainda podem ser aplicados em composição com fibra de celulose como em CAMPOS *et al.* (1996). Todas essas reações são de grande importância na indústria química.

b) Efeito de suporte: óxidos de nióbio podem ser satisfatoriamente empregados como suportes para metais como Ru, Rh, Pt, Re, Ni, Cr, W, Co, V, P, Ge, Mo, Sb, Pb, Bi e Fe. Na indústria química são conhecidas as aplicações em reações como de hidrogenação, síntese de metil isobutil cetona e reações de hidrotratamento.

c) Catalisador sólido ácido: empregado nas indústrias químicas em reações como esterificação, hidrólise, hidratação e desidratação de álcoois, condensação e alquilação.

d) Efeito fotocatalisador e propriedade redox: apresentam propriedades oxidativas e fotosensibilidade empregadas na fotodecomposição da água a H₂ e O₂.

e) Emprego na indústria naval, aeronáutica, automobilística e espacial, produção de aço inoxidável, fabrico de parafusos de alta resistência mecânica, trilhos de trem, tubulações de gás, implantes cirúrgicos, lentes ópticas para instrumentos oftálmicos, produção de diamantes sintéticos e aplicação em aceleradores de partículas subatômicas, dentre outras.

f) Suporte para imobilização de enzimas: MIRANDA (2004) aplicou o nióbio como suporte para imobilização de lipase e obteve bons resultados.

g) Trabalhos como os de FRANCISCO *et al.* (2005), mostram ainda sua aplicação em eletrodos como alternativa a sensores comumente empregados.

2.4.4. Preparo dos suportes inorgânicos para a imobilização

Sabe-se que a maioria dos suportes empregados em imobilização por ligações covalentes não apresenta a capacidade de reação direta com a enzima. Nesses casos, faz-se necessário um procedimento de ativação da matriz antes de realizar a imobilização da enzima, procedimento este muitas vezes conduzido sob condições severas e uso de reagentes tóxicos (SOARES, 2000; LAM & MALIKIN, 1994; ROSEVEAR, 1984; ROYER, 1980).

2.4.4.a Silanização

A silanização com γ -aminopropiltrietóxisilano (γ -APTS) é muito empregada no preparo da sílica (SOARES, 2000) para imobilização de enzimas e foi também empregado por MIRANDA (2004) no preparo do nióbio. De acordo com Janolino & Swaisgood e Manjón & Iborra (em BICKERSTAFF; pp. 21-26 e 41-51; 1997) a silanização produz ao final, grupos funcionais ligados a superfície inorgânica do suporte por ligações covalentes estáveis. Após a silanização da sílica, observa-se mudança de coloração para vermelho-vivo, devido aos grupos adicionados a superfície do suporte.

2.4.4.b Ativação

A ativação do suporte pode ser conduzida em seqüência a silanização ou de forma isolada, sendo o glutaraldeído um dos compostos mais amplamente utilizado para se estabelecer uma ponte os grupos amino formados pela silanização e o resíduo de ligação da enzima. Em ARICA *et al.* (1995) a ativação foi feita com epicloridrina e em LÓPEZ-GALLEGO *et al.* (2007) é feita menção ao uso de glioxil ou epóxi ao invés de glutaraldeído. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeído na ativação é que são formados grupos moderadamente afastados da superfície do suporte o que evita, de certa forma, o impedimento estérico da enzima além do que, a reação é altamente reversível. A reação com glutaraldeído é normalmente conduzida em pH 7,0 como forma de evitar a

polimerização deste composto e após a ativação, o suporte deve ser lavado para retirar excesso de reagente que possa vir a se polimerizar com a enzima (MIRANDA, 2004). Nesta etapa a coloração da sílica que já tenha sido silanizada muda de vermelho-vivo para amarelo. Estudos como os de AZEVEDO *et al.* (2004) tem verificado a influência do grau de ativação de um suporte no desempenho do biocatalisador imobilizado.

2.4.5. Imobilização

O complexo enzima-suporte é obtido mediante uma suspensão da enzima em solução tampão adequada e o suporte. A polimerização, no caso dos suportes orgânicos, ocorre por mudança de temperatura ou adição de algum reagente químico. Este tipo de imobilização requer um controle rigoroso das condições de reação e ativação e a certeza de que a natureza química do suporte escolhido não afetará os grupos reativos da enzima (ARROYO, 1998; HULST & TRAMPER, 1989). A kappa-carragena, por exemplo, necessita ser aquecida a temperaturas superiores a 37°C e imediatamente resfriada, o que em muitos casos pode interferir na atividade da enzima, além de não formar cápsulas esféricas como o alginato e necessitar de molde (HULST & TRAMPER, 1989; BRUKE, 1984).

Quando a imobilização se dá devido a união química, como no caso das matrizes inorgânicas em um processo de imobilização por ligações covalentes conforme descrito por MATEO *et al.* (2002), a imobilização ocorre em duas etapas, a primeira delas é caracterizada por adsorção da enzima ao suporte, favorecida pela agitação suave do sistema; e a segunda, mais lenta e específica, é geralmente realizada em condições estáticas quando se dá a formação das ligações covalentes. Este tipo de imobilização é chamado de imobilização não-orientada. Estudos revelam que a não-orientação não leva necessariamente a uma ótima estabilidade conformacional da enzima (WILCHEK & MORIN, 2003; WHEATLEY & SCHIMIDT, 1999; COLEMAN *et al.*, 1990; SMALLA *et al.*, 1988; GUIÁN, 1988; MELANDER *et al.*, 1984).

GUIÁN (1988) e LÓPEZ-GALLEGO *et al.* (2007), sugerem que seja adicionada uma terceira etapa que confere maior estabilidade ao promover uma multi-interação da enzima com o suporte. A formação de ligações do tipo covalente confere estabilidade terciária à enzima, muitos autores defendem que a estabilização quaternária só é obtida com a adição de metodologias de pós-imobilização que evita o primeiro passo da inativação enzimática, a dissociação de suas subunidades livres. O processo orientado deve, no entanto, ser cauteloso, pois, a multi-interação pode vir a causar perda ainda maior de atividade ao se dificultar o acesso do substrato aos sites catalíticos (WILCHEK & MIRON, 2003).

Enzimas ligadas em pontos múltiplos a um suporte tendem a ser mais estáveis a alterações conformacionais induzidas pelo aumento da temperatura ou presença de solventes no meio. A grande maioria das enzimas apresenta muitos resíduos de lisina em sua superfície e normalmente, estes resíduos não estão envolvidos em seus sites catalíticos. Aliado a isso, esses amino grupo superficiais são polares e estão normalmente expostos ao meio além de serem extremamente reativos em sua forma não protonada. Essas características sugerem que as múltiplas ligações da enzima ao suporte envolvam os grupos ϵ -NH₂ dos resíduos de lisina e terminais-NH₂. O ideal é que todos os resíduos da enzima permaneçam em uma posição ideal, mesmo após a multi-interação (MATEO *et al.*, 2002; GUIÁN, 1988).

De acordo com a teoria, na ausência de qualquer outro efeito promotor para a formação de ligações covalentes, a presença de um determinado sal pode aumentar consideravelmente a retenção de uma proteína imobilizada em um suporte. Essa técnica é muito aplicada em cromatografia, onde a proteína já imobilizada é submetida a gradientes de sal que promoverão uma maior fixação ou estabilidade ao sistema, evitando assim adsorção indesejada (WHEATLEY & SCHIMIDT, 1999; COLEMAN *et al.*, 1990; SMALLA *et al.*, 1988; MELANDER *et al.*, 1984). É indicado também que a imobilização seja conduzida em condições de saturação de substrato, produto ou outro inibidor, dessa forma, o sítio de interesse da enzima estará protegido e não será utilizado na imobilização, já que o processo de imobilização em si não é seletivo quanto aos sítios utilizados (WOODWARD, 1985).

2.4.6. Efeitos da imobilização

O suporte e a enzima não são superfícies complementares e logo após a primeira ligação entre eles, a enzima perde flexibilidade. Quando a enzima está em solução, ela se comporta como qualquer outra molécula dispersa no meio e tem total liberdade de movimento e acesso ao substrato, o que não é possível quando esta enzima está imobilizada em um suporte físico (BICKERSTAFF, 1997). Isso com certeza afetará, de alguma forma, a eficiência do processo, como citado por CABRAL, *et al.* (1993) onde a ação da enzima frutossiltransferase na obtenção de frutooligossacarídeos é relativamente menor sob a forma imobilizada do que livre no meio. Ou ainda, estudos como o de MANOLOV *et al.* (1993), no qual a enzima pululanase imobilizada em quitosana apresentou o mesmo valor de pH ótimo, comparada com a sua forma livre; já com relação a temperatura, a imobilização causou uma diminuição de 5°C no valor ótimo. Mas esses efeitos não devem ser encarados como um fracasso da metodologia e sim avaliados e considerados no processo como um

todo, mais uma vez cabe ressaltar que não existe um método totalmente eficaz para nenhuma enzima ou suporte (HARTMEIER, 1998; FABER, 1997; WISEMAN, 1985; ROSEVEAR, 1984; ROYER, 1980).

Após a imobilização, a enzima se vê envolta e presa a um sistema heterogêneo e drasticamente diferente do ambiente onde ela é naturalmente encontrada e no qual todos os componentes do sistema podem de alguma forma interferir em sua atividade (ARROYO, 1998; WISEMAN, 1985). O pior efeito seria a total inativação da enzima durante o processo de imobilização. O ideal é que ocorrendo a inativação, ela seja em proporções mínimas; MESSING (1975) recomenda que essa proporção não ultrapasse 20% das enzimas viáveis do reator, ou seja, o autor define como viável uma metodologia que apresente uma eficiência de imobilização de até 80%. É um grande risco supor que após a imobilização todas as enzimas estarão perfeitamente viáveis.

O importante é conhecer quanto de enzima efetivamente ativa está disponível no sistema. A alteração da atividade da enzima pode ser afetada durante o processo de imobilização ou durante o uso do biorreator. ARROYO (1998) e ROYER (1980) citam os tipos de efeitos que podem interferir na eficiência do processo:

- a) efeitos difusivos = dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima devido a forma como a enzima está ligada ao suporte. Com relação a cinética de reação, observa-se que normalmente, v_{max} não altera seu valor em grandes proporções, mas o valor de K_m aumenta consideravelmente. Isso pode ser explicado pela dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima;
- b) efeitos do tamanho do substrato = ocorrem quando o substrato tem peso molecular muito elevado e não consegue se locomover de forma adequada até o sítio ativo, como no caso de suporte de porosidade não compatível com o tamanho da molécula do substrato;
- c) efeitos de difusão externa = quando o transporte do substrato pelo biorreator gera camadas estagnadas ou ainda, quando o tampão escolhido não permite total difusão do substrato;
- d) efeitos eletrostáticos = quando o substrato e a matriz insolúvel apresentam a mesma carga líquida, ocorrerá a repulsão do substrato, impedindo assim a atuação da enzima; ou ainda quando há repulsão específica entre a matriz e o substrato;
- e) efeitos estéricos = ocorrem quando há mudança na conformação da enzima ou em sua natureza química devido a algum elemento da metodologia ou devido ao fato da ligação ocorrer em sítios que comprometam a atividade enzimática;

- f) efeitos de contorno ou microambiente = influência negativa do suporte ou de algum componente do sistema como por exemplo, competição pelo substrato ou alteração de pH causada pelo suporte levando a hidrólise do substrato.

KASCHE (1983) define ainda que o ideal para um sistema imobilizado seria um tempo de conversão do substrato em produto muito próximo do valor obtido com a enzima livre. A imobilização da enzima no suporte selecionado deve, ao final, manter ao máximo a afinidade desta por seu substrato com mínima degradação do sistema e ampliar os parâmetros e possibilidades de aplicação (ARROYO, 1998; MESSING, 1975). Uma metodologia ideal de imobilização permitirá, portanto:

- uma distribuição homogênea deste biocatalizador no suporte,
- restrição da mobilidade devido a sua insolubilização,
- uso biotecnológico em reatores e seu reaproveitamento.

A imobilização de uma proteína pode, portanto, causar alterações em seu estado nativo, reduzindo conseqüentemente, sua atividade nos mais diferentes graus. A preservação da conformação ideal da enzima é de grande interesse quando se trata da sua imobilização e aplicação em biorreator. Conforme discutido anteriormente, a imobilização orientada da enzima pode aumentar consideravelmente a estabilidade do sistema, porém se sítios reativos importantes forem utilizados pontos de ligação a atividade enzimática estará seriamente comprometida. Muitos autores nesse caso sugerem que a imobilização seja conduzida em condições saturadas de substrato, produto ou outro inibidor protegendo assim que sítios importantes sejam inutilizados (WILCHEK & MIRON, 2003; WOODWARD, 1985).

Com base em todos esses argumentos, o complexo enzima-suporte necessita ser avaliado quanto a interferência de sais ou quanto ao seu comportamento em diferentes pH, temperatura e substrato (GHAZI *et al.*, 2005; TANRISEVEN & ASLAN, 2005; CATANA *et al.*, 2005; COBOS & ESTRADA, 2003). A ligação da enzima ao suporte ocorre em meio a diversos tipos de interações, como já foi discutido anteriormente, e estes grupos de ligação e/ou os grupos reativos reagem de forma diferenciada frente à presença de determinados sais e prótons, uma vez que trata-se de um sistema bioativo e não inerte.

2.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

2.5.1. Aspectos gerais

Baseando-se em DORAN (2002); BLANCH & CLARK (1997); SHULER & KARGI (1992) e DIXON & WEBB (1979), a cinética de grande número de enzimas pode ser predita

pelo modelo matemático de Michaelis & Menten. Neste tipo de modelo, encaixam-se as reações onde há saturação a um determinado valor de substrato oferecido, ou seja, não há incremento na velocidade de reação independente do aumento de substrato. Porém, quando a partir de um determinado valor, a quantidade de substrato causa inibição na velocidade de reação, o modelo pode ser predito pela equação 01:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i} \right) + K_m} \Leftrightarrow \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[S]}{K_i} + \frac{K_m}{[S]}} \quad (01)$$

Para altas concentrações de substrato, tem-se que $1 + \frac{[S]}{K_i} \gg \frac{K_m}{[S]}$, e a equação 01

torna-se inversamente dependente da concentração do substrato assumindo a forma:

$v = \frac{v_{\max}}{1 + [S]/K_i}$. No intervalo em que [S] é menor que o valor da constante de inibição, K_i , a

equação assume a forma predita pelo modelo de Michaelis-Menten podendo-se assim obter os parâmetros v_{\max} e K_m . O ponto onde a primeira derivada é nula indica o valor S^* correspondente ao ponto de inflexão que possibilita o cálculo de K_i , uma vez que:

$$y = \frac{ax}{b + x + x^2/c} \Rightarrow \frac{dy}{dx} = \frac{a(b - x^2/c)}{(b + x + x^2/c)^2}, \text{ podemos aplicar a equação 02 obtendo ao final:}$$

$$\frac{dv}{dS} = 0 \Rightarrow S^* = \sqrt{K_m \cdot K_i} \quad (02)$$

Os parâmetros cinéticos podem ser obtidos através dos dados experimentais por métodos de linearização como os de Lineweaver-Burk ou Eadie-Hofstee. Cada um destes métodos apresenta seus limites e indicações.

a) Equação de Lineweaver-Burk (*J. Amer. Chem. Soc.*; 56; 658; 1934, citado em: DIXON & WEBB, 1979). Mesmo sendo o método mais empregado, sua precisão é indicada apenas para altos valores de substrato e para o cálculo de v_{\max} .

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (03)$$

A regressão linear obtida é do tipo: $\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{S} + b$, onde a inclinação da reta corresponde ao termo $\frac{K_m}{v_{\max}}$ e a intersecção com o eixo y o valor $\frac{1}{v_{\max}}$.

b) Equação de Eadie-Hofstee (*J. Biochem.*; 26; 1406; 1932, citado em: DIXON & WEBB, 1979). Este tipo de linearização é mais indicado para o cálculo de K_m pois suaviza as imprecisões a baixas concentrações de substrato, porém apresenta as duas variáveis de importância no eixo x:

$$v = -K_m \cdot \frac{v}{[S]} + v_{\max} \quad (04)$$

A regressão linear obtida é do tipo: $v = -a \cdot \frac{v}{S} + b$, onde a inclinação da reta equivale a K_m e a intersecção a v_{\max} .

2.5.2. Cinética de desnaturação/desativação e meia-vida

As enzimas são macromoléculas de proteína com uma configuração complexa, porém, susceptíveis a desestabilização até mesmo por forças fracas. A desativação enzimática ou até mesmo a desnaturação ocorre em diferentes taxas e por diferentes causas e são dependentes das condições do meio como pH, forças iônicas e mecânicas, diversas substâncias etc. Muitas vezes, a cinética de desativação/desnaturação pode ser tão ou mais importante que a cinética da reação em si (DORAN, 2002; CORNISH-BOWDEN, 1995).

Considerando um modelo de primeira ordem de desnaturação enzimática, pode-se escrever:

$$\frac{-dU_t}{dt} = r_d = k_d \cdot U_t \quad (05)$$

onde r_d corresponde a taxa de desnaturação (U/t), U_t é a atividade enzimática num determinado momento e k_d é a constante da taxa de desnaturação ($1/t$). Por integração, obtemos:

$$U_t = U_{t_0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (06)$$

sendo U_{t_0} a atividade enzimática inicial e U_t a atividade após um período de tempo t . Observa-se portanto que a atividade enzimática decresce de forma exponencial em função do tempo.

Um parâmetro imprescindível quando se avalia a estabilidade enzimática é a meia-vida, $t_{1/2}$, que corresponde ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura, para que a enzima imobilizada tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial. Com base em DIXON & WEBB (1979) e partindo-se da equação 06 temos:

$$\ln\left(\frac{U_t}{U_{t_0}}\right) = -|k_d| \cdot t, \text{ por definição: } t_{1/2} \left[\frac{U_t}{U_{t_0}} = 0,5\right], \text{ logo:}$$

$$\ln(0,5) = -|k_d| \cdot t_{1/2} \Rightarrow t_{1/2} = \frac{0,6931}{k_d} \quad (07)$$

As equações 07 e 09 combinadas entre si, possibilitam uma nova relação matemática entre a meia-vida e a temperatura, expressas pela equação 08.

$$t_{1/2} = \frac{0,6931}{A_d} \left[e^{\left(\frac{E_{ad}}{R} \right) \left(\frac{1}{T} \right)} \right] \quad (08)$$

O estudo da dependência da temperatura sobre a estabilidade enzimática, expressa pela meia-vida, muitas vezes esbarra em certas dificuldades como um pequeno intervalo de temperatura disponível para execução dos experimentos. A solução adequada em muitos casos é a extrapolação dos valores a partir de uma equação até a faixa desejada. Dessa forma, partindo-se da equação 08, pode-se prever a estabilidade enzimática em temperaturas fora da faixa de temperaturas avaliadas (DIXON & WEBB, 1979).

2.5.3. Efeito da temperatura

2.5.3.a Considerações gerais

Quando a temperatura do meio onde a enzima se encontra permanece na faixa considerada ideal para a sua estabilidade, suas moléculas ocuparão uma distribuição conformacional específica, mas com o aumento da temperatura essa distribuição deixa de existir afetando inclusive a afinidade pelo substrato uma vez que a habilidade de mover-se até o substrato faz parte da sua funcionalidade. Se a temperatura é muito baixa, a enzima move-se com muita dificuldade até o substrato e a catálise praticamente não ocorre; da mesma forma, se a temperatura é muito alta perde-se a estrutura ideal e não há mais encaixe específico com o substrato (FIELDS, 2001; DIXON & WEBB, 1979).

A estabilidade molecular é apenas uma parte da relação entre a função enzimática e temperatura; a enzima consegue manter um determinado nível de flexibilidade para cada faixa de temperatura e modifica-se ao máximo permitido em busca da estabilidade, como por exemplo, deletando ou substituindo alguns aminoácidos. Mas sabe-se que a adição de sais ou outros “estabilizantes” também podem contribuir para a manutenção da estabilidade (FIELDS, 2001; THOMPSON & EISENBERG, 1999). Observa-se que a desnaturação na maioria das enzimas é muito mais rápida que a ativação pela temperatura. De acordo com SHULER & KARGI (1992), o aumento de 10°C na fase de ativação resulta no incremento da velocidade de reação de 1,8 vezes, porém na fase de desnaturação a redução pode ser de

até 41 vezes. De acordo com DORAN (2002), E_{ad} normalmente assume valores elevados para a maioria das enzimas, entre 170 e 400 kJmol^{-1} .

2.5.3.b Arrhenius

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática é de extrema importância, tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada. Em baixas temperaturas, observa-se um aumento proporcional entre velocidade de reação e temperatura, mas a partir de um determinado ponto a velocidade de reação diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura. O ponto de transição entre estas duas inclinações corresponde à temperatura ótima para reação enzimática. A fase de aumento proporcional é determinada de fase de ativação térmica, e a fase de declínio trata-se da inativação térmica ou desnaturação térmica. Ambas podem ser matematicamente expressas de acordo com a equação predita por Arrhenius:

$$k_d = A_d \cdot e^{-E_{ad}/RT} \quad (09)$$

definindo o subscrito “a” como referente a fase de ativação enzimática e “d” referente a desativação ou ativação da desativação, podemos reescrever a equação 09 de acordo com a fase a que faz referência. Portanto, k_a e k_d corresponderiam a constante de ativação ou de desnaturação; A_a e A_d equivaleria a constante de Arrhenius e E_a e E_{ad} a energia requerida para promover a ativação térmica ou a ativação da desnaturação; R a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta (CORNISH-BOWDEN, 1995).

Os dados experimentais obtidos durante acompanhamento da estabilidade enzimática podem ser linearizados de acordo com metodologia proposta por Arrhenius. Esta metodologia tem sido aplicada em estudos enzimáticos como os de CATANA *et al.* (2007) e COBOS & ESTRADA (2003) e consiste em estabelecer graficamente a relação $\ln(k_d)$ versus $1/T$ partindo-se da equação 09, obtendo assim uma regressão linear dos pontos experimentais (equação 10). Esta regressão permite o cálculo direto do valor E_{ad} através da inclinação da equação obtida.

$$\ln(k_d) = \left[-\frac{E_{ad}}{R} \right] \cdot \frac{1}{T} + \ln(A_d) \quad (10)$$

2.5.3.c Parâmetros D e z

É comum quando se trabalha com enzimas para aplicação industrial, expressar sua inativação através de parâmetros muito difundidos na área microbiológica como D e z (JAY, 1992). O valor D, ou tempo de redução decimal, é numericamente igual ao tempo em minutos necessários para que uma curva de estabilidade enzimática ou de sobrevivência de microrganismos apresente a redução de um ciclo log, ou seja, que a estabilidade enzimática

seja reduzida a 10% do valor inicial. Partindo-se da equação 07, substituindo t por D e considerando $U/U_0 = 0,1$ obtemos a equação 11 que define matematicamente uma função para o cálculo de D a partir do valor de k_d .

$$D = \frac{2,3026}{k_d} \quad (11)$$

Enquanto o valor D representa a resistência a uma determinada temperatura, o valor z é expresso em °C e equivale a resistência relativa em diferentes temperaturas e permite o cálculo de binômios tempo/temperatura equivalentes entre si. Este parâmetro indica o intervalo em que a temperatura sendo aumentada, gera a redução de 1 ciclo log na atividade enzimática. Este valor pode ser obtido graficamente da relação gráfica $\log(D)$ versus temperatura. A equação da regressão linear dos pontos permite o cálculo de z, de acordo com a equação 12, pelo inverso da inclinação.

$$(x_2 - x_1) = \frac{(y_1 - y_2)}{a} \Rightarrow z = \frac{1}{a} \quad (12)$$

2.5.4. Efeito do pH

As enzimas apresentam grupos iônicos específicos em seus sítios ativos sensíveis a variações do pH do meio, resultando em mudanças na sua forma iônica o que se reflete diretamente na atividade enzimática. Essas mudanças podem inclusive interferir na conformação tridimensional da enzima ou em sua afinidade pelo substrato. De acordo com CORNISH-BOWDEN (1995), SHULER & KARGI (1992) e DIXON & WEBB (1979), existe uma zona de máxima estabilidade, não necessariamente próxima ao ponto isoelétrico contendo um valor de pH caracterizado como o ótimo para atividade enzimática. O estudo da dependência do pH é de grande importância, pois pode deduzir a natureza química dos grupos enzimáticos que participam da cinética. No entanto, muitos autores alertam para a interpretação dos dados de pH e sua influência na cinética, uma vez que os pontos de ionização podem ser deslocados dependendo das características do meio ou do suporte.

Em SHULER & KARGI (p. 76; 1992), podemos encontrar uma definição para a cinética de enzimas na forma ionizada como:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{K_1}{[H^+]} \right) + [S]} \quad (13)$$

Ao estar imobilizada em um suporte que contenha grupos funcionais ionizados, a enzima certamente apresentará alguma alteração quando comparada a sua forma nativa, uma vez que esses grupos ionizados afetam a concentração de íons H^+ nas proximidades do

local onde a enzima encontra-se. BLANCH & CLARK (1997) e SHULER & KARGI (1992) demonstram a diferença entre o pH interno e externo ao micro-ambiente da enzima imobilizada pela equação 14:

$$\Delta pH = pH_{int} - pH_{ext} = 0,43 \cdot \frac{ZF\Psi}{RT} \quad (14)$$

sendo Z a valência ou carga do suporte, F a constante de Faraday, Ψ o potencial eletrostático (se $\Psi < 0$, suporte carregado negativamente). Portanto, dependendo do potencial eletrostático, o pH do micro-ambiente da enzima imobilizada pode ser diferente do pH do meio de solução. Suportes carregados negativamente apresentam uma concentração de íons hidrogênio muito maior em sua proximidade do que no meio de solução. Uma consequência muito importante disso é que o perfil de pH da enzimática imobilizada em suportes com cargas negativas tende a ser deslocada para valores de pH mais alcalinos.

TANRISEVEN & ASLAN (2005) observaram que a imobilização de um preparado enzimático, contendo atividade de transfrutossilação, em um suporte acrílico ativado modificou a curva de pH ótimo da enzima. A enzima livre apresentou maior atividade na faixa de pH entre 5,5 e 6,5 já a enzima imobilizada apresentou uma faixa mais abrangente, de 4,5 a 7,0. Já MIRANDA (2004) obteve com a imobilização da lipase em nióbio um deslocamento do valor de pH ótimo de 8,0 para 7,0.

Em trabalho de SANJAY & SUGUNAN, (2006), encontramos uma discussão sobre a alteração do pH ótimo de enzimas imobilizadas em matrizes carregadas negativamente. De acordo com os autores, ocorre normalmente o deslocamento do pH ótimo para valores mais básicos e o perfil de pH é estendido ou ampliado devido as interações de cargas do suporte e da enzima. Porém, os autores observaram que a enzima imobilizada por ligações covalentes apresentou pH ótimo numa faixa mais ácida do que a da enzima livre, provavelmente devido as fortes ligações covalentes formadas. A intensidade da força de ligação interfere nas interações intra-moleculares da enzima modificando sua conformação. Porém, um valor mais ácido para o pH ótimo apresentou o inconveniente de uma baixa estabilidade enzimática.

2.5.5. Termodinâmica de desnaturação enzimática

De acordo com CORNISH-BOWDEN & CÁRDENAS (2004), organismos vivos são sistemas químicos distantes do equilíbrio termodinâmico, e basear-se apenas nos conceitos termodinâmicos para entendê-los nem sempre é aconselhável. A compreensão dos valores

da energia livre ou da entalpia, por exemplo, pode ter muito a dizer sobre um processo, assim como as constantes cinéticas que são mais comumente analisadas.

2.5.5.a Energia Livre de Gibbs

A energia livre de Gibbs, (ΔG), de uma enzima é diferente para cada estado: forma nativa e forma desnaturada, e indica quanto da conformação inicial ainda está preservada ou ativa. A desnaturação só ocorre quando $\Delta(\Delta G)$ assume valor negativo, indicando que o estado atual apresenta menos energia disponível, devido a desnaturação, quando comparado com o estado inicial (MODELL & REID, 1983; DORAN; 2002).

Com base na teoria da transição de estado, que desconsidera o mecanismo de interação entre as moléculas envolvidas numa cinética enzimática, a colisão entre essas moléculas fornece energia suficiente para romper uma barreira. Essa barreira trata-se da energia de ativação para que a reação ocorra, e pode ser determinada através dos valores experimentais das taxas de reação obtidas em diferentes temperaturas. De acordo com BLANCH & CLARK (1997), a constante k é proporcional a concentração das espécies em estado de transição, de acordo com a equação clássica para esta teoria:

$$k = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \cdot K^\pm \quad (15)$$

sendo as constantes k_B de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), h de Planck's ($11,04 \cdot 10^{-36} \text{ Jmin}$) e K^\pm

de concentração de equilíbrio. Com relação a K^\pm e a sua definição, $K^\pm = \frac{[ES]^\pm}{[E][S]}$, pode-se

assumir esta constante como a própria constante de equilíbrio da reação e ainda, buscando na termodinâmica a definição da energia livre de Gibbs padrão temos:

$$\Delta G^\pm = -RT \ln \left[K^\pm (c^\circ)^{-1} \right] \quad (16)$$

sendo R a constante dos gases ideais ($8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e fazendo c° , a concentração de estado padrão, igual a 1, e definindo k como a constante de desnaturação da enzima k_d , a equação 15 em combinação com a equação 16 resulta na equação 17:

$$k_d = \left(\frac{k_B T}{h} \right) e^{(-\Delta G^\pm / RT)} \Rightarrow \Delta G = -RT \ln \left(\frac{k_d \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (17)$$

A variação de ΔG de um estado para outro prediz a taxa de reação, por exemplo: o aumento da concentração de substrato ligado aos sítios ativos da enzima diminui a energia livre do sistema, ou ainda, a desnaturação da enzima diminui a disponibilidade de sítios

reativos. Diz-se, portanto, que a energia livre de Gibbs é composta pela energia de ligação e a energia de ativação (BLANCH & CLARK, 1997; DIXON & WEBB, 1979).

2.5.5.b Entalpia

Entalpia (ΔH) é uma forma de energia chamada de função de estado por depender basicamente do estado em que a variável se encontra e não do caminho percorrido até o estado atual. Por esse motivo, a variação da entalpia de um processo é medida hipoteticamente tomando etapas da reação. Quando a etapa final absorve muito mais energia do que o estado inicial, o valor de ΔH será positivo - o que normalmente acontece em processos de desnaturação enzimática (DORAN, 2002; MODELL & REID, 1983).

Dos conceitos de termodinâmica, obtemos a relação entre a energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, conforme equação 18:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S.T \quad (18)$$

Conhecendo a equação 17, podemos substituir ΔG e obter a equação 19:

$$k_d = \frac{k_B \cdot T}{h} e^{-\frac{\Delta H + \Delta S.T}{R.T}} = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta H}{R.T}} \cdot e^{\frac{\Delta S}{R}} \quad (19)$$

Para resolução desta equação, deve-se assumir que ΔS não varia com a temperatura; e conforme demonstrado em DIXON & WEBB (1979):

$$\frac{d \ln k_d}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H}{RT^2} = \frac{\Delta H + RT}{RT^2} \quad (20)$$

Esta equação pode ser comparada com a equação empírica de Arrhenius (eq. 09):

$$\frac{d \ln k_d}{dT} = \frac{E_{ad}}{RT^2} \quad (21)$$

Em combinação, as equações 20 e 21 fornecem a equação final para cálculo da entalpia através da energia de ativação da desnaturação:

$$\frac{E_{ad}}{RT^2} = \frac{\Delta H + RT}{RT^2} \Rightarrow \Delta H = E_{ad} - RT \quad (22)$$

2.5.5.c Entropia

A entropia (ΔS) de um sistema aumenta com o aumento da temperatura, indicando que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem, além de ocorrer a quebra de números consideráveis de ligações fracas como pontes de hidrogênio. Os grupos polares vão perdendo a capacidade de ordenar as moléculas de água e a liberdade dos grupos apolares expostos pelo desdobramento da proteína aumenta o sentido de desordem (DORAN, 2002; MODELL & REID, 1983).

Voltando a equação 18, podemos obter a relação o cálculo da entropia através dos valores de entalpia e energia livre:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (22)$$

2.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE LARGA ESCALA

O design de um biorreator requer informações sólidas sobre a cinética enzimática e as características do suporte envolvido (SHULER & KARGI, 1992; BLANCH & CLARK, 1997). A Figura 3 apresenta alguns exemplos de biorreatores para utilização de enzimas imobilizadas.

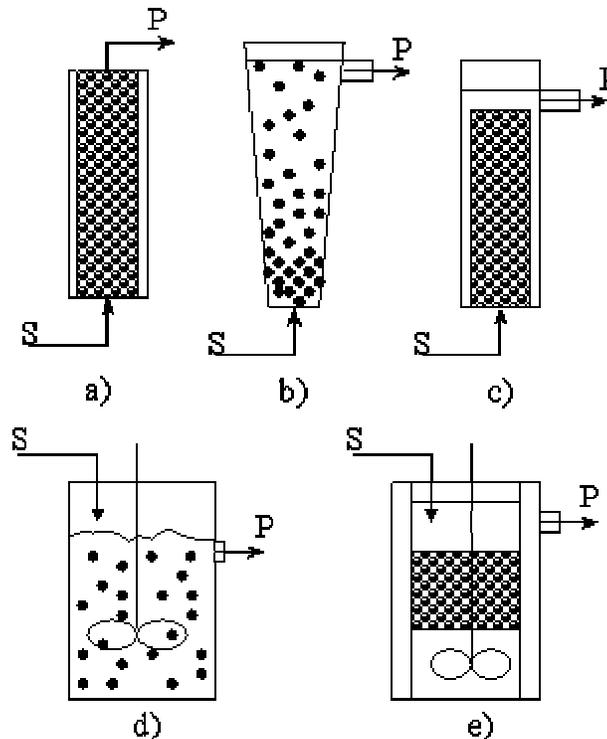


Figura 3. Representação de alguns tipos de reatores para aplicação de enzimas imobilizadas: a) leito fixo, b) leito fluidizado, c) leito expandido, d) tipo mistura, e) tipo cesto

Os biorreatores em forma de colunas ou leitos, normalmente verticais, são quase que exclusivamente empregados no caso de enzimas imobilizadas. Dentre este tipo podemos citar os reatores de leito fixo, de leito fluidizado, de fibra oca, etc. No caso do biorreator de leito fixo (Figura 3.a), as partículas contendo o biocatalisador têm sua mobilidade reduzida e limitada por telas ou fibras, diferentemente do leito fluidizado (Figura 3.b) por exemplo, que

se que tem liberdade de expansão de acordo com a vazão. Essa característica, de nenhuma ou pouca mobilidade das partículas, evita que a vazão do fluido de reação ou atrito danifique a estrutura do suporte ou favoreça o desprendimento da enzima. As partículas de suporte empregadas devem apresentar compressibilidade apropriada com o tamanho da coluna e pressão de vazão para que não haja perda de leito (DORAN, 2002; SHULER & KARGI, 1992).

Conforme discutido em itens anteriores, as enzimas são mais sensíveis e em alguns casos mais caras que os catalisadores não biológicos, além de necessitarem de uma série de estudos em paralelo que possam aumentar sua estabilidade e atividade. No entanto, sua aplicação em larga escala tem aumentado desde o primeiro processo industrial utilizando enzima imobilizada creditado a Chibata *et al.* em 1979 pela Tanabe Co. no Japão (citado em ROYER, 1980). Dessa forma, fatores primários como (1) custo da enzima, (2) custo da imobilização, (3) operação do sistema, (4) capital a ser investido, (5) custo de manutenção/limpeza, são fundamentais ao se planejar a operação (LASKIN, 1985; van-BELIEN & LI, 2002).

Várias são as recomendações e expectativas ao se definir um sistema com enzima imobilizada, um roteiro definido pelo WORKING PARTY ON BIOCATALYSTS (1983), por exemplo, auxilia e indica as principais recomendações para um novo sistema com um biocatalizador imobilizado. De acordo com este trabalho, um sistema de enzima imobilizada é caracterizado por:

1-Descrição geral

- a) Esquema de reação
- b) Enzima a imobilizar
- c) Tipo de matriz empregada
- d) Método de imobilização

2- Preparação

- a) Condições de reação
- b) Rendimento em peso seco
- c) Atividade residual do sobrenadante

3- Caracterização físico-química

- a) Configuração do biocatalizador
- b) Grau de preenchimento
- c) Compressibilidade da
coluna/biorreator
- d) Velocidade mínima de fluidização

4- Cinética

- a) Estabilidade do sistema armazenado
- b) Estabilidade operacional
- c) Possibilidade de reutilização
- d) Limitações operacionais

3. METODOLOGIA

3.1. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1.1. Produção da enzima

3.1.1.a. Microrganismo

O microrganismo *Rhodotorula* sp. (Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, DEA-FEA-UNICAMP) isolado de flores da Mata Atlântica brasileira por HERNALSTEENS (2006) foi a fonte produtora da enzima. Este microrganismo foi mantido em ágar inclinado GYMP cuja composição é 20 g/L glicose, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte, 2 g/L K_2HPO_4 , 20 g/L ágar tendo pH ajustado para 5,5 com auxílio de pHmetro marca Metler Toledo, tipo 320[®]. Após a incubação do microrganismo a 30°C, foi adicionado óleo mineral estéril ao tubo de ensaio até a completa imersão do ágar para então mantê-los a 5°C (cultura estoque). A manutenção do microrganismo foi feita mediante repique em meio sólido composto periodicamente.

3.1.1.b. Preparo do inóculo e fermentação

A ativação da cultura estoque foi feita por repicagem em novos tubos contendo meio GYMP por 24 h a 30°C em incubadoras marca New Brunswick Scientific, tipo Innova[®] 4430. O inóculo foi preparado por repique da cultura ativada para Erlenmeyers aletados de 250 ml, contendo 100 mL do meio padrão constituído de 20 g/L de glicose, 10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona, 5 g/L de K_2HPO_4 , a pH 4,5, seguido por incubação a 30°C e 150 rpm, por um período de 16 h. Para a fermentação, 10 ml deste inóculo foram adicionados a 100 mL do meio de cultura industrial; cuja composição é de 85 a 95 g/L de água de maceração de milho clarificada (AMM) e de 55 a 70 g/L de melaço clarificado com 75% de açúcares redutores totais (ART) e pH corrigido inicialmente para 4,5; em frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL (HERNALTEENS, 2006). A incubação foi realizada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, por um período de 16 a 18 h ou, de preferência, até o pH do meio atingir um valor de 5,0 a no máximo 6,0. Os meios industriais foram clarificados com carvão ativo ANFC a 4% a 60°C, 150 rpm por 10 minutos, seguido de centrifugação e filtração de acordo com metodologia proposta por MENDES (2006).

3.1.1.c. Recuperação da enzima

A recuperação da enzima do caldo fermentado foi realizada de duas formas distintas: concentração com sulfato de amônia e precipitação com álcool.

A) Concentração da enzima por sulfato de amônia

O caldo fermentado, obtido de acordo com o item anterior, teve seu pH corrigido para 5,0 antes de ser conduzida a concentração da enzima pelo sal. Ao caldo foi adicionado o sal lentamente até atingir uma concentração de 70% (p/v) de saturação, considerando-se ausência do sal no caldo fermentado, a razão deve ser de 472 g/L. Após adição, a solução foi mantida a baixas temperaturas, 4-5°C, e em condições estáticas *over-night*. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6000 g por 10 min a 4°C em uma centrífuga refrigerada de marca SROVALL[®], do tipo RC26 PLUS, e o precipitado ressuspendido em tampão acetato 0,05 M e pH 4,5. Em seqüência, conduziu-se a diálise desta solução com o auxílio de membranas adequadas tipo Membra-Cel[™] Viskase[®] (14000MW) por 24 horas em tampão acetato (0,05M a pH 4,5) em baixas temperaturas, 4-5°C, sob condições estáticas. Estudos como os de ZHANG *et al.* (2007) e SIRINGAN *et al.* (2007) demonstram aplicações semelhantes dessa metodologia.

B) Precipitação com álcool

O caldo fermentado teve seu pH corrigido para 5,0 antes de ser conduzida a recuperação da enzima. Esta etapa foi realizada de acordo com metodologia apresentada em SANTOS (2002) adicionando-se por gotejamento lento de álcool anidro (99,3° INPM) a – 20°C até atingir a concentração de 70% (v/v) em um volume correspondendo a duas vezes o volume do caldo. A temperatura de reação foi mantida em 2°C com o auxílio de reatores encamisados e banho tipo Tecnal TE[®] 184, sob agitação branda, com o auxílio de agitadores magnéticos do tipo Hanna HI[®] 190M, para evitar a desnaturação da enzima. Após a adição total do álcool, a solução foi imediatamente centrifugada a 10000 x g por 10 min de 4 a 6°C em uma centrífuga refrigerada de marca SROVALL[®], do tipo RC26 PLUS. O precipitado contendo a enzima foi ressuspendido em tampão acetato 0,05M e pH 4,5 e congelado em pequenos volumes.

3.1.2. Síntese do suporte orgânico e imobilização

O método utilizado para imobilização enzimática foi o proposto por SANTOS (2002) e trata-se de gel alginato 3% com adição de 3% de carvão ativado ANFC. Foram utilizados para isto 16,5 g de água, 0,75 g de alginato de cálcio, 12,5 g de sacarose, 5 mL de solução enzimática com a atividade pré-estabelecida, 3,5 mL de glutaraldeído e 0,75 g carvão ativado. O método consiste em realizar o *co-cross-linking* da enzima com glutaraldeído e carvão ativo por 30 minutos e então adicionar a solução de alginato e sacarose, devidamente dissolvidos. A sacarose age neste caso como protetora do sítio ativo da

enzima. A solução resultante é então gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,2 M; as microesferas obtidas permanecem em repouso nesta mesma solução *over-night*.

3.1.3. Síntese dos suportes inorgânicos para imobilização

A Tabela 4 representa em resumo a codificação para cada metodologia de síntese dos suportes inorgânicos avaliados. A descrição de cada metodologia está contida nos itens 3.1.3.b e 3.1.3.c.

Tabela 4. Resumo das metodologias de síntese dos suportes inorgânicos para imobilização da enzima FTase extracelular de *Rhodotorula* sp.

Nióbio	
N-A	Óxido de nióbio
N-B	Composto de nióbio e grafite
Zircônio	
Z-A	Fosfato de zircônio
Z-B	Sílica enxertada com zircônio
Z-C	Zircônio precipitado

3.1.3.a. Limpeza dos suportes inorgânicos

Para cada 100 g do suporte utilizou-se 200 ml de solução concentrada de ácido nítrico, conduzindo a reação a 95-100°C por cerca de 1 hora. Descartou-se apropriadamente o ácido e o suporte foi lavado abundantemente com água destilada, aproximadamente 2 L para 100 g do suporte, até neutralidade da água de lavagem determinada com papel indicador de pH do tipo Merck®. O suporte foi seco em estufa, marca Fanem, tipo 320 SE®, a 80°C *over-night* (Janolino & Swaisgood em: BICKERSTAFF; pp. 21-26; 1997).

3.1.3.b. Zircônio

Metodologia Z-A:

Adicionou-se lentamente, uma solução de cloreto de zircônio(IV) - $ZrCl_4$ - em 0,5 M de HCl (5 g do cloreto diluído em 80 mL de HCl 0,5 M), com auxílio de uma bureta, a uma solução de ácido fosfórico 3 M, sob agitação constante, à temperatura ambiente, numa proporção de $Zr:PO_4$ de 1:2. O precipitado gelatinoso obtido foi deixado em repouso por 24 horas, sendo em seguida filtrado e lavado com solução de ácido fosfórico a 2% utilizando um sistema a vácuo e com água deionizada até obter ausência de íons cloreto na água de lavagem. A ausência de íons cloreto foi determinada através de teste qualitativo com nitrato

de prata e ausência de precipitado branco. O produto obtido, fosfato de zircônio - $Zr(HPO_4).nH_2O$ - foi levado à estufa à 110 °C por um período de 24 horas em recipiente aberto coberto apenas com papel filtro comum (MEDEIROS, 1994; CASTRO *et al.*, 2000).

Metodologia Z-B:

Para o enxerto da sílica com zircônio foi necessário levar a banho aquecido uma solução de 2 g de oxiclreto de zirconila - $ZrOCl_2.8H_2O$ - em 100 mL de água destilada e 10 g de sílica (35–70 mesh ASTM, Merck), permanecendo em banho até completa evaporação da água. Após esfriar, o zircônio foi fixado com amônia em um Erlenmeyer de 250 mL conectado por uma mangueira a outro Erlenmeyer contendo cloreto de amônia, NaOH e pouca água destilada necessária apenas para promover reação e formar de gás. NaOH foi adicionado ao segundo Erlenmeyer a medida que cessava a formação de bolhas. A reação foi interrompida quando a sílica apresentou aparência úmida. O suporte obtido foi deixado em repouso em recipiente fechado por 30 minutos e lavado sucessivamente com água destilada. A secagem ocorreu em estufa a 100°C por cerca de 1 hora (CHEN *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2000; YAMAGUCHI *et al.*, 1999; YOSHIDA *et al.*, 1996).

Metodologia Z-C:

Foi utilizado nesta metodologia o cloreto de zircônio(IV) mas também pode ser empregado o oxiclreto de zirconila, pois quando dissolvidos em água, as soluções obtidas se comportam de forma idêntica. Foi preparada uma solução de 0,65M de cloreto de zircônio em HCl 1 M, adicionando-se lentamente amônia 2 M até neutralidade, determinada com papel de pH, sob agitação branda. O precipitado branco formado foi então lavado com 3 x 5 ml de solução salina a 0,9% e seco em estufa, a 110°C, *over-night*, em recipiente aberto coberto apenas com papel filtro comum (Kennedy *et al.*, em: BICKESTAFF, pp. 345-359, 1997).

3.1.3.c. Nióbio

Metodologia N-A:

Foi pré-aquecida uma mistura de pentóxido de nióbio com carbonato de potássio, na proporção 1:5 em bico de Bunsen, levando em seguida a mufla (1000 °C) por um período de 5 a 6 horas. O material fundido foi lixiviado com água deionizada fervente e adicionado de ácido nítrico 1 M, gota a gota, até obter pH entre 0,5 e 1,0 determinado com papel indicador de pH. Filtrou-se a vácuo o precipitado resultante lavando abundantemente com água deionizada. O óxido de nióbio - $Nb_2O_5.mH_2O$ - foi seco em estufa a 50°C por 24 h e mantido em dessecador sob sílica gel até sua utilização (MIRANDA, 2004; SERAFIM, 1994; CASTRO *et al.*, 2000).

O pentóxido de nióbio utilizado foi cedido pela CIF (Companhia Industrial Fluminense) e CBMM (Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração) com graus de pureza em torno de 80%.

Metodologia N-B:

O composto de nióbio (~95%) e grafite comercialmente denominado NB-340[®], cujas propriedades estão listadas na Tabela 5, fabricado e cedido pela CBMM, foi moído em moinho marca Tecnal, tipo TE-631[®], e as partículas selecionadas entre 65 e 80 Mesh em um agitador de peneiras Bertel[®], para análises granulométricas. O preparo do suporte foi realizado de acordo com o procedimento de lavagem descrito no item 3.1.c.i até que o filtrado apresentasse cor límpida e neutralidade.

Tabela 5. Propriedades do composto sólido inorgânico NB-340[®]

Propriedades	NB-340 [®]
Forma	Pellets
Volume de poro	0,12 g/cm ³
Densidade	1,3 g/cm ³
Dimensões -diâmetro -altura	6,2 mm 3,6 mm
Área de superfície	100 ± 10 m ² /g
Força de ruptura	30 N/mm

Fonte: Technical Report-NB340[®]; CBBM; 2006

Por se tratar de um composto ácido sólido, foi necessário avaliar a influência do suporte NB340[®] puro no pH do meio em que está disperso, para isso, definiu-se a razão de 0,064 g de suporte sólido para cada mL de meio. A determinação de cada pH foi conduzida em triplicata e após a adição do suporte, o meio foi levemente agitado para permitir igual distribuição. O pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro marca Metler Toledo, do tipo 320[®].

3.1.3.d. Preparo dos suportes inorgânicos para imobilização por ligações covalentes

3.1.3.d.i Silanização

Metodologia [S]:

A silanização dos suportes inorgânicos foi realizada com solução de γ -aminopropiltriétoxisilano (γ APTS) a 0,5% (v/v) preparada em heptano, na proporção 3 mL de solução para cada 1 grama do suporte. A reação ocorreu a 75°C por um período de 3h em

recipiente fechado (de preferência em rotavapor). Após este procedimento o material foi filtrado em funil de Buchner e lavado com heptano para eliminar o excesso de silano. O suporte silanizado foi levado à estufa a 105°C por 15 h (SOARES, 2000).

Metodologia [S-1]:

O suporte foi silanizado utilizando uma solução a 10% (v/v) de γ APTS numa proporção de 10 volumes desta solução para cada 1 volume do suporte. O pH foi ajustado para 5,0 com uma solução de HCl a 6 N . A reação ocorreu de forma semelhante à Metodologia [S] a 75°C / 3 h e seco a 105°C / 15 h (Swaisgood *et al.* em BICKERSTAFF; pp. 13-20; 1997).

3.1.3.d.ii Ativação

Metodologia [A]:

A ativação ocorreu imergindo o suporte em uma solução tampão hidrogenofosfato de sódio 0,1 M (pH 8,5) contendo glutaraldeído a 2,5% (v/v). Esta solução foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, durante 1 h. O suporte ativado foi lavado com água destilada para eliminar o excesso de reagente. Após a lavagem, a água presente foi succionada durante 30 minutos (SOARES, 2000).

3.1.3.e. Imobilização da enzima em suportes inorgânicos

Para a imobilização da enzima foram selecionados os suportes com tamanho de partícula entre 65 e 80 Mesh, com o auxílio de um agitador de peneiras para análise granulométrica Bertel®. As diferentes metodologias testadas para imobilizar a enzima extracelular de *Rhodotorula* sp. em suportes inorgânicos estão representadas em resumo na Tabela 6 e na Figura 4.

Metodologia [I(h)]:

Inicialmente os suportes foram umedecidos em hexano, sob agitação, por 1 hora. A imobilização da enzima nos suportes foi conduzida sob agitação durante 3 h, à temperatura ambiente, utilizando hexano como meio de dispersão, seguido por um período adicional de 18 h em condições estáticas e em baixas temperaturas (4-5°C). Ao final, o imobilizado foi filtrado e lavado com solução tampão acetato gelada para remoção de toda proteína não imobilizada e do hexano (MIRANDA, 2004).

Metodologia [I(2)]:

O meio de dispersão utilizado foi tampão acetato 0,05M e pH 4,5. Numa primeira etapa, o suporte e a enzima foram submetidos à agitação intercalada e suave por um período de 1 hora em temperatura ambiente para promover contato físico. Em seguida, a

imobilização final da enzima ocorreu sob condições estáticas em baixas temperaturas (4-5°C). Ao final, o imobilizado foi filtrado e lavado com tampão acetato gelado para remoção de toda proteína não imobilizada.

Algumas variações da Metodologia [I(2)] foram avaliadas. A primeira etapa de contato físico entre a enzima e o suporte foi mantida mas, com relação à segunda etapa de imobilização e o meio de dispersão, avaliou-se a adição de glutaraldeído (2,5%) representando a Metodologia [I(2g)] e a adição de glutaraldeído (2,5%) e sacarose (4%) representando a Metodologia [I(2gs)].

A adição de uma terceira etapa de imobilização foi também avaliada. Partindo-se da Metodologia [I(2)], o imobilizado obtido foi submetido a novas condições estáticas por um período adicional de 18 horas em baixas temperaturas tendo como meio de dispersão tampão acetato 0,05M e pH 4,5 contendo glutaraldeído (2,5%), representando a Metodologia [I(3g)] e contendo glutaraldeído (2,5%) e sacarose (4%), representando a Metodologia [I(3gs)]. Ao final, o imobilizado foi novamente filtrado e lavado com tampão acetato gelado.

Tabela 6. Resumo das metodologias avaliadas para preparo dos suportes inorgânicos e imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp.:

Silanização do suporte	
S	0,5% APTS
S-1	10% APTS
Ativação do suporte	
A	2,5 % glutaraldeído
Imobilização da enzima	
1ª etapa	
I(h)	Hexano (3 h agitação branda)
I	Solução tampão acetato (1 h agitação branda)
2ª etapa	
I(2h)	Hexano (condições estáticas)
I(2)	Solução tampão acetato (condições estáticas)
I(2g)	2,5% glutaraldeído
I(2gs)	2,5% glutaraldeído + 4% sacarose
3ª etapa	
I(3g)	2,5% glutaraldeído
I(3gs)	2,5% glutaraldeído + 4% sacarose

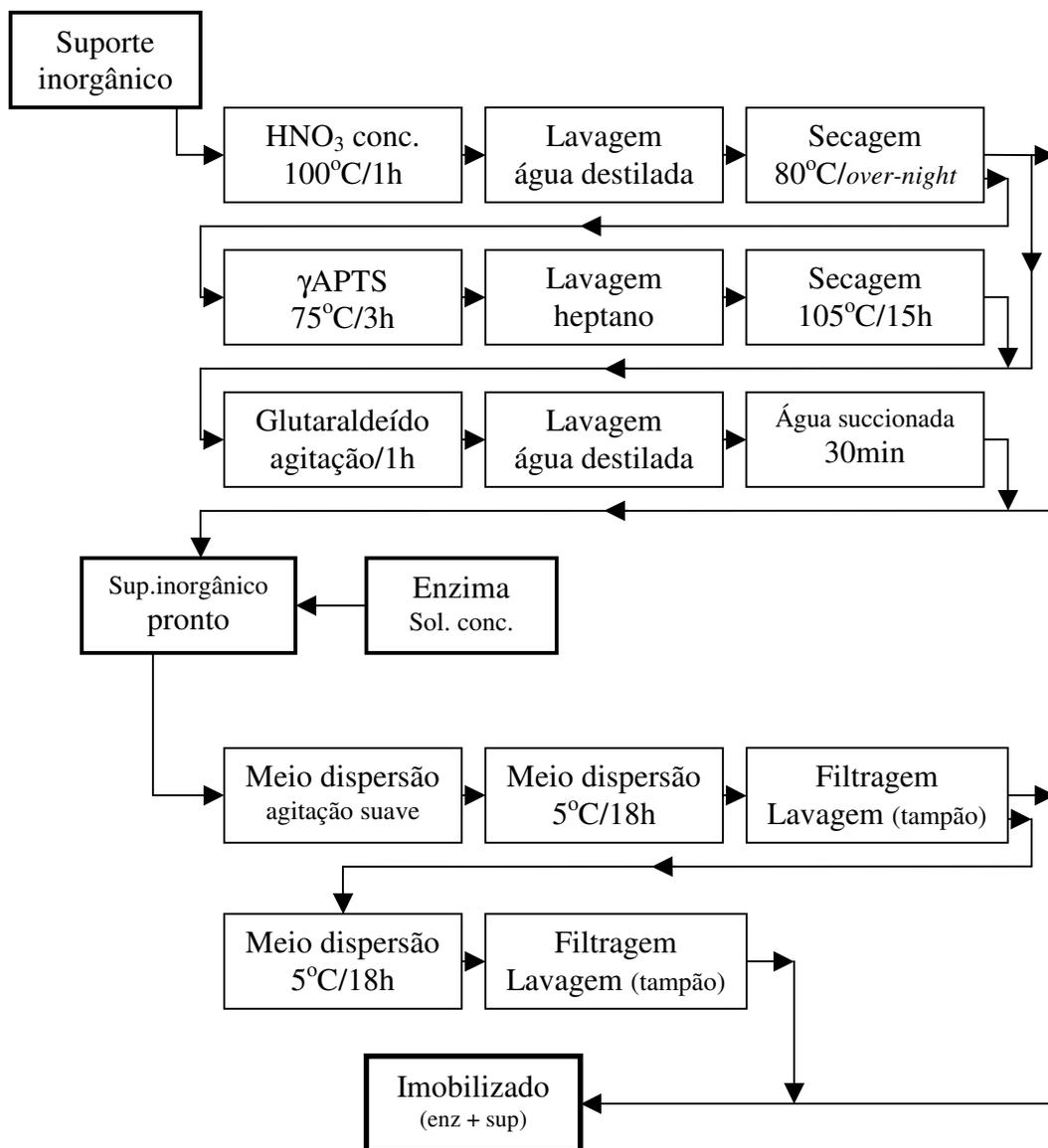


Figura 4. Fluxograma para sugestões de metodologias de imobilização enzimática em suporte inorgânico.

3.2. METODOLOGIA ANALÍTICA

3.2.1. Determinação da recuperação enzimática (R_E)

O cálculo da recuperação enzimática do meio fermentado independente da metodologia de recuperação foi feito de acordo com a equação 23 a partir dos valores de atividade obtidos do meio fermentado e do concentrado enzimático (de acordo com item 3.2.6.b) relacionados com os volumes obtidos.

$$R_E = \frac{\text{enz_concentrada}}{\text{meio_fermentado}} = \frac{U_{TF} \cdot V_{con}}{U_{TF} \cdot V_{meio}} \cdot 100\% \quad (23)$$

3.2.2. Identificação e quantificação de carboidratos

A identificação e quantificação da sacarose, glicose, frutose e FOS, relativa a síntese para produção de FOS, foi obtida por análise em cromatografia de íons (HPLC-PAD). As amostras (25 μ l) foram injetadas em um sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EUA), que consiste de uma bomba gradiente GP50, um detector eletroquímico ED-40 operando na forma de pulso amperométrico, um eletrodo de ouro e um eletrodo de referência Ag-AgCl. Os produtos foram analisados utilizando uma coluna de troca aniônica CarboPac (240 x 4mm) e coluna de proteção CarboPac PA100 (50 x 4 mm). A eluição foi realizada utilizando como solventes: uma solução de NaOH 100mM e uma solução de NaOH 100 mM contendo 500 mM de acetato de sódio.

3.2.3. Determinação do teor de proteína

O conteúdo de proteína dos filtrados após última lavagem do imobilizado foi obtido pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Albumina bovina cristalina foi utilizada para preparar uma curva de calibração na faixa de 0,02 a 0,2 g/L. O teor (mg) de proteína imobilizada [P_i] (item 3.2.g) foi calculado fazendo-se a subtração entre o teor de proteína oferecida à imobilização [P_o] e o obtido no filtrado [P_{fil}]. Esta reação deve ser conduzida em duplicata e se possível em triplicata para uma maior precisão dos resultados.

3.2.4. Determinação de açúcares redutores

O conteúdo de açúcares redutores foi obtido pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944) e o valor obtido utilizado no cálculo da atividade enzimática (item 3.2.6.b).

3.2.5. Determinação da glicose

A glicose foi determinada pelo kit enzimático glicose-oxidase (LABORLAB, Guarulhos/SP) e o valor obtido utilizado para o cálculo da atividade enzimática (item 3.2.6.b).

3.2.6. Determinação da atividade enzimática

3.2.6.a. Definição

Uma unidade de atividade enzimática de transfrutossilação (U_{TF}) foi definida como a capacidade da enzima em transferir grupos frutossil por minuto nas condições de análise; 1 μmol de frutose transferida (equação 24) ou o equivalente a quantidade de glicose liberada subtraída da quantidade de frutose livre no meio, a partir da sacarose. Já uma unidade de atividade hidrolítica (U_H) corresponde a 1 μmol de glicose liberado no meio, a partir da sacarose (HIDAKA *et al.*, 1988; REMAUD-SIMEON *et al.*, 1994; CHEN & LIU, 1996).

$$U_{TF} = F_T = (2G - AR) = [\mu\text{mol}/\text{min}] \quad (24)$$

$$U_H = G = [\mu\text{mol}/\text{min}] \quad (25)$$

Sabendo-se que:

$$AR = F + G \quad (26)$$

$$F = AR - G \quad (27)$$

$$F_T = G - F = 2G - AR \quad (28)$$

Por se tratar da enzima na sua forma imobilizada, foi necessário definir uma unidade de atividade enzimática imobilizada (U_i) como a relação entre a atividade obtida e o peso do suporte cuja atividade foi determinada. Portanto, a equação 29 representa a atividade enzimática imobilizada de transfrutossilação.

$$U_i = U_{TF}/g = [\mu\text{mol}/\text{min}.g] \quad (29)$$

3.2.6.b. Reação

Para a determinação da atividade enzimática o meio padrão de reação foi preparado em tampão acetato (0,05M e pH 4,5) contendo sacarose a 50%. No caso da determinação da atividade de soluções, obedeceu-se a relação de 4,5 mL de meio de reação para 0,5 mL da solução de análise diluída ou não. Para a determinação da atividade do imobilizado, a diluição foi feita variando-se o volume do meio de reação, no máximo 20 mL, para um peso úmido de no mínimo 0,25 g. A temperatura de reação padrão foi de 60°C e os frascos foram mantidos sob agitação branda. Nos primeiros 10 minutos de reação, alíquotas de 0,2 mL foram retiradas para realização da reação de Somogyi-Nelson (item 3.2.4) e a partir de 15 minutos de reação, alíquotas de 30 μL foram retiradas a cada 5 minutos até completar 35 minutos totais de reação para reação com kit enzimático (item 3.2.5). É recomendado que

esta reação seja conduzida em triplicata se o experimento não puder ser realizado em triplicata.

3.2.6.c. Determinação da incógnita (AR)

O valor de AR (açúcares redutores, equação 26) foi obtido pela multiplicação da inclinação da regressão obtida (item 3.2.6.b) pela inclinação da curva de calibração e pela diluição realizada. Este valor nos fornece a atividade de invertase, ou seja, quanto de glicose e frutose encontram-se livres no meio.

3.2.6.d. Determinação da incógnita (G)

O valor da incógnita G (glicose, equação 27) foi obtido multiplicando-se a inclinação da regressão obtida (item 3.2.6.b) pela inclinação da curva de calibração e pela diluição realizada. Este valor nos indica quanto de glicose foi liberada a partir da sacarose, ou seja, a atividade hidrolítica.

3.2.6.e. Determinação da incógnita (F_T)

Essa incógnita é obtida de acordo com a equação 28 e indica quanto da frutose liberada, a partir da sacarose, foi utilizada na reação de transfrutossilacção. Este valor corresponde a atividade de transfrutossilacção.

3.2.7. Determinação da razão ideal de imobilização (R_i)

Esta razão tem o objetivo de favorecer um melhor aproveitamento tanto da enzima quanto do suporte disponíveis a imobilização, e foi determinada fixando-se o volume da solução enzimática concentrada e variando-se o peso do suporte.

$$R_i = \frac{U_{TF}^{oferecida}}{g_{sup\ porte}} \quad (30)$$

3.2.8. Determinação da razão de atividade (R_A)

A razão de atividade do imobilizado foi obtida de acordo com a equação 31. A eficiência da imobilização [R_A] foi obtida pela divisão da atividade efetivamente imobilizada [U_i] e a atividade oferecida à imobilização [U_o].

$$R_A = \frac{U_i}{U_o} \cdot 100\% \quad (31)$$

De forma semelhante, para o caso do acompanhamento da manutenção da atividade ao longo do tempo, como medida de sua estabilidade, a razão [R_A^t] foi obtida, de acordo com a equação 31.A, entre a o valor da atividade no tempo t [U_t] e a atividade no tempo zero [U_{to}].

$$R_A^t = \frac{U_t}{U_{to}} \cdot 100\% \quad (31.A)$$

3.2.9. Determinação da razão de transfrutossilagem (R_{TF})

A razão de transfrutossilagem indica a força relativa da atividade de transfrutossilagem da enzima em comparação com sua atividade hidrolítica. Espera-se que esta razão atinja altos valores, indicando uma alta formação de frutooligosacarídeos:

$$R_{TF} = \frac{U_{TF}}{U_H} \cdot 100\% = \frac{F_T}{F+G} \cdot 100\% \quad (32)$$

3.2.10. Determinação da razão de proteína imobilizada (R_P)

A razão de proteína imobilizada foi obtida pela divisão do valor da proteína imobilizada [P_i] e a proteína oferecida à imobilização [P_o], de acordo com o item 3.2.3.

$$R_P = \frac{P_i}{P_o} \cdot 100\% \quad (33)$$

A solução enzimática concentrada obtida de acordo com o item 3.1.1.d contém uma série de proteínas que não estão relacionadas à enzima de interesse. Por esta razão, o valor R_P não pode ser considerado de grande relevância quando a enzima utilizada não está na sua forma pura. Sua determinação foi feita apenas por efeito ilustrativo e complementar.

3.2.11. Determinação da estabilidade

O preparado imobilizado foi avaliado quanto a sua estabilidade expressa pelos valores de R_A obtidos ao longo do tempo em diferentes temperaturas, diferentes valores de pH e adição de sais ao meio de incubação. O meio padrão de incubação foi tampão acetato 0,05M e pH 4,5 e padronizou-se o volume de 5 mL de meio de estoque para cada grama de imobilizado. Em intervalos de tempo coerentes com as condições avaliadas, amostras do imobilizado foram retiradas e a atividade determinada conforme item 3.2.6.b. Nos casos em que o tempo total de incubação permitia, as amostras retiradas eram lavadas em tampão acetato gelado logo após a determinação da atividade e voltava para o meio de incubação. Para pequenos intervalos de tempo, as amostras totais retiradas não ultrapassaram 10% do peso inicial do imobilizado. Todas as avaliações foram conduzidas em triplicatas.

3.2.11.a. Efeito dos sais

O efeito sobre a estabilidade enzimática causado pela adição de sais ao meio de incubação foi avaliado individualmente para os sais $MnCl_2$, $NaCl$ e $CuSO_4$ na concentração de 10mM o que equivale a concentração de 1,258 g/L , 0,584 g/L e 1,596 g/L, respectivamente. A avaliação foi conduzida nas temperaturas de 60, 63 e 65°C.

3.2.11.b. Efeito do pH

O efeito sobre a estabilidade enzimática causado pelo pH do meio foi avaliado em triplicata, nas temperaturas de 60, 63 e 65°C. Para essa avaliação, o pH do meio de incubação foi alterado para os valores de 3,0; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 além do pH padrão 4,5.

Para obtenção do perfil de pH, a atividade enzimática foi determinada triplicata em tampão acetato 0,05M contendo 50% de sacarose a 60°C e tendo o pH variado entre 3,0 e 6,5.

3.2.11.c. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a estabilidade do imobilizado em meio de incubação padrão, foi avaliado em triplicata nas temperaturas de 48, 50, 53, 55, 60, 61, 63, 65 e 70°C. Para as temperaturas de 48 e 50°C o tempo total de acompanhamento foi de 1 semana com frequência diária; para as outras temperaturas o tempo total de incubação variou de 1,5 a 8 horas, dependendo da temperatura. Os resultados experimentais obtidos foram utilizados para determinação de $t_{1/2}$, D, z e parâmetros termodinâmicos, conforme itens de 3.2.12 a 3.2.15 e 3.2.17.

Para obtenção do perfil de temperatura, uma mesma batelada de enzima imobilizada teve sua atividade determinada em triplicata em meio padrão de reação, sendo variada apenas a temperatura. Foram avaliadas as temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65, 68, 70 e 73°C.

3.2.12. Determinação da constante k_d

Os logaritmos naturais de R_A^t obtidos ao longo do acompanhamento da estabilidade térmica, de acordo com o item 3.2.11.c, foram plotados em função do tempo em minutos para o cálculo de k_d (min^{-1}). A regressão linear obtida dos dados experimentais obedece a equação 34 e o valor da inclinação da reta equivale a constante k_d na temperatura avaliada.

$$\ln(R_A^t) = -k_d \cdot t + c_1 \quad (34)$$

3.2.13. Determinação da Energia de Ativação da Desnaturação (E_{ad})

Os valores de k_d obtidos segundo o item 3.2.12 foram linearizados de acordo com metodologia proposta por Arrhenius (item 2.5.3.b) na forma $\ln(k_d)$ versus $10^3/T$. A regressão linear obtida obedece a equação 12, e o valor da inclinação desta equação foi multiplicado pela constante R ($8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) obtendo dessa forma o valor de E_{ad} expresso em kJmol^{-1} já que o eixo X está numa escala 10^3 .

3.2.14. Determinação da meia-vida ($t_{1/2}$) e efeito sobre a meia-vida ($t\%$)

Uma vez determinado o valor k_d (item 3.2.12), a equação 34 possibilitou o cálculo da meia-vida em minutos. A equação que prediz a relação entre a meia-vida e a temperatura (equação 10) foi obtida após os valores E_{ad} e A_d terem sido determinados (item 3.2.13). Foi possível ainda, analisar o ajuste dos pontos obtidos experimentalmente e os preditos pela equação.

O efeito sobre a meia-vida, expresso por $t\%$ foi calculado de acordo com a equação 35 e expressa matematicamente se houve aumento da meia-vida ou diminuição após a variação da condição em análise, como o pH (item 3.2.11.a) e sal (3.2.11.b).

$$t\% = \frac{t_{1/2}^{branco} - t_{1/2}^{avaliado}}{t_{1/2}^{branco}} \cdot 100\% \quad (35)$$

3.2.15. Determinação da redução decimal (D) e do valor z

A partir dos valores de k_d (item 3.2.12) a redução decimal (D) para cada temperatura avaliada foi determinada de acordo com a equação 11. O valor z foi determinado pelo inverso da inclinação da regressão linear obtida da relação gráfica $\log(D)$ versus T (Eq. 12).

3.2.16. Determinação das constantes cinéticas (v_{max} , K_m , K_i)

A reação enzimática foi conduzida conforme item 3.2.6.b variando apenas a concentração de sacarose para 100, 200, 300, 500, 600 e 700 g/L. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e a atividade enzimática obtida para cada concentração corresponde ao valor v da equação 01. Estes dados experimentais foram linearizados conforme metodologia de Lineweaver-Burke, equação 03, para obtenção da constante v_{max} e pela metodologia de Eadie-Hofstee, equação 04, obteve-se a constante K_m . A constante K_i foi obtida no ponto onde a primeira derivada se anula, conforme equação 02. Outra forma de obtenção das constantes cinéticas foi realizada utilizando o software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) diretamente dos pontos experimentais obtidos.

3.2.17. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os valores de k_d e E_{ad} obtidos conforme itens 3.2.12 e 3.2.13 foram aplicados às equações 17 e 22 para determinação de ΔG e ΔH , respectivamente, ambos expressos em kJmol^{-1} . Uma vez determinados estes dois parâmetros, aplicou-se a equação 22 para determinação de ΔS , expresso em $\text{kJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

3.2.18. Síntese de frutooligossacarídeos

Para realização da síntese é preciso definir a razão de síntese (R_s) como a quantidade de unidade enzimática para cada ml do meio de reação:

$$R_s = \frac{U_i}{V_{reação}} \quad (36)$$

A síntese de frutooligossacarídeos por enzima extracelular de *Rhodotorula* sp. imobilizada foi conduzida sob as seguintes condições:

- 50% sacarose comercial (açúcar cristal)
- pH 4,5 e 6,0 (volume de reação de 5 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M)
- 50°C (micro-reatores em banhos agitados)
- $R_s = 7,0$ (U_i/ml reação)

Foram coletadas amostras nos tempos 24, 48, 72 e 96 h e após diluição adequada, o perfil de concentração de açúcares foi determinado por análise em cromatografia de íons (HPLC-PAD), conforme item 3.2.2. O rendimento da síntese foi determinado pela porcentagem de composição dos FOS produzidos em relação à concentração de sacarose inicial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TESTES PRELIMINARES

4.1.1. Recuperação da enzima

A recuperação da enzima do meio fermentado por sulfato de amônio foi conduzida de acordo com o item 3.1.1.c partindo-se de um volume de 1015 ml de meio cuja atividade enzimática era de 111,11 U_{TF}/ml obtendo-se 60 ml de concentrado enzimático de atividade 211,6 U_{TF}/ml . De acordo com a equação 23 o rendimento foi de apenas 11,26%, um valor muito baixo. E, uma vez congelado, o concentrado tornou-se inviável para uso devido a sua floculação e alteração total da aparência da solução. Este experimento foi conduzido apenas uma vez e devido aos inconvenientes apresentados não foi investigada nenhuma condição que pudesse melhorar a eficiência do processo.

Já a metodologia de recuperação por gotejamento de álcool anidro, item 3.1.1.d, apresentou ótimos resultados, conforme dados demonstrado na Tabela 7, a eficiência de recuperação neste caso foi de 86,47 % mas uma eficiência de 62% também já foi observada em testes anteriores com esta mesma metodologia.

Tabela 7. Recuperação da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. por gotejamento de álcool anidro

Caldo fermentado (16-18h)		Enzima concentrada	
U_{TF}/ml	R_{TF} (%)	U_{TF}/ml	R_{TF} (%)
$17,73 \pm 0,22$	$143,82 \pm 0,72$	$219,03 \pm 0,67$	$161,27 \pm 0,12$
Volume total = 1500 ml		Volume total = 105 ml	

4.1.2. Alginato

As esferas de alginato foram obtidas a partir de um concentrado enzimático de atividade 200 U_{TF}/ml e foi conduzida apenas uma avaliação quanto ao efeito do $CaCl_2$ na resistência física das esferas, variando a concentração da solução em 0,05, 0,1 e 0,2 M. A razão de imobilização (R_i) oferecida foi de 4,0 U_i/g sendo obtida uma atividade de aproximadamente 3,8 U_i/g nas micro-esferas obtidas em $CaCl_2$ 0,2M. As outras concentrações de cloreto de cálcio avaliadas resultaram em esferas menos resistentes. Partindo-se desse imobilizado obtido, foi avaliada a estabilidade de estocagem a diferentes valores de pH. O imobilizado foi estocado a 4-5 °C por 2 dias tendo sua atividade

determinada ao final deste período. A atividade do imobilizado obtida após esse período de incubação em pHs 3,5, 4,5 e 6,0 foram respectivamente: 1,91, 2,10 e 2,09 U_i. Estudos mais específicos foram realizados com esta enzima imobilizada em alginato por HERNALSTEENS (2006). Como o alginato não permite reuso e apresenta baixa estabilidade físico-química, deu-se preferência às matrizes inorgânicas, devido aos resultados obtidos, na seleção de um suporte para caracterização da enzima imobilizada.

4.1.3. Zircônio

A Metodologia [Z-A] (Tabela 4) mostrou ser de fácil execução e um composto na forma de micro-cristais pouco resistentes foi obtido. Com o manuseio durante as etapas de silanização e ativação, as partículas formadas reduziram-se a pó. Pequenas variações na metodologia como temperatura ou concentrações foram testadas de acordo com sugestões variadas, porém o composto obtido apresentou sempre baixa resistência física. Essa característica não faz do composto obtido um suporte ideal para as condições idealizadas, seria necessário avaliar em estudos seqüentes uma nova forma de se obter partículas de tamanho adequado e de boa resistência física e química. Se um leito de reator fosse preenchido com um suporte com essas características poderia ocorrer facilmente perda do suporte para o meio de reação.

A Metodologia [Z-B] (Tabela 4) também mostrou ser de fácil execução e principalmente devido ao emprego da sílica, pôde-se garantir o tamanho das partículas e uma ótima resistência física. As metodologias de preparo do suporte para imobilização foram avaliadas, em duplicatas, conforme resumo apresentado na Tabela 8 onde também podemos observar a eficiência de imobilização determinada pelos valores médios obtidos de R_A e R_P no tempo zero e a estabilidade em baixas temperaturas (4-5°C) determinada após 72 horas de incubação.

Observou-se que a eficiência de imobilização foi alta para as metodologias [SAI(2h)] e [I(2)], porém, para todas as metodologias avaliadas, foi grande a perda de atividade imobilizada considerando a temperatura de estoque. Analisando o valor R_A obtido dos filtrados observa-se que as metodologias de imobilização em que o glutaraldeído foi adicionado na segunda etapa apresentaram baixa atividade no filtrado, o que indica que houve complexação da enzima, embora não necessariamente refletida na atividade efetiva do imobilizado. Estudos como os de MANOLOV *et al.* (1993) discutem o fato de o glutaraldeído favorecer a retenção enzimática, mas não a estabilidade e atividade da enzima imobilizada. A R_i para estes testes foi de 260 U_i que é um valor alto e pode ter influenciado

nos baixos resultados de eficiência de imobilização. A identificação de cada metodologia apresentada na Tabela 8 está contida na Tabela 6 ao final do item 3.1.3.d.

Tabela 8. Valores médios obtidos para as metodologias de preparo do suporte e de imobilização avaliadas para o zircônio obtido pela Metodologia [Z-B]:

Metodologias [Z-B]	Tempo zero			Tempo 72 horas		
	R _A	R _P	R _A ^{filt}	R _A ⁷²	R _P ⁷²	R _A ^{filt}
SAI(2h)	70,82	62,19	37,81	24,52	98,62	0,53
SAI(2)	46,96	54,50	45,50	12,00	98,55	0,97
SAI(2g)	9,78	95,88	4,12	21,77	97,96	0,42
AI(h)	28,34	55,38	44,62	3,19	98,62	1,34
AI(2)	1,81	84,08	15,92	5,59	98,66	19,06
AI(2g)	17,72	95,77	4,23	10,11	97,92	0,45
I(h)	10,19	66,54	33,46	49,06	98,54	4,53
I(2)	88,35	82,92	17,08	5,07	98,62	0,43

Com relação à estabilidade em baixas temperaturas, a metodologia [I(2)] mesmo apresentando uma das menores eficiências de imobilização foi a que melhor estabilidade demonstrou e a metodologia [AI(2)] a que maior perda de atividade para o filtrado apresentou. De um modo geral, a perda de atividade após 72 horas foi pequena, mas considerável, pois em baixas temperaturas a enzima deveria apresentar uma grande estabilidade. Mas os resultados de R_A e de R_P do filtrado após as 72 horas indicam que a enzima está sendo de alguma forma inativada e não apenas desprendida do suporte. Para uma melhor aplicação desta metodologia de obtenção do zircônio como suporte para imobilização, seria necessário que estudos complementares fornecessem informações que possibilitassem uma otimização das etapas envolvidas.

Com relação à metodologia [Z-C] (Tabela 4) obteve-se um composto cujas partículas, a princípio, apresentaram resistência adequada, mas de acordo com a manipulação e condução das etapas de preparo e de imobilização havia redução a pó de grande parte das partículas resultando num processo de grandes perdas. Apenas três metodologias foram avaliadas em duplicata, conforme demonstrado na Tabela 9.

Os resultados obtidos demonstram eficiência de atividade muito baixa para as três metodologias testadas. Dessa forma, os testes realizados para esta metodologia não apresentaram resultados ideais para o propósito deste projeto.

Tabela 9. Valores médios obtidos da eficiência de imobilização em zircônio obtido pela Metodologia [Z-C]

Metodologias [Z-C]	R _A	R _P	R _A ^{filt}
SAI(2h)	3,85	57,38	47,62
SAI(2)	3,78	17,56	82,44
SAI(2g)	4,59	64,14	35,86

4.1.4. Nióbio

Seguindo a Metodologia [N-A] (Tabela 4) não foi possível obter partículas de tamanho e resistência física adequados. Esta metodologia foi de difícil reprodução o que dificultaria uma possível escala industrial, além de não ter sido possível obter um composto que se adequasse ao fim proposto neste trabalho.

A Metodologia [N-B] (Tabela 4) apresentou a grande vantagem de partir de um composto sólido e bastante resistente, podendo ser triturado e as partículas selecionadas de acordo com a necessidade. De acordo com os primeiros testes, os meios apresentavam turbidez devido às próprias características do composto, por essa razão é imprescindível a etapa de limpeza das partículas conforme o item 3.1.c.i. Observou-se que após lavagens sucessivas o composto não mais altera a cor da água. As metodologias avaliadas para este suporte estão resumidas na Tabela 10 e a identificação de cada uma delas é apresentada na Tabela 6 ao final do item 3.1.3.d.

Tabela 10. Codificação das metodologias aplicadas ao composto [N-B] para seleção de uma metodologia de imobilização da enzima FTase extracelular de *Rhodotorula* sp.

Ligação covalente		Adsorção	
Silanização e Ativação	Ativação	2 etapas	3 etapas
SAI(2h)	AI(2h)	I(2h)	I(3g)
SAI(2)	AI(2)	I(2)	
SAI(2g)	AI(2g)	I(2g)	I(3gs)
S-1AI(2)	AI(2gs)	I(2gs)	

Algumas metodologias foram avaliadas quanto à estabilidade em baixas temperaturas (4-5°C) e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 11 em função da meia-vida. Nesta mesma tabela estão demonstrados os valores da eficiência de imobilização expressos por R_A. As análises foram feitas em duplicatas com uma R_i de 260 U_i e devido a grande oscilação dos valores obtidos durante o acompanhamento da estabilidade, estes

resultados devem ser encarados com cautela e de forma geral e não como resultados precisos.

Tabela 11. Valores médios para meia-vida a 4-5°C e eficiência de imobilização da enzima FTase imobilizada por diferentes metodologias em [N-B]

Metodologia	R _A	t _{1/2} (dias)
SAI(2h)	63,56	7,71
SAI(2)	34,92	6,50
SAI(2g)	28,13	3,81
S-1AI(2)	19,85	69,95
AI(2h)	61,12	28,79
AI(2)	46,34	62,61
AI(2g)	55,77	63,83
AI(2gs)	49,42	3,33
I(2h)	78,70	42,18
I(2)	64,42	48,13
I(2g)	54,23	11,32
I(2gs)	9,45	5,53

Das metodologias avaliadas, as que apresentaram eficiência de imobilização acima de 60% foram as metodologias [SAI(2h)], [AI(2)], [I(2h)] e [I(2)]. Porém, com relação a estabilidade em baixas temperaturas, [SAI(2h)] e [AI(2)] não apresentaram bons resultados. Com relação às metodologias [I(2h)] e [I(2)] o principal critério de seleção foi feito em função da simplicidade dos passos envolvidos (adsorção da enzima em meio de dispersão ao suporte limpo) e o uso de reagentes menos perigosos ou que possam vir a encarecer o processo. Dessa forma, a metodologia [I(2)] foi selecionada para caracterização da enzima imobilizada em detrimento de [I(2h)] por utilizar tampão acetato como meio de dispersão e não hexano. Assim sendo, a identificação [NBI2] indica a metodologia de síntese do suporte [N-B] e de imobilização por adsorção em duas etapas com solução tampão como meio de dispersão [I(2)].

Sabe-se que dos dados obtidos e apresentados na Tabela 11, ainda há muito que avaliar com relação a melhor forma de se imobilizar a enzima em nióbio. A metodologia selecionada caracteriza-se pela simplicidade de passos, porém, traz o inconveniente de permitir desprendimento da enzima dependendo das condições de aplicação. Diversos estudos têm sido conduzidos, com relação as técnicas de imobilização, sobre a importante diferença entre a simples insolubilização da enzima e a sua estabilização. A formação de ligações covalentes pode ser considerada como a mais indicada, mas em GOPINATH & SUGUNAN (2007) e RESHMI *et al.* (2007) vê-se claramente algumas desvantagens desta

técnica em comparação com a adsorção, como por exemplo a diminuição considerável da área superficial e volume de poro das partículas do suporte devido a adição dos grupos funcionais ao final da silanização e ativação.

A estabilidade da enzima na sua forma livre sob as mesmas condições de temperatura (4-5°C) e em tampão acetato foi avaliada e a Figura 5 representa os dados obtidos em comparação com a metodologia [I(2)] para cálculo da meia-vida. Com os dados obtidos, a meia-vida da enzima livre em baixas temperaturas foi estimada em 68,76 dias. Por se tratar de um suporte com alta carga negativa, o efeito da imobilização foi negativo. Apenas a metodologia [S-1Al(2)] apresentou efeito positivo, de 1 dia, e as metodologias [Al(2g)] e [Al(2)] apresentaram semelhança com a enzima livre.

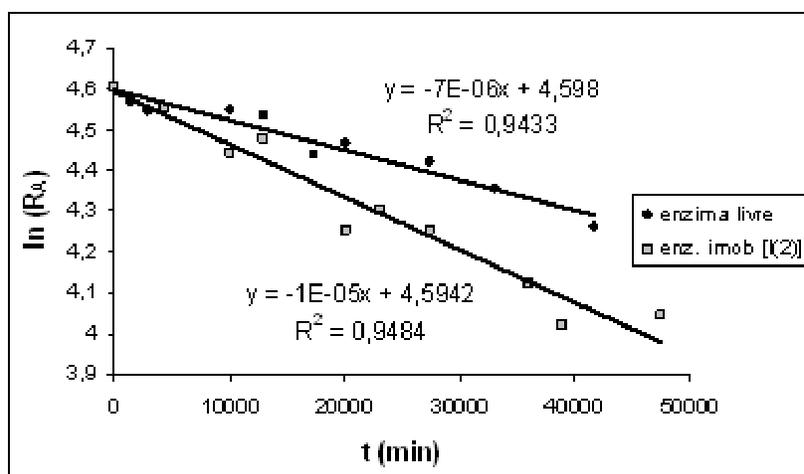


Figura 5. Cálculo da meia-vida a 5°C da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. na sua forma livre e imobilizada em [NBI2]

4.1.4.a. Efeito do suporte [N-B] no pH do meio

Como foi descrito no item 3.1.3.b, avaliou-se a influência do suporte sobre o pH de tampão acetato e água após adição de nióbio sintetizado de acordo com a Metodologia [N-B]. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 12.

Observa-se que o pH da água sofre variação considerável após adição do suporte nióbio [N-B]. A alteração do pH que parece ser a de maior importância é a que ocorre no micro-ambiente e não no macro-ambiente do sistema imobilizado, uma vez que a alteração dos pHs dos tampões foi muito menor em comparação com a água. O ambiente que circunda a enzima e os sítios ativo e de ligação demonstram ser profundamente afetados pela carga negativa do suporte, causando alterações como as do perfil de pH (item 4.2.5).

Com relação a este fenômeno, podemos o trabalho de RESHMI *et al.* (2007) onde discute-se o efeito da carga de suportes negativos sobre o micro-ambiente da enzima imobilizada.

Tabela 12. Influência do composto nióbio obtido pela Metodologia [N-B] no pH do meio:

pH água		pH tampão	
Sem Nb	Com Nb	4,5	6,0
7,67 ± 0,06	4,82 ± 0,11	4,43 ± 0,02	5,93 ± 0,01

4.1.4.b. Efeito do pH durante a imobilização

Avaliou-se o efeito do pH, em triplicatas, durante a etapa de imobilização da enzima em [NBI2] com o objetivo de se comparar a eficiência de imobilização, R_A , obtida em pH 6,0 com a eficiência obtida em pH 4,5, uma vez que a carga negativa do suporte pode de alguma forma interferir na imobilização. Os valores obtidos para a razão de atividade (R_A) e a razão de transfrutossilagem (R_{TF}) em pH 4,5 foram de 99,34% e 165,18%, respectivamente. Já em pH 6,0 os valores foram 69,84% e 165,39%. Isso indica que em pH 6,0 a adsorção é muito menor, ou talvez mais lenta, que em pH 4,5 e a enzima não apresenta perda de atividade já que o poder de transfrutossilagem é praticamente o mesmo.

4.1.4.c. Efeito da terceira etapa de imobilização

Com base nos argumentos apresentados no item 2.4.5, avaliou-se em triplicata o efeito da orientação da imobilização da enzima pela adição de uma terceira etapa de imobilização. Partindo-se da metodologia [NBI2] o imobilizado foi novamente submetido as mesmas condições estáticas e de temperatura da etapa [I(2)], porém com a adição de glutaraldeído e sacarose ao tampão, resultando nas metodologias [I(3g)] e [I(3gs)]. Da Tabela 13 pode-se observar que a eficiência de imobilização expressa pela razão R_A foi moderadamente elevada com a terceira etapa, sendo que o glutaraldeído e a sacarose, [I(3gs)], promoverem uma maior eficiência.

Tabela 13. Efeito da imobilização em [NB] com duas [I(2)] e três etapas [I(3g) e I(3gs)] sobre a eficiência de imobilização e estabilidade térmica

metodologia	I(2)	I(3g)	I(3gs)
R_A	95,40 ± 0,45	96,88 ± 0,44	97,60 ± 0,08
R_A^{35}	56,38 ± 0,18	44,22 ± 0,16	44,68 ± 0,10

Porém, quando a estabilidade térmica foi avaliada após 35 minutos a 65°C as metodologias de terceira etapa de imobilização apresentaram uma razão R_A^{35} bem menor que a obtida pela metodologia [I(2)] chegando a ser 20 e 18% menores. Estes resultados indicam que a presença de sacarose na concentração avaliada, contribuiu para um pequeno aumento da eficiência de imobilização ao proteger os sítios de interesse biocatalítico, sendo necessários novos estudos referentes a este tópico especialmente com relação a concentrações maiores de sacarose. MANOLOV *et al.* (1993) discute em seu trabalho que o emprego do glutaraldeído causa grande retenção de enzima, porém com o manuseio do imobilizado, há grande perda de enzima.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA EM NIÓBIO

4.2.1. Definição

A enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. foi imobilizada em suporte inorgânico composto por nióbio e grafite, comercialmente definido como NB340[®], por adsorção em tampão acetato como meio de dispersão pela metodologia aqui definida como [NBI2]. O imobilizado obtido foi caracterizado quanto ao perfil de pH, temperatura, estabilidade térmica, síntese de FOS etc. Os resultados obtidos são discutidos nos próximos itens.

4.2.2. Razão ideal de imobilização

De acordo com definição apresentada no item 3.2.7, obteve-se a Figura 6 relacionando os valores médios obtidos de triplicatas para a eficiência de imobilização expressa por R_A em diferentes valores de R_i . De acordo com os resultados obtidos, para valores de R_i inferiores a 164,0 U_i a eficiência de imobilização é praticamente 100%.

CHIANG & LEE (1997) obtiveram em imobilização de β -frutofuranosidase purificada em um polímero metacrilado uma eficiência de imobilização de 100% para uma R_i de 400 U/g. SYNOWIECKI & WOŁOSOWSKA (2006) obtiveram em imobilização de β -glucosidase, também purificada, em sílica gel silanizada, uma razão de 853 U/g, e com transglutaminase como fator de cross-linking a imobilização teve um aumento de 35%. CHO *et al.* (2006) obtiveram uma imobilização máxima de 92% na razão de 11U/g de uma trealose sintetase em Eupergit C[®] e para o mesmo suporte, TANRISEVEN & ASLAN (2005) obtiveram ao imobilizar um preparado enzimático (não purificado) com atividade de transfrutossilização 96%

de imobilização na razão de 134,5 U/g. Obviamente, a pureza da enzima imobilizada se reflete na eficiência de imobilização (R_A).

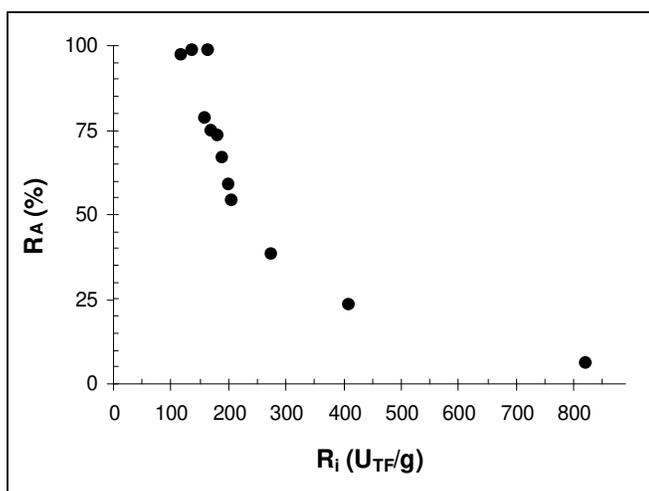


Figura 6. Determinação da razão ideal de imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. em [NB12]

4.2.3. Efeito de sais sobre a estabilidade térmica

Os sais avaliados de acordo com o item 3.2.11.a, possibilitaram a construção dos gráficos apresentados na Figura 7.

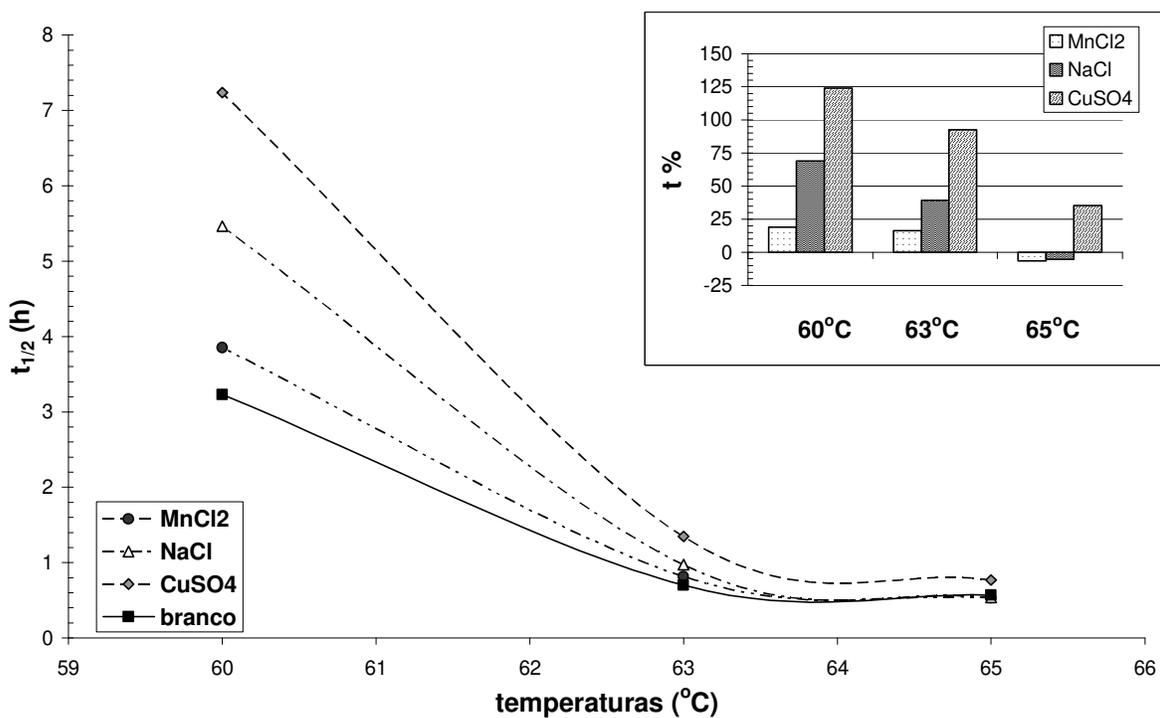


Figura 7. Estabilidade e efeito da adição de sais sobre a meia-vida da enzima

FTase imobilizada em [NBI2]

O gráfico em destaque na Figura 7 apresenta um comparativo da estabilidade térmica da enzima imobilizada expressa por $t_{1/2}$ para cada sal avaliado. No canto superior desta mesma figura, está representado o efeito da adição do sal, expresso por $t(\%)$, na solução de estoque sobre $t_{1/2}$ (vide item 3.2.14). Os dados foram comparados com a estabilidade obtida em solução padrão de estoque (item 3.1.11).

O sal CuSO_4 foi o que melhor resultado apresentou. O efeito da adição deste sal à solução de incubação chegou a apresentar um efeito positivo de 124% a 60°C (2,24 vezes maior). E mesmo a 65°C a meia-vida observada foi ainda 1,35 vezes maior que o branco, diferentemente dos outros dois sais avaliados. O MnCl_2 e o NaCl apresentam efeito promotor da estabilidade em proporções bem menores que o CuSO_4 e na maior temperatura avaliada o efeito foi negativo, ou seja, a estabilidade foi prejudicada.

O poder da atividade de transfrutossilção (R_{TF}) foi avaliado durante acompanhamento da estabilidade térmica, em soluções salinas e está demonstrado na Tabela 14. Observa-se que a adição dos sais fez com que a razão R_{TF} se mantivesse maior do que a obtida em solução padrão de estoque sem a adição de sal.

Após o tempo de incubação em cada uma das temperaturas, o filtrado obtido foi avaliado quanto à atividade enzimática e proteína, os dados obtidos estão representados na Tabela 15. Com relação à proteína, o filtrado correspondente ao sal MnCl_2 não pôde ser avaliado pelo método escolhido (Item 3.2.3) porque este sal interferiu na cor da reação, todos os outros filtrados puderam ser avaliados normalmente.

Observa-se pelos valores obtidos de R_A^{filt} , $R_{\text{TF}}^{\text{filt}}$ e R_P que há um desprendimento da enzima com o tempo e manuseio do sistema. Isso pode ser explicado devido à natureza das ligações químicas entre a enzima e o suporte (adsorção). As temperaturas 63 e 65°C revelaram uma perda maior da enzima nas soluções salinas em comparação com o branco, apesar de o branco apresentar atividade inferior, isto porque quanto maior a temperatura, mais instáveis são as forças que contribuem para esse tipo de ligação.

Os resultados obtidos com os sais foram satisfatórios, sendo o CuSO_4 o que melhores resultados apresentou, em todas as temperaturas analisadas. Sendo importante destacar que mesmo apresentando perda da enzima para o meio, em presença de CuSO_4 , o imobilizado alcançou grande estabilidade.

Tabela 14. Valor médio de R_{TF} durante acompanhamento da estabilidade em meio estoque contendo sais

		R_{TF} (60°C)			
tempo (h)		branco	MnCl ₂	NaCl	CuSO ₄
0		162,04	158,43	161,59	157,69
2		159,48	157,57	158,23	156,78
4		154,33	153,80	154,03	156,96
6		143,26	148,88	149,01	154,57
8		123,40	146,66	147,75	141,71
		R_{TF} (63°C)			
tempo (h)		branco	MnCl ₂	NaCl	CuSO ₄
0		161,86	166,26	158,92	168,64
0,42		158,73	169,00	156,33	166,53
0,83		156,37	163,33	153,69	164,17
1,25		153,28	156,00	149,74	162,50
1,67		151,92	139,44	149,03	157,65
		R_{TF} (65°C)			
tempo (h)		branco	MnCl ₂	NaCl	CuSO ₄
0		165,55	167,26	165,62	166,97
0,5		151,43	162,37	161,90	154,28
1		137,06	146,34	154,90	142,91
1,5		128,83	141,49	149,94	132,07

Tabela 15. Avaliação do filtrado e proteína imobilizada conservada após monitoramento da estabilidade em soluções salinas:

		$\Delta t = 8 \text{ h (60°C)}$			
		branco	MnCl ₂	NaCl	CuSO ₄
R_A^{filt}		2,01	1,29	1,15	1,49
R_{TF}^{filt}		79,23	49,36	38,74	54,13
R_P		86,48	x	83,89	74,98
		$\Delta t = 1,67 \text{ h (63°C)}$			
		branco	MnCl ₂	NaCl	CuSO ₄
R_A^{filt}		1,85	3,14	1,78	2,23
R_{TF}^{filt}		73,14	108,83	105,69	78,71
R_P		47,74	x	78,81	72,12
		$\Delta t = 1,5 \text{ h (65°C)}$			
		branco	MnCl ₂	NaCl	CuSO ₄
R_A^{filt}		8,21	3,87	19,19	15,06
R_{TF}^{filt}		68,25	144,14	120,55	117,93
R_P		33,71	x	60,65	50,99

Com base nos resultados obtidos para o aumento da estabilidade térmica da enzima imobilizada após a adição de sais, seria possível sugerir o emprego destes sais no meio de reação para ao aumentar a estabilidade, aumentar conseqüentemente sua meia-vida ampliando seu emprego biocatalítico. Alguns autores sugerem a imobilização do sal ativador da enzima no suporte ao invés de sua utilização em solução (CHAPLIN, 1990). Porém, é importante considerar a presença do sal no xarope final obtido e se sua concentração estaria dentro dos níveis permitidos.

Conforme citação de McAnena & O'Connor (em: HENRY & CHAPMAN, 2002) o cobre para algumas enzimas, age como componente alostérico, conferindo uma estrutura necessária à catálise. Os níveis permitidos deste metal em alimentos são ainda divergentes. A ingestão diária recomendada (IDR) de cobre para adultos nos EUA, Alemanha e no Brasil (BRASIL, 2005) é de respectivamente 1,24; 0,95 e 0,9 mg/dia. De acordo com a WHO (2005) e HENRY & CHAPMAN (2002) a concentração de 10 mg/L (mulher) e 12 mg/L (homem) de cobre tem sido utilizada pelo US Food and Nutrition Board como o maior nível de ingestão diária a que uma pessoa sadia pode se submeter durante toda sua vida sem causar danos à saúde. Os valores de cobre em água potável permitidos pela WHO(1998) e USEPA(2000) são de 2,0 e 1,3 mg/L respectivamente. No Brasil o limite máximo permitido de cobre e manganês em água potável engarrafada é de 1,0 e 0,5 mg/L respectivamente, sendo que a IDR para o manganês de acordo com a legislação brasileira é de 5 mg/dia (BRASIL, 2005). Para o sódio, encontramos referência feita pela FAO (2003) de uma IDR de 2400 mg/dia.

4.2.4. Efeito do pH sobre a estabilidade térmica

O efeito do pH na estabilidade térmica foi avaliado de acordo com o item 3.2.11.b. A Figura 8 apresenta em destaque um comparativo da estabilidade térmica da enzima imobilizada expressa por $t_{1/2}$ para todos os pHs avaliados. No canto superior da Figura 8, está representado o efeito do pH sobre $t_{1/2}$, expresso por t% (item 3.2.14) sempre em comparação com o valor obtido no pH 4,5 (branco). O erro padrão das amostras foi no mínimo de 0,05 e no máximo 0,96.

Pode-se observar que o pH 6,0 é o que maior efeito positivo apresenta em todas as temperaturas avaliadas, por exemplo, a 65°C a meia-vida obtida em pH 6,0 chega a ser 1,45 vezes maior que o pH padrão o que equivale a um efeito positivo de 45,14%. O pH 5,5 só apresentou efeito positivo a 63 e 65°C e o pH 6,5 somente a 65°C. Já os pHs 3,0 e 5,0 apresentaram os piores efeitos sobre a estabilidade enzimática, como por exemplo, um

efeito negativo de 52,99% a 65°C em pH 3,0 e um efeito negativo de 30,03% a 60°C em pH 5,0.

O poder da atividade de transfrutoseilação (R_{TF}) foi igualmente avaliado durante acompanhamento da estabilidade térmica, em soluções de estoque com diferentes pHs e está demonstrado na Tabela 16, de onde se observa que o pH 3,0 é o que maior dano causa a estabilidade enzimática. De forma geral, o poder de transfrutoseilação manteve-se alto nos outros pHs avaliados, a não ser na temperatura de 65°C.

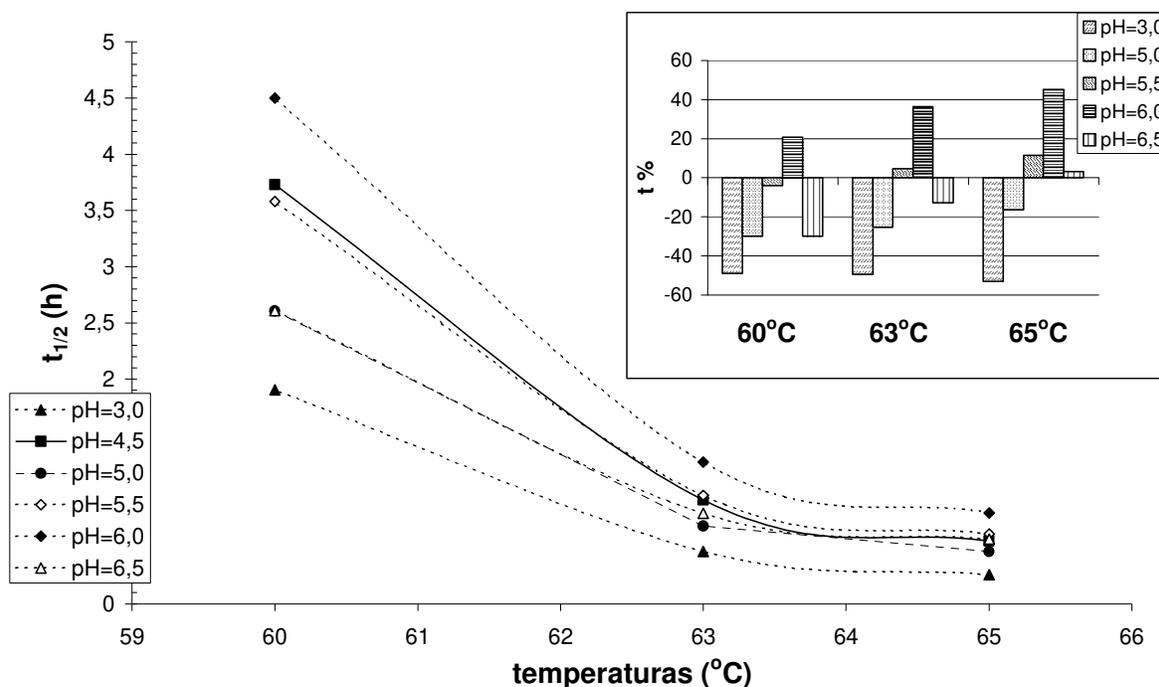


Figura 8. Estabilidade e efeito de diferentes pHs sobre a meia-vida da enzima FTase imobilizada em [NBI2]

O filtrado obtido após o tempo de incubação para cada temperatura foi avaliado quanto à atividade enzimática e proteína e os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 17. Da mesma forma como discutido na avaliação dos filtrados na análise dos sais, percebeu-se desprendimento da enzima imobilizada. De forma geral, pode-se dizer que os diferentes valores de pH não apresentam diferenciação para o desprendimento da enzima, pois os valores de R_A^{filt} , R_{TF}^{filt} e R_P não apresentaram tendências positivas ou negativas em função do pH.

Tabela 16. Valor médio das R_{TF} da enzima FTase imobilizada obtidas durante acompanhamento da estabilidade em meio estoque com diferentes pHs:

		R_{TF} (60°C)					
tempo (h)		pH 3,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
0		166,46	165,80	167,13	167,53	163,94	171,49
2		160,77	156,25	153,62	167,22	160,85	167,57
4		147,90	157,11	147,63	158,95	151,36	156,60
6		125,91	147,34	142,74	148,03	145,09	146,92
8		107,12	121,99	127,39	134,87	139,61	146,12
		R_{TF} (63°C)					
tempo (h)		pH 3,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
0		163,13	162,48	163,79	164,18	160,66	168,06
0,42		157,55	153,13	150,55	163,87	157,63	164,22
0,83		144,95	153,97	144,67	155,77	148,33	153,47
1,25		123,40	144,40	139,88	145,07	142,19	143,98
1,67		104,98	119,55	124,85	132,18	136,81	143,20
		R_{TF} (65°C)					
tempo (h)		pH 3,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
0		162,43	165,55	164,90	164,97	162,43	171,12
0,5		133,05	151,43	137,88	139,37	148,94	145,61
1		113,81	137,06	132,20	133,14	144,77	125,09
1,5		90,15	128,83	116,89	116,64	124,78	117,99

Tabela 17. Avaliação da atividade enzimática no filtrado e conservação da proteína imobilizada após tempo de incubação em diferentes pHs para a enzima FTase imobilizada em [NBI2]:

		$\Delta t = 8 \text{ h (60°C)}$					
		pH 3,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
R_A^{filt}		1,07	1,09	0,71	1,11	0,90	0,53
R_{TF}^{filt}		52,14	56,90	66,06	83,08	40,97	39,77
R_P		80,81	78,85	80,97	79,71	80,56	76,32
		$\Delta t = 1,67 \text{ h (63°C)}$					
		pH 3,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
R_A^{filt}		2,56	2,63	1,69	2,67	2,16	1,27
R_{TF}^{filt}		51,10	55,76	64,74	81,42	40,15	38,97
R_P		79,81	79,08	81,04	78,46	81,28	80,75
		$\Delta t = 1,5 \text{ h (65°C)}$					
		pH 3,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
R_A^{filt}		6,78	8,21	2,24	1,16	0,56	1,14
R_{TF}^{filt}		76,76	68,25	37,29	36,58	8,68	32,79
R_P		79,02	78,30	80,24	77,68	80,48	79,95

4.2.5. Perfil de pH

O perfil de pH apresentado pela enzima imobilizada foi avaliado conforme descrito no item 3.2.11.b e a Figura 9 apresenta os valores médios da atividade. Desta figura, pode-se identificar claramente a presença de dois picos distintos de máxima atividade correspondentes aos pHs 4,5 e 6,0. Para os valores de pH inferiores a 4,0 observou-se forte reação de hidrólise da sacarose independente da enzima ou do suporte, indicando que nessa faixa de pH a produção de FOS não é recomendada.

Na Tabela 18 encontramos os valores médios obtidos para a atividade transformados para R_A , sendo a atividade em pH 4,5 a atividade de referência (74,03 U_i), além dos valores de R_{TF} . Os valores de máxima atividade correspondem também aos maiores valores de R_{TF} , porém é importante observar que o pH 5,0 apresenta comportamento muito semelhante ao pH 6,0

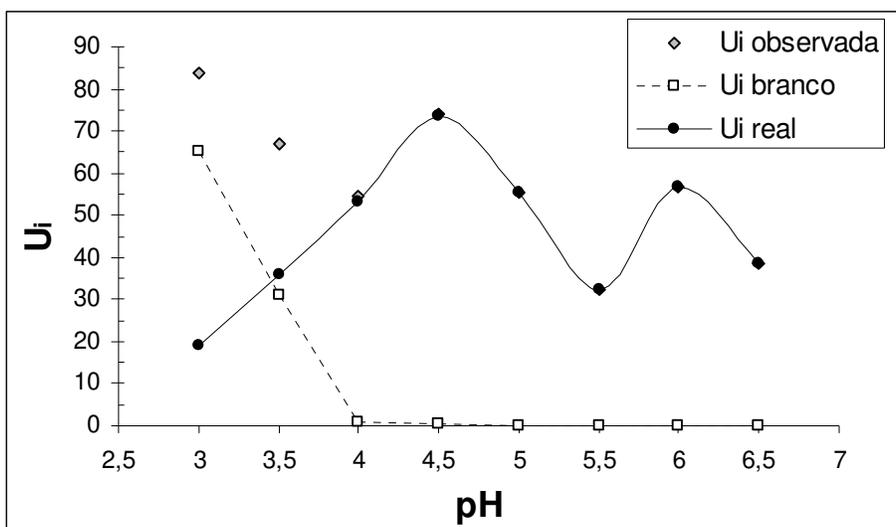


Figura 9. Perfil do efeito do pH sobre a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Com base nos resultados obtidos para a enzima livre apresentados no item 2.3.1 podemos dizer que na forma imobilizada, seu perfil de pH foi estendido para valores mais básicos (vide Figura A.a do Anexo I) se desconsiderarmos a formação clara de dois picos de máxima atividade e consideramos os valores de R_{TF} que se mantém altos a partir do pH 4,5.

Esta mudança de comportamento pode ser explicada, em grande parte, devido à carga negativa do suporte (item 2.5.4) e resultados semelhantes foram observados por RESHMI *et al* (2007) com o suporte zircônia. Com base nestes resultados, os pHs 4,5 e 6,0 foram selecionados para caracterização quanto ao perfil de temperatura, cinética e síntese de FOS por apresentarem atividade máxima e boa força de transfrutoseilação.

Tabela 18. Valores médios de R_A e R_{TF} obtidos para a análise do efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática:

pH	R_A medida	R_{TF} medida	R_A branco	R_{TF} branco	R_A real	R_{TF} real
3,0	113,33 ± 0,10	104,14 ± 0,60	74,95 ± 0,32	99,80 ± 0,35	38,37	34,39
3,5	90,65 ± 0,31	130,82 ± 2,15	41,00 ± 0,83	73,53 ± 0,77	49,65	31,02
4,0	73,41 ± 0,31	128,86 ± 1,49	1,09 ± 0,10	69,75 ± 3,09	72,32	55,34
4,5	100,00 ± 0,22	169,08 ± 0,94	0,58 ± 0,04	59,49 ± 3,78	99,42	109,59
5,0	74,84 ± 0,30	159,68 ± 2,16	ND	ND	74,84	159,68
5,5	43,42 ± 0,30	133,59 ± 2,79	ND	ND	43,32	133,59
6,0	76,47 ± 0,37	159,59 ± 0,19	ND	ND	76,47	159,59
6,5	51,99 ± 0,15	150,98 ± 0,64	ND	ND	51,99	150,98

ND=não foi possível determinar

4.2.6. Perfil de temperatura

O efeito da temperatura foi avaliado de acordo com o item 3.2.11.c e a Figura 10 representa os perfis obtidos para os pHs 4,5 e 6,0. A Tabela 19 apresenta os valores médios obtidos para R_A em cada temperatura avaliada, tendo como base a atividade obtida em pH 4,5/60°C.

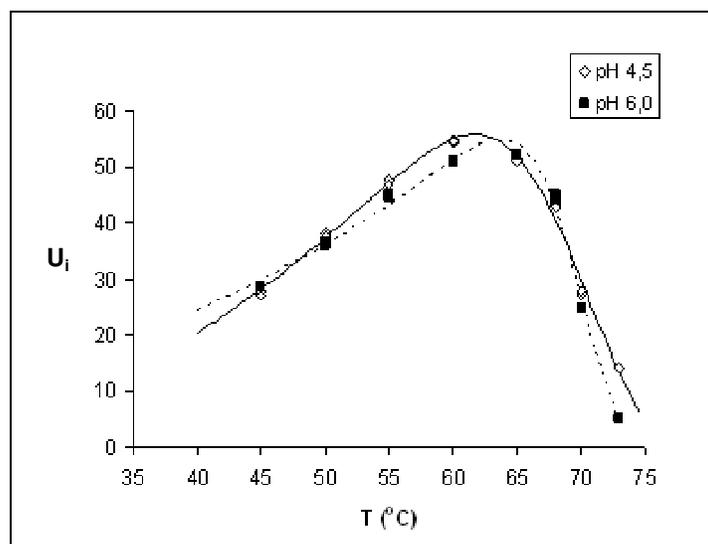


Figura 10. Perfis de temperatura obtidos nos pHs 4,5 e 6,0 com a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Com o auxílio do software matemático TableCurve 2D (SPSS, 1996) buscou-se uma equação que melhor se ajustasse aos pontos experimentais. Dois tipos de equações apresentaram melhores ajustes:

$$\ln y = \frac{a + cx}{1 + bx + dx^2} \quad \text{e} \quad \ln y = \frac{a + cx + ex^2}{1 + bx + dx^2}; \quad \text{com } R^2 \text{ de } 0,9896 \text{ e } 0,9895$$

respectivamente para os dois pHs avaliados.

Cabe aqui uma discussão a respeito desses tipos de equações que melhor se ajustaram aos dados experimentais: essas equações indicam que uma reação de primeira ordem não se encaixa no perfil observado. Portanto, são de fundamental importância estudos mais aprofundados sobre o assunto, para que uma equação adequada seja determinada.

Partindo-se destas equações e ainda com o auxílio do software, obteve-se a primeira derivada da equação selecionada. Por definição numérica, o valor onde a derivada se anula corresponde ao ponto de inflexão, dessa forma, foi obtido o valor correspondente à temperatura ótima de 61,73 e 63,81°C para o pH 4,5 e 6,0 respectivamente. Analisando a Figura 10, pode-se observar a diferença de inclinação entre a faixa de ativação e a faixa de desativação, separadas pelo valor de temperatura ótima, conforme discussão apresentada no item 2.5.3.b. Com relação a temperatura, é importante a comparação com a enzima livre (item 2.3.1) que apresentou maior estabilidade abaixo de 60°C e maior atividade em torno de 65°C.

Tabela 19. Valores médios de R_A e R_{TF} obtidos para avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática imobilizada em [NB12]:

T (°C)	pH 4,5		pH 6,0	
	R_A	R_{TF}	R_A	R_{TF}
45	50,55 ± 0,48	140,34 ± 0,14	52,42 ± 0,12	147,91 ± 0,31
50	69,66 ± 0,34	151,28 ± 1,24	66,37 ± 0,29	152,16 ± 0,97
55	87,07 ± 0,43	160,50 ± 1,29	82,39 ± 0,31	160,60 ± 0,25
60	100,00 ± 0,29	160,23 ± 1,31	93,50 ± 0,17	159,59 ± 0,19
65	94,04 ± 0,24	160,13 ± 2,78	95,74 ± 0,16	172,26 ± 1,26
68	79,18 ± 0,27	145,37 ± 0,67	81,93 ± 0,36	138,49 ± 0,35
70	50,60 ± 0,39	125,23 ± 1,19	45,56 ± 0,20	85,19 ± 0,69
73	25,98 ± 0,07	96,87 ± 3,65	9,46 ± 0,10	63,01 ± 1,60

A Tabela 19 demonstra ainda que foi obtido um alto valor de R_{TF} na temperatura de 65°C e pH 6,0 e que nas temperaturas seqüenciais, os valores de R_{TF} foram muito menores que os obtidos no pH 4,5. Até a temperatura de 60°C, o poder de transfrutossilagem permaneceu praticamente idêntico entre os pHs.

4.2.7. Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração do substrato foi avaliado conforme item 3.2.16. A Tabela 20 apresenta os valores médios da atividade enzimática imobilizada (U_i) obtida nos pHs 4,5 e 6,0. Desta tabela, observa-se que os valores obtidos para R_{TF} em pH 6,0 mantiveram-se altos em toda a faixa de concentração de sacarose avaliada, diferentemente do pH 4,5 que apresentou valores crescentes e decrescentes, isso

indica que a força de transfrutoseilação em pH 6,0 é maior que a de hidrólise da sacarose.

Tabela 20. Valores médios de U_i e R_{TF} obtidos para avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a atividade enzimática imobilizada em [NBI2]

S (g/L)	pH 4,5		pH 6,0	
	$v (U_i)$	R_{TF}	$v (U_i)$	R_{TF}
100	$27,23 \pm 0,11$	$92,25 \pm 2,23$	$22,08 \pm 0,04$	$142,77 \pm 0,76$
200	$44,83 \pm 0,17$	$122,70 \pm 1,61$	$35,65 \pm 0,17$	$146,85 \pm 0,99$
300	$56,88 \pm 0,09$	$143,98 \pm 1,58$	$43,69 \pm 0,37$	$152,68 \pm 1,23$
500	$74,03 \pm 0,22$	$162,35 \pm 1,58$	$56,71 \pm 0,53$	$159,59 \pm 0,19$
600	$67,46 \pm 0,24$	$149,24 \pm 1,56$	$50,06 \pm 0,10$	$146,19 \pm 1,29$
700	$52,00 \pm 0,29$	$86,70 \pm 1,57$	$43,48 \pm 0,26$	$140,56 \pm 1,06$

A Figura 11 representa um esboço do perfil da cinética apresentada em ambos os pHs; dessa figura pode-se observar claramente inibição pelo substrato na atividade da enzima imobilizada, diferentemente da enzima livre (item 4.1).

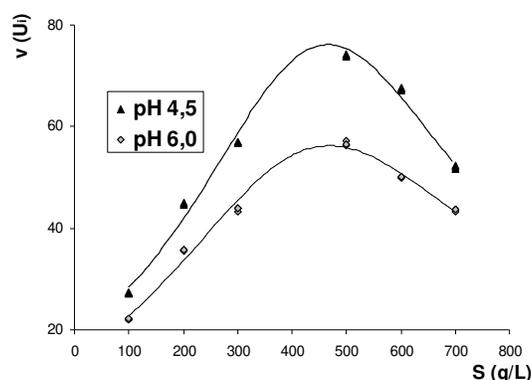


Figura 11. Esboço inicial dos perfis da atividade enzimática em função da concentração do substrato sacarose em pH 4,5 e 6,0 com a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Aplicando-se a metodologia de linearização dos dados experimentais por Lineweaver-Burke e Eadie-Hofstee (item 2.5.1), para obtenção das constantes cinéticas (item 3.2.16) observou-se que as constantes obtidas apresentaram grande semelhança entre si. A metodologia de linearização por Hanes (*Nature-London*; 184; 1296; 1959, citado em: DIXON & WEBB, 1979) também foi aplicada, mas, os valores obtidos foram muito diferentes em comparação com as outras duas metodologias (Tabela A no Anexo II), por esse motivo, apenas Lineweaver-Burke e Eadie-Hofstee foram considerados. A constante K_i foi obtida de acordo com a equação 02 e auxílio do software Table Curve 2D (SPSS, 1996) para cálculo da primeira derivada.

A Figura A, no Anexo I, representa as regressões obtidas que possibilitaram o cálculo das constantes apresentadas na Tabela 21. A Figura B neste mesmo anexo representa a regressão por Hanes, e ainda nesse mesmo anexo, a Figura C representa a relação das constantes calculadas por linearização e os dados experimentais.

Tabela 21. Constantes cinéticas obtidas por linearização dos dados por Lineweaver-Burke e Eadie-Hofstee em pH 4,5 e 6,0 para a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

constantes	pH 4,5	pH 6,0
V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	128,21	90,09
K_m (g/L)	374,20	314,74
K_i (g/L)	589,57	682,97

Porém, este método de linearização direta dos dados experimentais obtidos pode induzir a erros. Pensando dessa forma, as constantes foram recalculadas utilizando-se dessa vez o software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) partindo-se da equação 01. Os novos valores obtidos para as constantes cinéticas estão demonstrados na Tabela 22.

Tabela 22. Constantes cinéticas obtidas com o auxílio do software Statistica 5.5 em pH 4,5 e 6,0 para a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

constantes	pH 4,5	pH 6,0
V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	242,64	155,58
K_m (g/L)	369,09	505,10
K_i (g/L)	711,54	564,94
R^2	0,97085	0,98251

A Figura 12 confronta os pontos experimentais obtidos e os valores preditos pelo software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000). Pode-se observar que o ajuste dos pontos na faixa de concentração de sacarose maior que 500 g/L não foi ideal.

Essa falta de ajuste poderia ser explicada ou pela falta de ajuste ideal do modelo matemático ou por erros experimentais, sendo necessários, estudos aprofundados com relação à cinética enzimática imobilizada. A Tabela B, no Anexo II, apresenta os desvios absolutos apresentados pelos dados experimentais com relação aos preditos.

No Anexo I, Figura D, podemos observar a diferença de ajuste apresentado ao se empregar as constantes calculadas por linearização e as obtidas pelo software

Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000). As equações obtidas com as constantes obtidas por linearização apresentaram ajuste inferior em ambos os pHs avaliados.

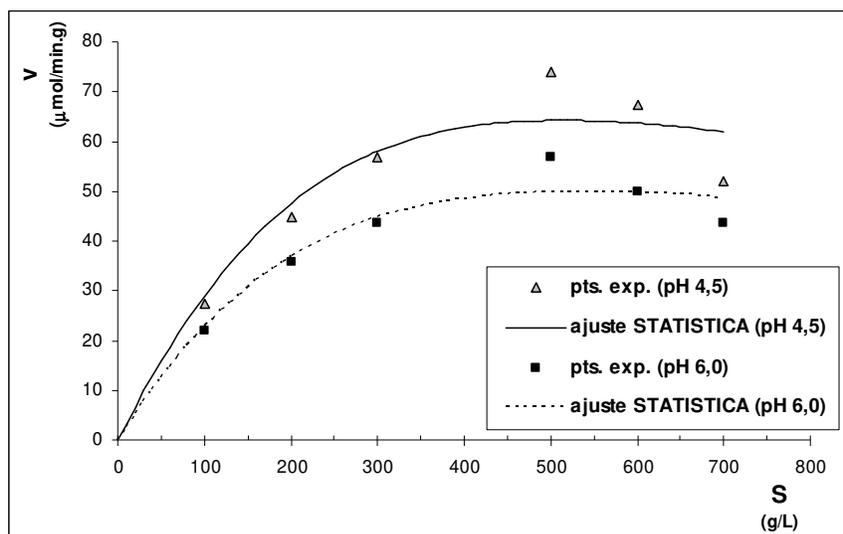


Figura 12. Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da enzima FTase imobilizada em [NBI2]. Dados obtidos experimentalmente (pontos) e dados preditos pelo software Statistica (linhas)

Comparando os resultados obtidos (Tabela 22) com a enzima livre (item 2.3.1), percebe-se que a imobilização causou um aumento no valor de K_m de 299 quase 370 g/L em pH 4,5 e cerca de 505 g/L em pH 6,0, o que significa que a imobilização afetou de forma negativa a afinidade da enzima pelo substrato. Isso pode ser parcialmente explicado por efeitos difusivos causados pela imobilização da enzima, conforme discutido no item 2.4.6.

GHAZI *et al.* (2006) obteve para a enzima frutossiltransferase de *A. aculeatus*, em sua forma livre, um K_m aproximado de 192,6 g/L e CHIANG *et al.* (1997) observou que a ligação covalente da enzima ao suporte fez com que houvesse um aumento no valor de K_m (de 20 para 30 g/L) além de diminuir consideravelmente a energia de ativação. TANRISEVEN & ASLAN (2005) também observaram um aumento do valor de K_m após imobilização do mesmo preparado enzimático utilizado por GHAZI *et al.* (2005), de 47 para 91 g/L.

4.2.8. Parâmetros da estabilidade térmica

Conforme descrito no item 3.2.11.c, a estabilidade da enzima imobilizada expressa pelo valor $R_A^†$ foi monitorada ao longo do tempo em diferentes temperaturas, o desvio padrão dos pontos foi de no mínimo 0,20 e máximo 0,67. Destes valores, foi calculado o valor k_d (item 3.2.12), obtendo-se regressões com R^2 de 0,93 a 0,98. Os valores obtidos da constante k_d foram utilizados para o cálculo de $t_{1/2}$ (item 3.2.14), do

valor D (item 3.2.15) e dos parâmetros termodinâmicos (item 3.2.16) estes valores estão demonstrados na Tabela 23 para as temperaturas acima de 53°C.

Os valores obtidos para k_d e $t_{1/2}$ (Tabela 24) não se ajustaram aos demais pontos, seguindo uma tendência diferente daquela expressa pelo modelo de Arrhenius, e que necessita investigação mais aprofundada. Por este motivo, os dados destas temperaturas não foram utilizados no cálculo de E_{ad} , D , z e parâmetros termodinâmicos. No cálculo de E_{ad} , de acordo com item 3.2.13, obteve-se regressão com R^2 de 0,99 para ambos os pHs, como demonstrado na Figura 13. De forma semelhante, no cálculo do valor z como descrito no item 3.2.15 e demonstrado na Figura 14, obteve-se ótima regressão dos valores. Os valores obtidos para E_{ad} e valor z estão demonstrados na Tabela 25 para os pHs avaliados.

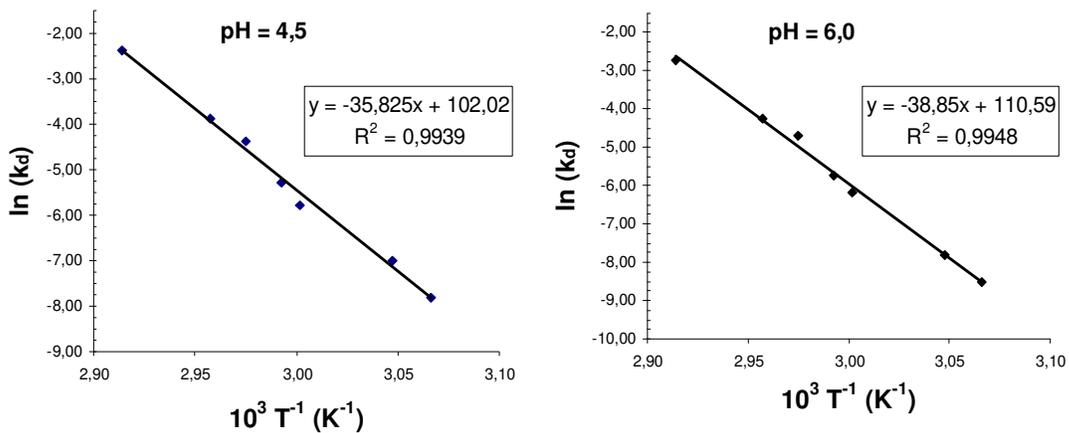


Figura 13. Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para cálculo de E_{ad} nos pHs 4,5 e 6,0 com a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

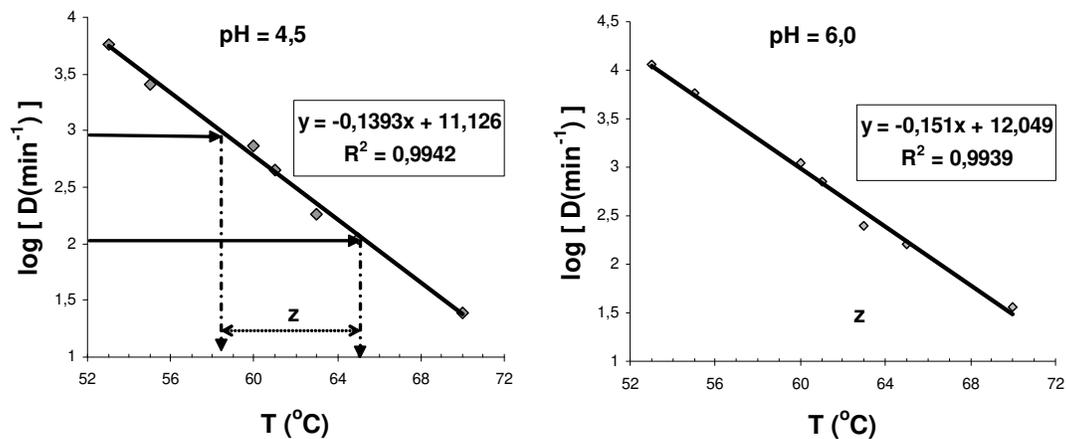


Figura 14. Linearização da redução decimal nos pHs 4,5 e 6,0 para cálculo do valor z da enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Tabela 23. Valores obtidos em pH 4,5 e 6,0 e diferentes temperaturas para k_d , $t_{1/2}$, D e parâmetros termodinâmicos para enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Temperaturas (°C)	k_d (min^{-1})		$t_{1/2}$ (h)		D (min^{-1})		ΔG (kJmol^{-1})		ΔH (kJmol^{-1})		ΔS ($\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)	
	pH 4,5	pH 6,0	pH 4,5	pH 6,0	pH 4,5	pH 6,0	pH 4,5	pH 6,0	pH 4,5	pH 6,0	pH 4,5	pH 6,0
53	0,0004	0,0002	28,88	57,76	5756,5	11512	81,05	82,93	295,14	320,29	656,40	727,75
55	0,0009	0,0004	12,84	28,88	2558,44	5756,5	79,32	81,53	295,12	320,27	657,53	727,53
60	0,0031	0,0021	3,73	5,50	742,77	1096,48	77,06	78,14	295,12	320,23	657,63	726,67
61	0,0051	0,0032	2,27	3,61	451,49	719,56	75,90	77,20	295,07	320,22	655,90	727,67
63	0,0125	0,0092	0,92	1,26	184,21	250,28	73,83	14,69	295,05	320,20	658,10	730,37
65	0,0207	0,0143	0,56	0,81	111,24	161,02	72,84	73,88	295,04	320,19	657,10	728,40
70	0,0930	0,0646	0,12	0,18	24,76	35,64	69,59	70,63	295,00	320,15	656,88	727,14

Tabela 24. Valores obtidos em pH 4,5 e 6,0 nas temperaturas de 48 e 50°C para k_d , $t_{1/2}$ para enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Temperaturas (°C)	k_d (min^{-1})		$t_{1/2}$ (dias)	
	pH 4,5 (10^{-5})	pH 6,0 (10^{-6})	pH 4,5	pH 6,0
48	1,496	6,662	32,18	72,25
50	2,007	9,991	23,98	48,18

O valor D reflete uma maior estabilidade em pH 6,0 indicando que a redução a 10% da atividade enzimática inicial é mais lenta que em pH 4,5 uma vez que os valores de D obtidos são sempre maiores para o pH 6,0. Com relação ao valor z, se igualarmos as equações das regressões lineares obtidas conforme indicado na Figura 14, obtemos o valor de 78,89°C. Nessa temperatura haveria igualdade entre os valores D para os pHs avaliados.

Para o cálculo de uma temperatura equivalente a 78,89°C onde o valor D seria aumentado em 10 vezes, subtraiu-se o valor z da temperatura 78,89°C. Para o pH 4,5 essa temperatura seria 71,71°C e para o pH 6,0 seria 72,27°C. Esse cálculo demonstra que em pH 6,0 a enzima apresenta realmente maior estabilidade térmica com uma diferença de cerca de 1°C a mais do que a enzima poderia suportar em pH 4,5.

Comparando-se os resultados obtidos para a enzima livre (vide item 2.3.1) e imobilizada para E_{ad} e $t_{1/2}$ vê-se claramente que a imobilização no suporte inorgânico [NBI2] não aumentou a estabilidade térmica da enzima. Esta característica pode ser em parte explicada pela natureza do suporte (item 3.1.3.b) e do tipo de ligação da enzima ao suporte. Por comparação, GHAZI *et al.* (2006) obteve para a enzima frutossiltransferase de *A. aculeatus*, presente num preparado enzimático em sua forma livre, uma meia-vida em torno de 24 horas numa faixa de temperatura de 30 a 60°C e em temperaturas acima de 65°C foi observada inativação da enzima.

Tabela 25. Valores obtidos para E_{ad} e z em pH 4,5 e 6,0 para enzima FTase imobilizada em [NBI2]

Parâmetros termodinâmicos	E_{ad} (kJmol ⁻¹)	z (°C)
pH 4,5	297,85	7,1787
pH 6,0	323,00	6,6225

As equações 38 e 39, obtidas de acordo com o item 3.2.14, representam a relação entre a meia-vida da enzima imobilizada e a temperatura.

$$\text{pH 4,5: } t_{1/2} = -3,421 \cdot 10^{-45} \cdot e^{\frac{35,825}{T}} \quad (38)$$

$$\text{pH 6,0: } t_{1/2} = -6,489 \cdot 10^{-49} \cdot e^{\frac{38,85}{T}} \quad (39)$$

A Figura 15 representa o ajuste entre os dados obtidos experimentalmente (quadrados e losângulos) e os preditos por essas equações (linha tracejada) nas

temperaturas de 53 a 70°C. Com o auxílio do software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) o ajuste apresentou R^2 de 0,9978 e 0,9999 em pH 4,5 e 6,0 respectivamente.

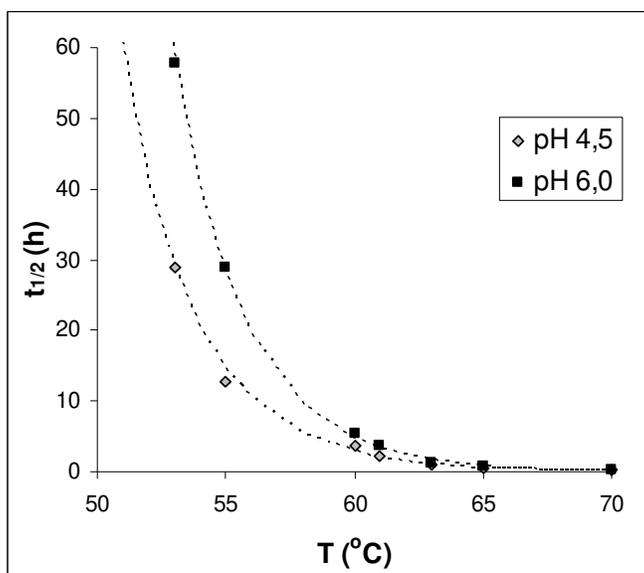


Figura 15. Meia-vida em pH 4,5 e 6,0 para a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

A Tabela 26 confronta os valores obtidos experimentalmente e aqueles preditos pelas equações 38 e 39, assim como seus valores residuais. Para esta faixa de temperatura, o ajuste foi muito bom.

Tabela 26. Meia-vida da enzima FTase imobilizada, dados obtidos experimentalmente e preditos pelas equações e seus valores residuais

T (°C)	pH 4,5			pH 6,0		
	t _{1/2} ^{expmt.} (h)	t _{1/2} ^{predito} (h)	Desvio relativo (%) [exp. - prdt./ exp.]100%	t _{1/2} ^{expmt.} (h)	t _{1/2} ^{predito} (h)	Desvio relativo (%) [exp. - prdt./ exp.]100%
53	28,88	28,82	0,21	57,76	58,33	-0,99
55	12,84	14,76	-14,95	28,88	28,22	2,29
60	3,73	2,87	23,06	5,50	4,77	13,27
61	2,26	2,08	7,96	3,61	3,37	6,65
63	0,92	1,10	-19,57	1,26	1,69	-34,13
65	0,56	0,58	-3,57	0,81	0,85	-4,94
70	0,12	0,12	0,00	0,18	0,16	11,11

Porém, os valores obtidos por extrapolação das Equações 39 e 40, para as temperaturas 48 e 50°C, foram muito discrepantes em relação aos dados experimentais obtidos, como pode ser observado na Tabela 27. E como mencionado anteriormente,

estes dados não se ajustaram as regressões obtidas para cálculo de E_{ad} e z . Estudos mais sistemáticos devem ser realizados para esclarecer este tipo de comportamento que sugere um comportamento mais complexo que o de primeira ordem.

Tabela 27. Comparativo da meia-vida calculada a partir dos dados experimentais em pH 4,5 e 6,0 e a meia-vida obtida por extrapolação das equações:

	T (°C)	$t_{1/2}$ (dias) Experimental	$t_{1/2}$ (dias) Extrapolado	Desvio relativo (%) [exp. – extrp./ exp.]100%
pH 4,5	48	32,18	6,64	79,37
	50	23,98	3,33	86,11
pH 6,0	48	72,25	15,53	78,51
	50	48,18	7,34	84,77

A Tabela 23 apresenta ainda os valores calculados conforme item 3.2.16 para ΔG , ΔH e ΔS . Os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) mostram claramente que com o aumento da temperatura há uma clara redução da energia livre para ambos os pHs avaliados, sendo que o pH 6,0 apresenta valores maiores de energia que o pH 4,5, demonstrando mais uma vez uma maior estabilidade enzimática nesse pH. Para a entalpia (ΔH), podemos observar que seu valor praticamente não se altera com o aumento da temperatura o que indica que a entalpia não é fortemente dependente da temperatura em que o sistema se encontra. Com relação a entropia (ΔS) os valores calculados não demonstraram claramente um aumento da entropia com o aumento da temperatura. Em COBOS & ESTRADA (2003) percebemos que a partir de uma determinada temperatura o valor de ΔS apresentou um incremento, indicando uma faixa onde a desnaturação se intensificava. Como os valores das energias ΔG , ΔH e ΔS foram todos obtidos em função do k_d calculado a partir dos dados experimentais, é provável que algum erro experimental tenha se refletido nos cálculos.

4.2.9. Síntese de FOS

Os testes com a enzima imobilizada em sínteses utilizando micro-reatores foram realizados conforme item 3.2.17. Um primeiro teste foi realizado com um volume de reação de 10 mL e uma razão de síntese (R_s) de 7,0. O rendimento da conversão de sacarose em FOS totais e a composição de cada FOS no total produzido estão demonstrados na Tabela 28.

Tabela 28. Conversão e composição dos FOS obtidos em teste inicial de sínteses por 72 horas em pH 4,5 e 6,0

(%)	pH 4,5		pH 6,0	
	24 h	72 h	24 h	72 h
FOS	49,1	66,45	43,0	58,33
GF₂	95,9	73,15	96,8	88,04
GF₃	4,1	25,64	3,2	11,59
GF₄	x	1,21	x	0,37

Em seguida, novas sínteses em duplicatas foram conduzidas em micro-reatores com 5,0 mL de meio de reação e R_S de 7,0 e 14,0. As sínteses tiveram duração prolongada para 96 horas e a conversão e composição dos FOS obtidos estão demonstrados na Tabela 29. Observa-se que ao dobrar R_S houve um pequeno acréscimo na conversão de FOS, sendo necessários estudos complementares para otimização da síntese com enzima imobilizada.

As Figuras E e F, no Anexo I, apresentam os perfis de concentrações dos açúcares obtidos para cada condição de síntese e a Figura G representa a composição de cada FOS ao longo da síntese. Os perfis de concentração de açúcares obtidos foram semelhantes aos obtidos com a enzima livre por HERNALSTEENS (2006) e ALVARADO (2006). Observou-se que com 24 horas a composição dos FOS obtidos era em maioria de GF₂ e uma obtenção considerável de GF₃ e GF₄ só era obtida por volta de 48 horas.

Tabela 29. Conversão e composição dos FOS obtidos em sínteses após 96 h de sínteses em pH 4,5 e 6,0 com diferentes R_S :

(%)	pH 4,5				pH 6,0			
	$R_S = 7,0$		$R_S = 14,0$		$R_S = 7,0$		$R_S = 14,0$	
	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
FOS	44,24	55,38	52,14	56,38	29,68	57,46	52,27	58,96
GF₂	78,49	36,62	85,33	35,06	53,28	45,67	93,90	42,43
GF₃	19,55	54,71	32,13	57,60	56,19	53,56	19,88	57,12
GF₄	1,96	8,67	0,4	9,16	57,46	4,53	4,39	6,93

HERNALSTEENS (2006) obteve em síntese com a enzima extracelular de *Rhodotorula* sp. conduzida em tampão acetato 0,05M, pH 5,0, R_S de 6,5 e 50% de sacarose um rendimento de 63% após 72 horas. Por comparação, citamos GHAZI *et al.* (2006), que em síntese contendo inicialmente 60% de sacarose, R_S de 5,0 por 24 horas e a 60°C, obteve um rendimento de 60,7% de FOS. Em trabalho anterior (GHAZI *et al.*, 2005), utilizando a enzima na sua forma imobilizada, a síntese a partir de 63% de

sacarose, R_s de 0,3 e a 60°C obteve-se um rendimento de 61,5% após 36 horas. CHIANG *et al.* (1997) observou não haver alteração no rendimento da enzima β -frutofuranosidase, imobilizada em polímero metacrilado poroso em comparação com a forma livre, obtendo 61% de rendimento partindo de uma solução de 50% de sacarose e R_s de 7,5 em 17 horas de reação. TANRISEVEN & ASLAN (2005) também observaram não haver alteração do rendimento com a imobilização e obtiveram um rendimento de 57% para síntese de FOS após 24 horas a partir de uma solução contendo 60% de sacarose.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de estudos sobre o comportamento da enzima imobilizada aplicada em biorreator de leito fixo, sendo necessário para isso uma fase inicial de estudos de sínteses em microreatores do tipo mistura para seleção de variáveis estatisticamente significativas e só então conduzir estudos em leito fixo para otimização das variáveis selecionadas.

4.2.10. Custos

De acordo com cotação de preços realizada em 04 de dezembro de 2006, o custo de cada metodologia está demonstrado na Tabela 30 e não leva em consideração o custo da água destilada, do suporte ou outros custos variáveis envolvidos no processo, apenas o custo dos reagentes químicos envolvidos. Os cálculos foram feitos para obtenção de 1 kg de suporte inorgânico de acordo com as metodologias descritas nos itens: 3.1.3.a, 3.1.3.d e 3.1.3.e.

Tabela 30. Custo com reagentes químicos para cada metodologia de preparo e imobilização enzimática em suporte inorgânico:

Metodologia	R\$ / kg
SAI(2h)	240,29
SAI(2)	197,90
AI(2h)	139,79
AI(2)	97,40
I(2h)	81,80
I(2)	39,41

Considerando que um suporte inorgânico ideal permite sua reutilização, o custo demonstrado nesta tabela pode ser encarado como o custo fixo para reutilização do suporte uma vez que não considera o custo de obtenção do suporte. Na Tabela 03 podemos encontrar o custo de alguns suportes. A metodologia [I(2)] é de todas as metodologias avaliadas a de menor custo e menor complexidade de etapas.

5. CONCLUSÕES

- A imobilização em suporte sólido ácido diminuiu a meia-vida observada em comparação com a enzima livre, mas ainda assim, observou-se boa estabilidade em pH 4,5 e 6,0, sendo o pH 6,0 o de maior estabilidade.

- O perfil de pH ótimo da enzima imobilizada demonstrou alongamento em comparação com a enzima livre, sendo observado dois pontos de máxima atividade nos pHs 4,5 e 6,0.

- A adição de sais ao meio de incubação demonstrou aumentar a estabilidade térmica da enzima.

- A imobilização demonstrou alterar a cinética enzimática que apresentou perfil de inibição pelo substrato, fato não observado com a enzima livre.

- A síntese de FOS utilizando enzima imobilizada demonstrou aumento de conversão proporcional ao aumentar da razão R_S .

- A metodologia de adsorção da enzima não-orientada em duas etapas [I(2)] é a de menor custo e complexidade dentre as metodologias avaliadas, porém a característica química da ligação entre a enzima e o suporte é fraca quando comparada com ligações do tipo covalente.

- O suporte inorgânico a base de nióbio demonstrou grandes possibilidades de aplicação e sendo necessário a condução de estudos seqüenciais que possibilitem uma maior estabilidade à enzima quer seja modificando o tipo de tratamento químico do suporte quer seja na forma de imobilização.

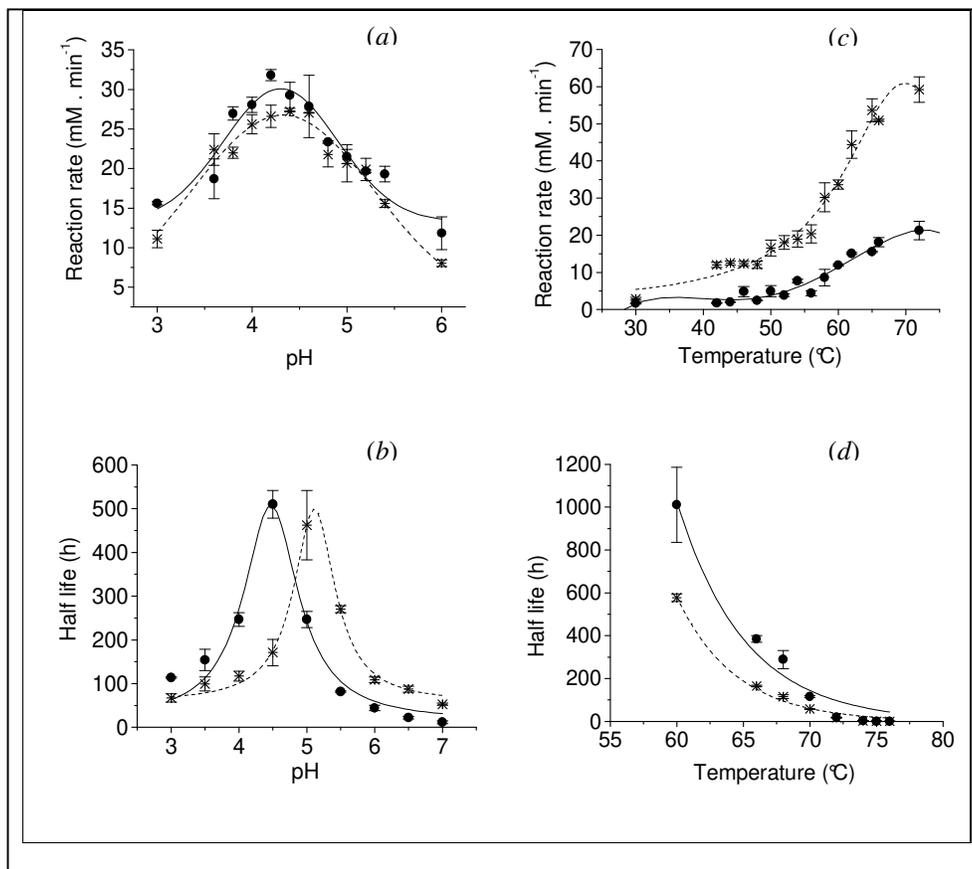
Sugestões para trabalhos futuros

- Caracterizar o composto sólido ácido composto por nióbio e grafite obtido pela metodologia [N-B].
- Avaliar possíveis metodologias de preparo do suporte (silanização/ativação) que permitam uma maior eficiência de imobilização e maior estabilidade térmica.
- Avaliar a possibilidade do emprego de sais no meio de síntese tendo em vista uma melhor produção de FOS.
- Avaliar o efeito da presença de sais durante a imobilização ou outro composto que possa aumentar a eficiência de imobilização e também sua estabilidade.

- Avaliar comportamento matemático que descreva o perfil de temperatura da enzima imobilizada.
- Realizar estudos sobre a estabilidade térmica da enzima ($t_{1/2}$) em função da temperatura especialmente numa faixa de temperaturas inferiores a 50°C, definindo assim uma equação matemática que melhor descreva o comportamento observado.
- Realizar estudos mais aprofundados referentes à cinética enzimática, definindo uma equação matemática ideal.
- Avaliar o comportamento da enzima imobilizada em coluna de leito fixo. Este estudo fornecerá dados imprescindíveis para escalonamento industrial e possibilidades de aplicação.

- ANEXO I

Figura A: Perfis obtidos com a enzima Ftase de *Rhodotorula* sp. na sua forma livre para as atividades hidrolítica (●) e de transfrutoseilação (*): (a) pH-atividade enzimática; (b) pH-estabilidade enzimática; (c) temperatura-atividade enzimática; (d) temperatura-estabilidade enzimática.



Fonte: HERALSTEENS, 2006

Figura B: Linearização dos dados experimentais em pH 4,5 e 6,0 para cálculo das constantes cinéticas v_{max} e K_m da enzima FTase imobilizada em [NB12]

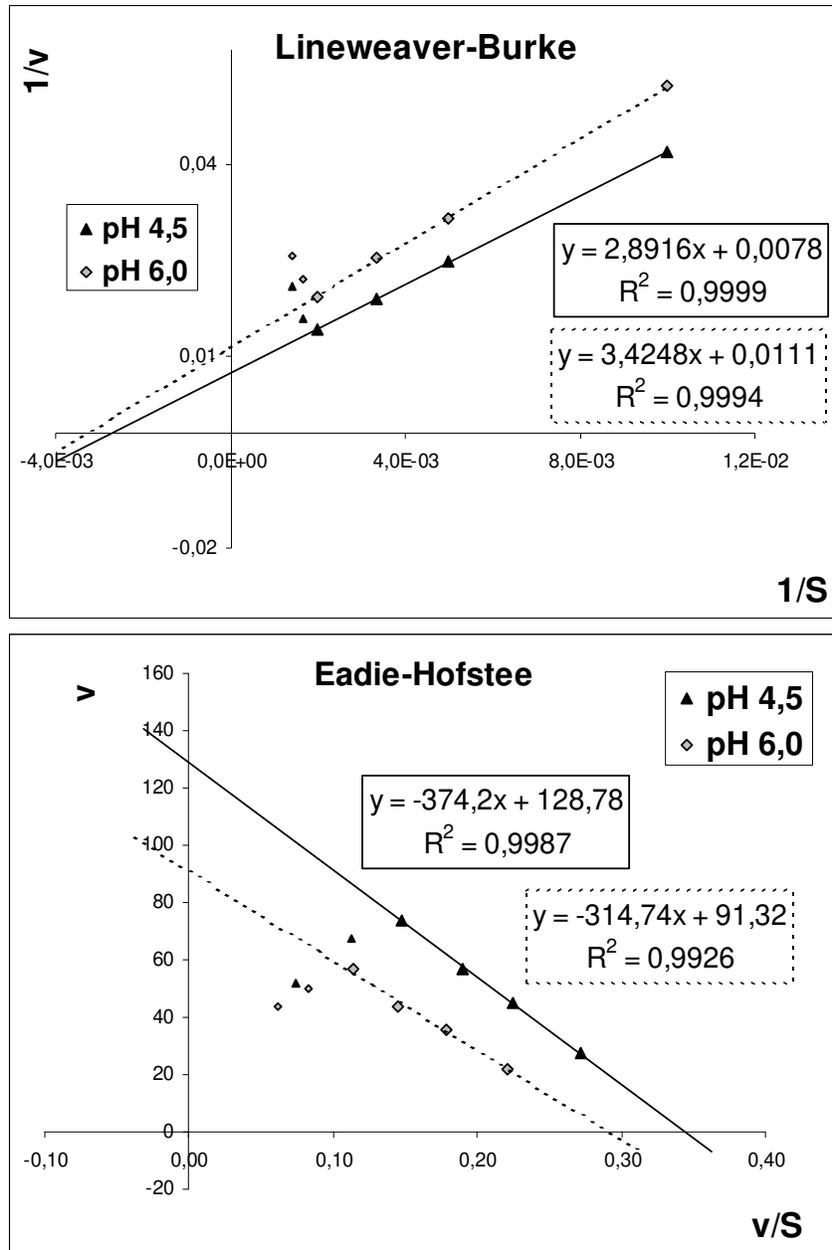


Figura C: Linearização dos dados experimentais por Hanes para cálculo das constantes cinéticas v_{\max} e K_m da enzima FTase imobilizada em [NBI2]

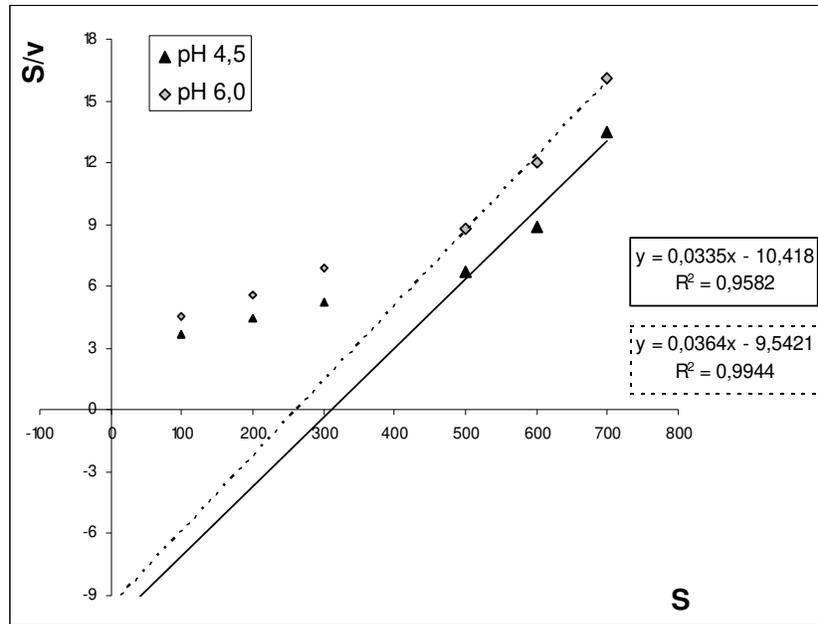


Figura D: Relação entre os dados experimentais e as constantes cinéticas calculadas em pH 4,5 e 6,0 da enzima FTase imobilizada em [NBI2]

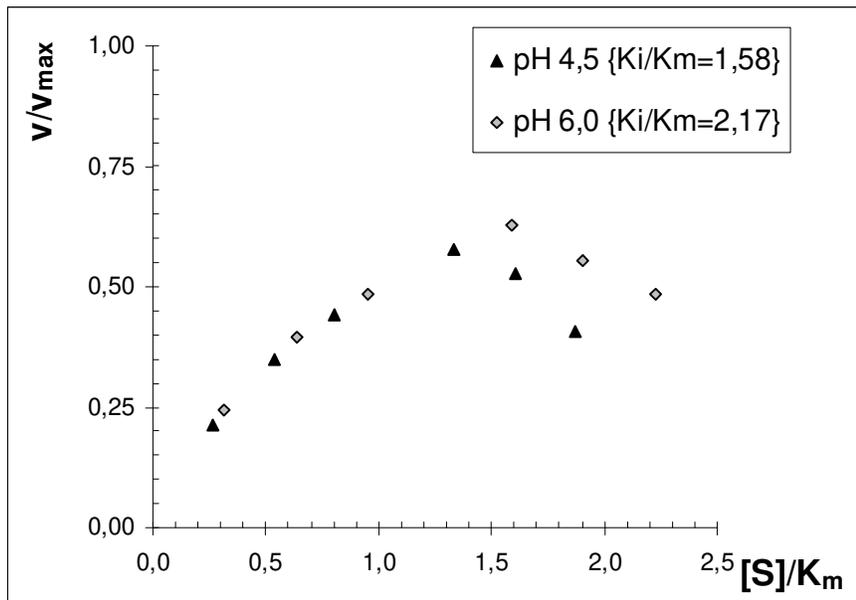


Figura E: Comparativo entre os perfis de atividade da enzima FTase imobilizada em [NBI2] em função da concentração de sacarose nos pHs 4,5 e 6,0 utilizando as constantes calculadas por linearização e pelo software Statistica 5.5

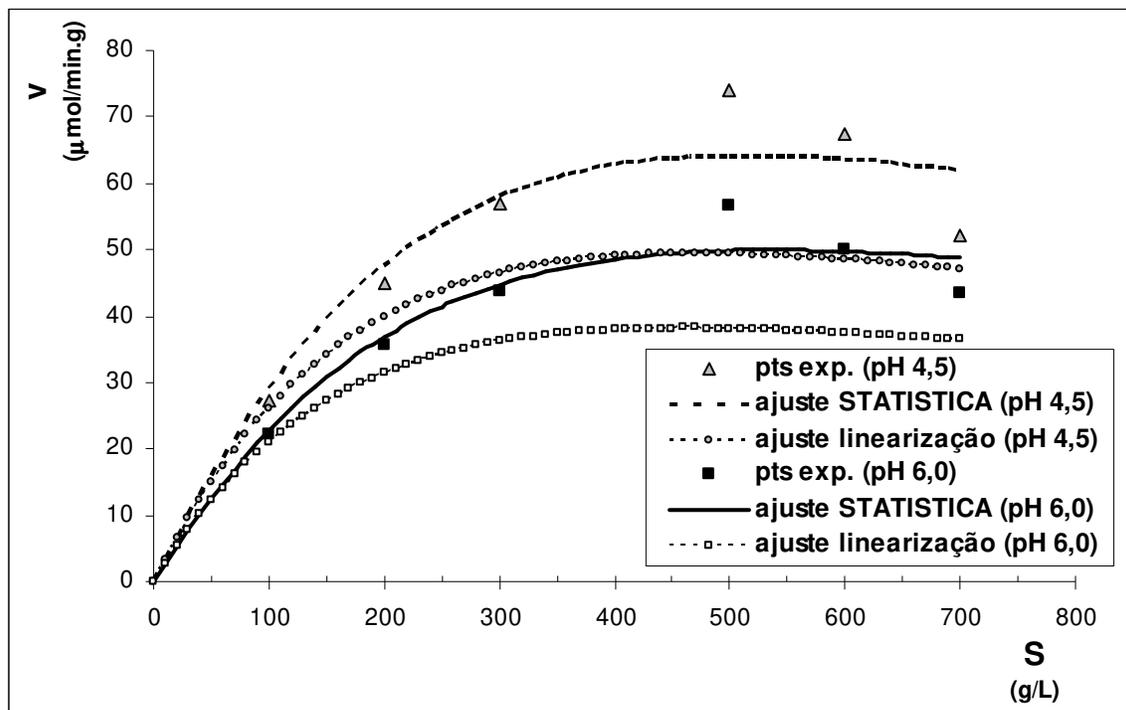


Figura F: Perfil de concentração de açúcares obtidos em síntese com pH 4,5 e diferentes R_s utilizando a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

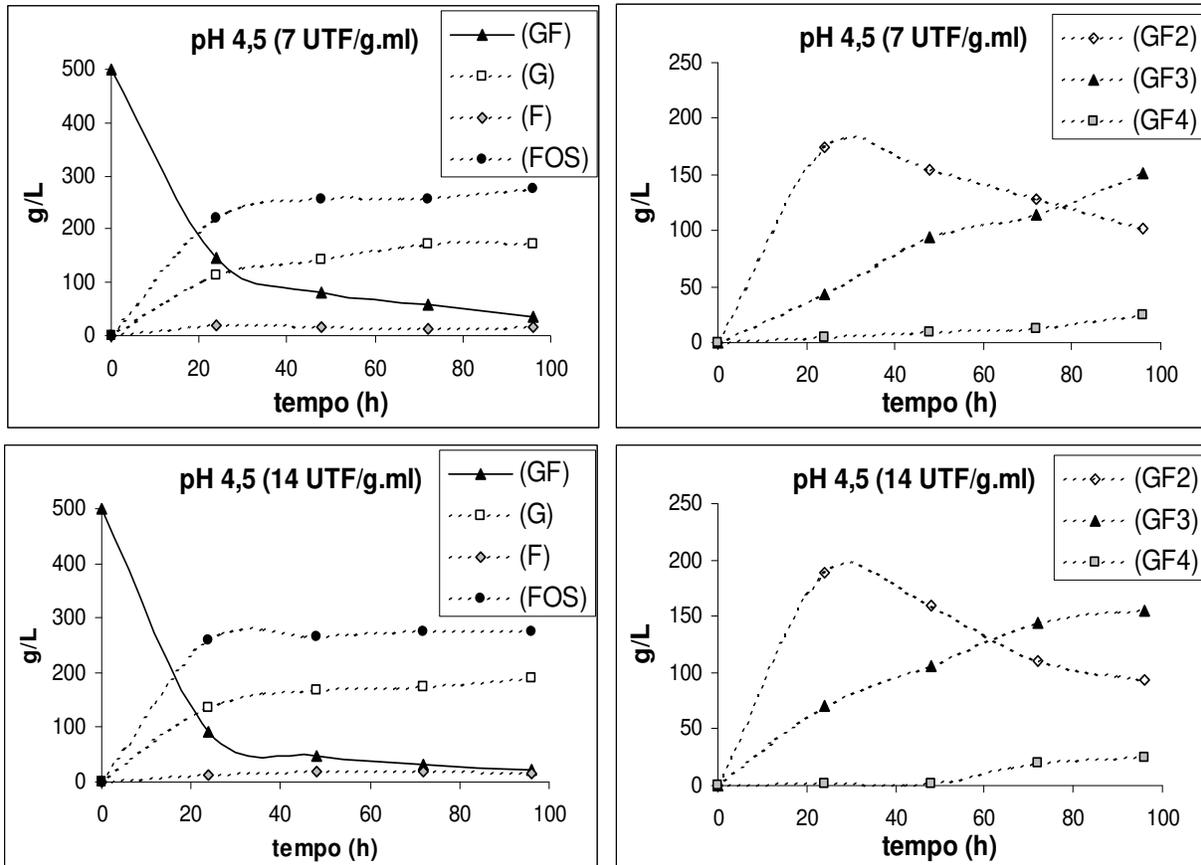


Figura G: Perfil de concentração de açúcares obtidos em síntese com pH 6,0 e diferentes R_s utilizando a enzima FTase imobilizada em [NBI2]

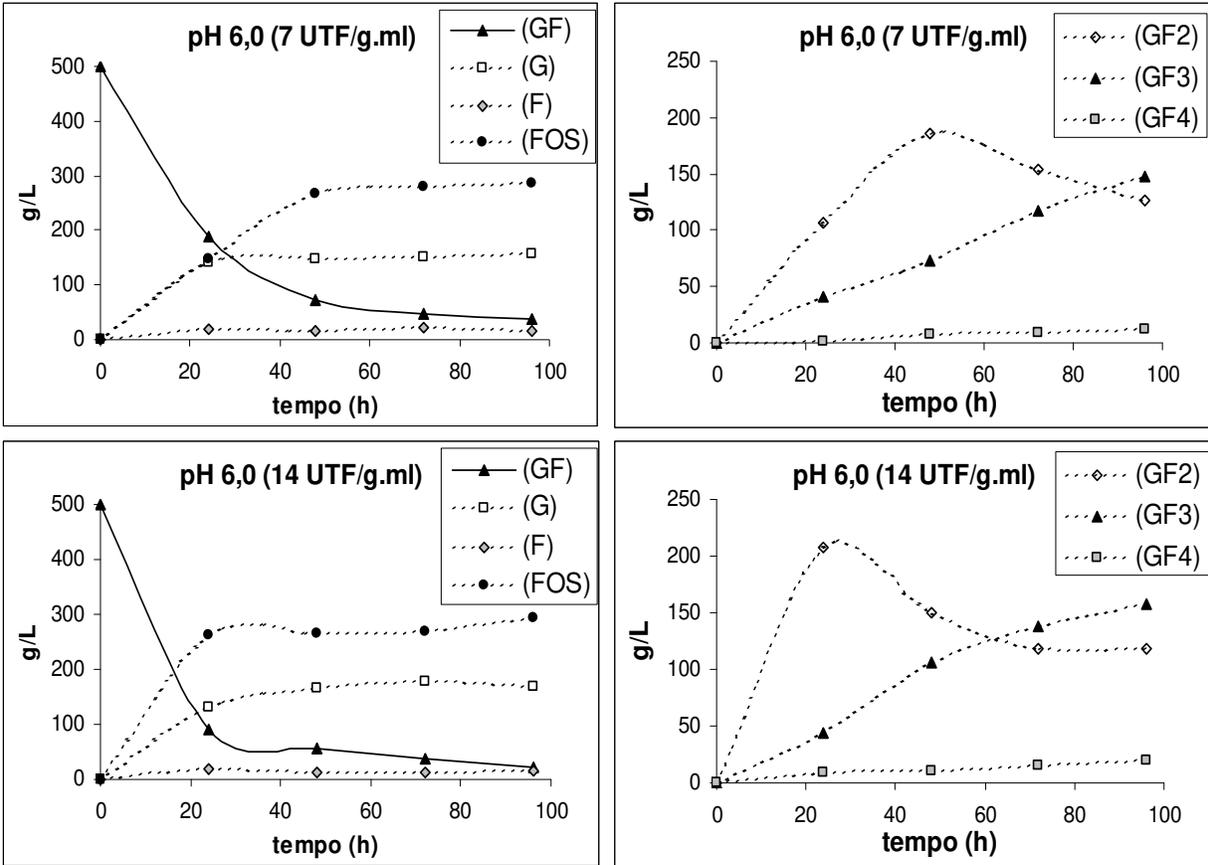
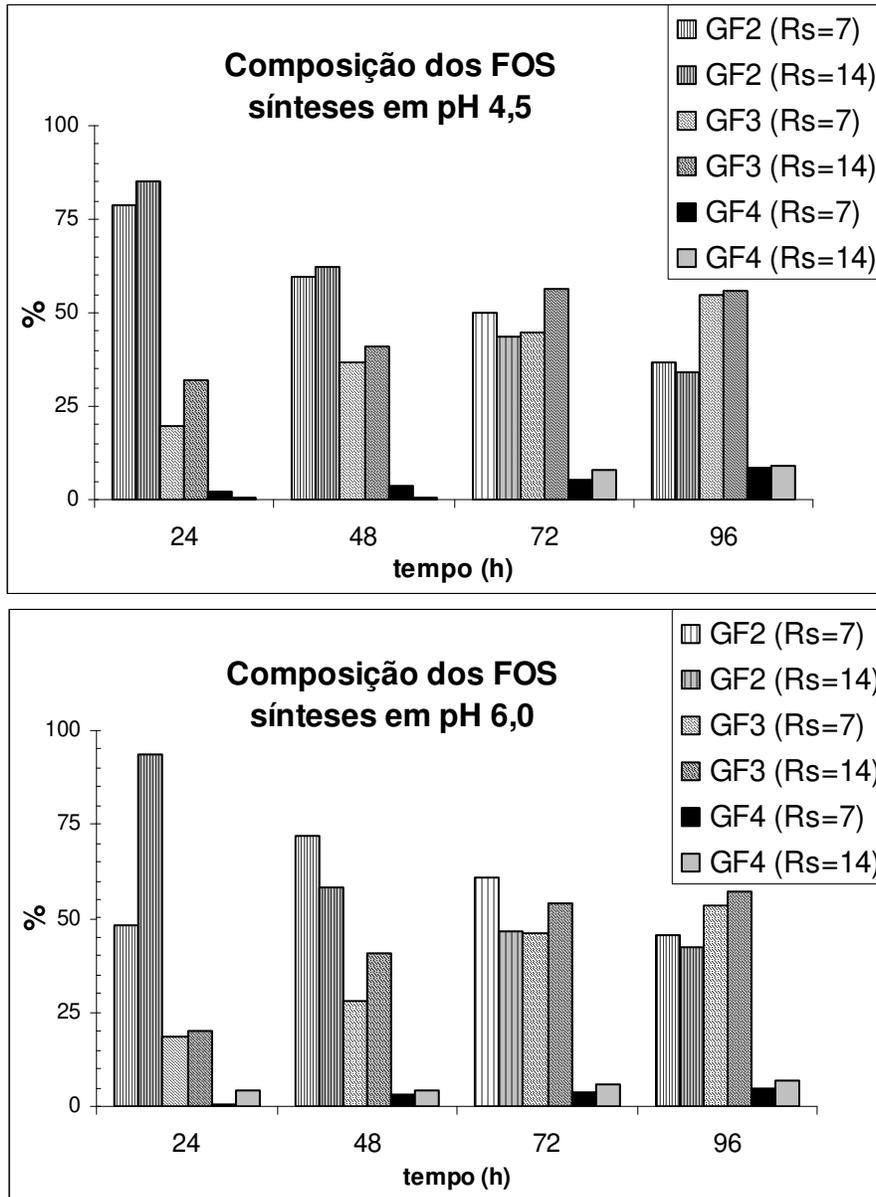


Figura H: Perfil de composição dos FOS obtidos durante sínteses nos pHs 4,5 e 6,0 e diferentes R_s utilizando a enzima FTase imobilizada em [NBI2]



7. ANEXO II

Tabela A. Constantes cinéticas calculadas por linearização de Hanes para enzima FTase imobilizada em [NBI2]

constantes	pH 4,5	pH 6,0
v_{\max} (U_i)	29,85	27,47
K_m (g/L)	310,99	262,15
K_i (g/L)	709,41	820,00

Tabela B. Desvios absolutos no cálculo das constantes cinéticas pelo Statistica 5.5 com enzima FTase imobilizada em [NBI2]

S (g/L)	$ v^{\text{observado}} - v^{\text{predito}} $	
	pH 4,5	pH 6,0
100	1,703	0,636
200	2,750	1,211
300	1,104	1,054
500	9,802	6,838
600	3,801	0,345
700	10,008	5,243

Tabela C: Resumo das informações disponíveis no banco de dados BRENDA (2007) sobre as duas classificações atualmente conflitantes na literatura, frutossiltransferase e frutofuranosidase:

Nome recomendado	Enzima	
	EC.2.4.1.9	EC 3.2.1.26
Nome sistemático	Inulosucrose	β -frutofuranosidase
Sinônimos	Frutossiltransferase, sacarose 1-frutossiltransferase	β -D-frutofuranosidase ou frutohidrolase
Reações	Transferase (grupos frutossil e hexosil)	Frutossilinvertase, β -frutosidase, invertase ácida, sacarase
Organismos	Bacillus mascerans, Helianthus tuberosus, Lactobacillus reuteri, Leuconostoc citreum	Hidrólise de terminais não redutores de resíduos β -D-frutofuranosídeos; hidrólise de ligações O-glicosídicas
Atividade de transferase	Todos os microrganismos citados acima sendo que a enzima de Bacillus macerans produz GF4 e GF5 a partir da sacarose	Diversas classificações de <i>Aspergillus</i> e de <i>Lactobacillus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bifidobacterium infantis</i> ; <i>Clostridium perfringens</i> e <i>acetobutlicum</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Kluyveromyces fragilis</i> ; <i>Sacharomyces cerevisiae</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>
Atividade de hidrolase	<i>Lactobacillus reuteri</i> e <i>Leuconostoc citreum</i>	Especialmente em <i>B. infantis</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. pullulans</i> ; <i>B. infantis</i> e <i>R. glutinis</i> (que não apresentou atividade de hidrolase a 1 M de sacarose)
Inibidores	Cu^{2+} (1M) causa 98% de inibição e EDTA causa 100% de inibição na enz. de <i>L. reuteri</i> além dos íons Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+}	Ag^+ para enzima de diversos microrganismos; frutose para enzima de <i>C. perfringens</i>
Ativadores	Ca^{2+} ativa enzima de <i>L. reuteri</i> ; $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ (10mM) aumenta em 15 vezes a estabilidade da enz. de <i>B. masceran</i> e Fe^{2+} , K^+ e Mg^{2+} aumentam levemente sua estabilidade	Ativação da enz. de <i>R. glutinis</i> por Ca^{2+} (3,4x), Co^{2+} (1,7x), Cu^{2+} (2x), Mg^{2+} (3x) e Na^+ (2x) todos a 5 mM; EDTA (10mM) aumenta em 47% atividade da enz. de <i>C. perfringens</i>
k_m	99,2 mM (sacarose) para enz. de <i>L. citreum</i>	227 mM (sacarose) para enzima de <i>R. glutinis</i>
pH ótimo	6,5 (<i>L. citreum</i>); 6,0 (<i>B. mascerans</i>); 5,4 (<i>L. reuteri</i>)	pH 4,5 ótimo sendo que em pH 4 retém 70% da atividade ótima e em pH 5 retém 60% (<i>R. glutinis</i>)
Estabilidade em pH	XXX	Estável na faixa 2,6-5,5 e pH 8,0/30 min 93% perda de atividade; pH 6,0/30 min 10% perda (<i>R. glutinis</i>)
Temperatura ótima	55°C com Ca^{2+} e 37°C com EDTA (<i>L. reuteri</i>); 30°C (<i>L. citreum</i>)	60°C (<i>A. niger</i>)
Faixa de temperatura	20-60°C (<i>L. reuteri</i>)	50-60°C (<i>A. niger</i>)
Aplicação	Biotecnologia, síntese de inulina (<i>L. citreum</i>)	Enzimas podem ser candidatas a processamento de leite de soja (<i>A. fumigatus</i>); hidrólise da sacarose com enz. imob. em alginato (<i>S. cerevisiae</i>)

8. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ALFAYA, A. A. S.; GUSHIKEM, Y.; CASTRO, S. C.; **Silica-zirconia-phosphate composites: a study of their synthesis, proton exchange capacity and ammonia gas adsorption**; *Microporous and Mesoporous Material*; v. 39; pp. 57-65; 2000
- ALVARADO, M. B. H.; **Estudo da cinética de sínteses de oligossacarídeos pela enzima extracelular de *Rhodotorula* sp.**; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Tese de Doutorado em andamento; 2007
- ANGELIS, R. C.; **Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde**; *Arquivos em Gastroenterologia*; v.38; n. 4; pp. 269-271; 2001
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M.; **Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production of Fructooligosaccharides**; *Chemical Papers*; v. 55; n. 6; pp. 350-358; 2001
- ANTUNES, A. E. C.; **Influencia do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probiótica nas propriedades de iogurtes naturais desnatados**; Tese de Doutorado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Campinas-SP; 219 pp.; 2004
- ARICA, M. Y.; HASIRCI, V.; ALAEDDINOĞLU, N. G.; **Covalent immobilization of α -amilase onto pHEMA microspheres: preparation and application to fixed bed reactor**; *Biomaterials*; v, 16; pp. 761-768; 1995
- ARROYO, M.; **Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones**; *Ars Pharmaceutica*; v. 39, n. 2; pp. 23-39; 1998
- AZEVEDO, A. M.; CABRAL, J. S. M.; GIBSON, T. D.; FONSECA, L. P.; **Operation and performance of analytical packed-bed reactors with an immobilized alcohol oxidase**; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; v. 28; pp. 45-53; 2004
- BACIU, I. E.; JÖRDENING, H. J.; SEIBEL, J.; BUCHHOLZ, K.; **Investigations of the transfructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogues galactosyl-fructoside**; *Journal of Biotechnology*; v. 116; n. 4; pp. 347-357; 2005
- van-BELIEN, J. B.; LI, Z.; **Enzyme technology: an overview**; *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, l. 4; pp. 338-344; 2002
- BICKERSTAFF, G. F.; **Immobilization of Enzymes and Cells**; *Methods in Biotechnology 1*; Human Press, New Jersey; 367 pp.; 1997
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S.; **Biochemical Engineering**; Marcel Dekker; New York; 702 pp.; 1997
- BRASIL; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Resolução RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005**; Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitamina e minerais; *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF*; 07 out.; Seção 1; 2005
- BRASIL; Agência Nacional da Vigilância Sanitária; **Portaria 398, 30 de abril de 1999**; *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF*; 3 maio; Seção 1; 1999
- BRENDA; **Enzyme Database-BRENDA**; 2007; disponível em: <http://www.brenda.uni-koeln.de/> em 18/02/07

- BORDIGNON, P.; CARNEIRO, T.; TAGUSAGAWA, S.; HULKA, K.; **Usos e usuários finais do nióbio**; Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração; 2006; disponível em: http://www.cbmm.com.br/portug/sources/uses/f_uses.htm em 31/12/06
- BRODELIUS, P.; MOSBACH, K.; **Immobilized Plant Cells**; Advances in Applied Microbiology; v. 28; pp. 1-26; 1982
- BUCKE, C.; **Carbohydrate Biotechnology Protocols**; Methods in Biotechnology; Human Press; New Jersey; 337 pp.; 1999
- BRUINS, M. E.; THEWESSEN, A. J. H.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M.; **Enzyme inactivation due to Maillard reactions during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase: influence of enzyme immobilization**; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; v. 21; pp. 31-34; 2003
- BRUKE, C.; **Methods of Immobilizing Cells**, In: WEBB, C.; BLACK, G. M.; ATKINSON, B.; Process Engineering Aspects of Immobilized Cells Systems; Institution of Chemical Engineers-Northwestern Branch, England, pp. 20-34; 1984
- CABRAL, J. M. S.; BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J.; **Applied Biocatalysis**; Harwood Academic Publishers; Holland; 467 pp.; 1993
- CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; KENNEDY, J. F.; CARDOSO, J.P.; **Immobilization of biocatalysts on new route transition metal-activated inorganic supports**; Enzyme and Microbial Technology; v. 5; pp. 30-32; 1983
- CAMPOS, E. A.; GUSHIKEM, Y.; GONÇALVES, M. C.; CASTRO, S. C.; **Preparation and Characterization of Niobium Oxide Coated Cellulose Fiber**; Journal of Colloid and Interface Science; v. 180; pp. 453-459; 1996
- CASTRO, H. F.; SILVA, M. C. C. P.; SILVA, G. L. J. P.; **Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipases**; Brazilian Journal of Chemical Engineering; v. 17; n 4/7; pp. 849-857; 2000
- CATANA, R.; ELOY, M.; ROCHA, J. R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P.; **Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis**; Food Chemistry; v. 101; pp. 260-266; 2007
- CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P.; **Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis**; Food Chemistry; v. 91; pp. 517-520; 2005
- [CBMM] COMPANHIA BRASILEIRA DE METALURGIA E MINERAÇÃO; **NB-340®**; Technical Report; 2006
- [CBMM] COMPANHIA BRASILEIRA DE METALURGIA E MINERAÇÃO; **Niobium Compounds, Making, Use and Applications in Heterogeneous catalysis**; Informe comercial da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração; 2006
- CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C.; **Enzyme Technology**; Cambridge University Press; 264 pp.; 1990

- CHEETHAM, P. S. J.; **Physical studies on the mechanical stability of columns of calcium alginate gel pellets containing entrapped microbial cells**; Enzyme and Microbial Technology; v. 1; pp. 183-188; 1979
- CHEN, Z.; IIZUKA, T.; TANABE, K.; **Niobic acid as an efficient catalyst for vapor phase esterification of ethyl alcohol with acetic acid**; Chemistry Letters; pp. 1085-1088; 1984
- CHEN, W.; LIU, C.; **Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus***; Enzyme and Microbial Technology; v.18; n.2; pp.153-160; 1996
- CHEN, Y. Z.; LIAW, B. J.; TAN, H. R.; SHEN, K. L.; **One-step synthesis of methyl isobutyl ketone from acetone and hydrogen over Pd/(Nb₂O₅/SiO₂) catalysts**; Applied Catalysis A: General; v. 205; pp. 61-69; 2001
- CHIANG, C. J.; LEE, W. C.; SHEU, D. C.; DUAN, K. J.; **Immobilization of β -Fructofuranosidase from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides**; Biotechnology and Progress; v. 13; pp. 577-582; 1997
- CHO, Y.J.; PARK, O.J.; SHIN, H. J.; **Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trehalose**; Enzyme and Microbial Technology; v. 39; pp. 108-113; 2006
- [CIF] COMPANHIA INDUSTRIAL FLUMINENSE; **História**; 2006; disponível em: <http://www.cif.ind.br> em 20 de dezembro de 2006
- CLEARFILED, A; **Inorganic Ion Exchange Materials**; CRC Press; Florida; 290 pp.; 1982
- COBOS, A.; ESTRADA, P.; **Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414**; Enzyme and Microbial Technology; n. 33; pp. 810-818; 2003
- COLEMAN, P.; WALKER, M. M.; MILBRATH, D. S.; STAUFFER, D. M.; RASMUSSEN, J. K.; KREPSKI, L. R.; HEILMANN, S. M.; **Immobilization of Protein A at high density on azlactone-functional polymeric beads and their use in affinity chromatography**; Journal of Chromatography, v. 512; pp. 345-363; 1990
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. BONATO, P. S.; **Introdução a métodos cromatográficos**; 7^a ed.; Editora da UNICAMP; Campinas, SP; 298 pp.; 1997
- CORNISH-BOWDEN, A.; **Fundamentals of Enzyme Kinetics**; Portland Press; 343 pp.; 1995.
- CORNISH-BOWDEN, A.; CÁRDENAS, M. L.; **Handling Equilibrium Processes Embedded in Metabolic Systems**; The Chemical Theatre of Biological Systems; May 24th-28th; 2004
- CRUZ, R., CRUZ, V. D.; BELINI, M. Z.; BELOTE, J. G.; VIEIRA, C. V.; **Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate**; Bioresource Technology. V. 65; l. 1-2; pp. 139-143; 1998
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; **Gastrointestinal effects of prebiotics**; British Journal of Nutrition; v. 87; suppl. 2; pp. S145-S151; 2002

- DATKA, J.; TUREK, A. M.; JEHNG, J. M.; WACHS, I. E.; **Acidic properties of supported niobium oxide catalysis: an infrared spectroscopy investigation**; Journal of Catalysis; v. 135; pp. 186-199; 1992
- DAVOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R. W. S.; **Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis***; Applied Biochemistry and Microbiology; v.40; n. 4; pp. 392-397; 2004
- DIXON, M.; WEBB, E. C.; **Enzymes**; 3rd Ed.; Academic Press; New York; 1116 pp.; 1979
- DORAN, P. M.; **Bioprocess Engineering Principles**; Academic Press; New York; 439 pp.; 2002
- EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U.; **Polyacrilamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization**; Food Chemistry; v. 97; pp. 591-597; 2006
- FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry: a textbook**; 4th Ed.; Springer; New York; 453 pp.; 1997
- [FAO] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; **Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases**; WHO Technical Report Series; n. 916; Geneva, 2003; disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/ac911e/ac911e00.htm>
- FIELDS, P. A.; **Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility**; Comparative Biochemistry and Physiology Part A; n.129; pp. 417-431; 2001
- FRANCHINI, A. S.; SEGANFREDO, C.; **As 100 melhores histórias da mitologia – deuses, heróis, monstros e guerras da tradição greco-romana**; 450 pp.; LP&M; 2003
- FRANCISCO, M. S. P.; CARDOSO, W. S.; GUSHIKEM; **Carbon paste electrodes of the mixed oxides $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ prepared by the sol-gel method: dissolved dioxygen sensor**; Journal of Electroanalytical Chemistry; v. 574; pp. 291-297; 2005
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; **Microbiologia dos Alimentos**; Editora Atheneu; São Paulo; 182 pp.; 2003
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C.; **Microbiología de los alimentos**; 3^a. Ed.; Editorial Acribia S.A.; Zaragoza; 522 pp.; 1991
- FREITAS, S. M. L.; **Utilização de alginato de sódio em texturizados de suco misto de laranja e cenoura de valor energético reduzido**; Dissertação de Mestrado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Campinas-SP; 110 pp.; 1999
- GASPARI, J. W.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A.; **Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L.**; Scientia Agricola; v. 56; n. 4; supl. Piracicaba; pp. 1135-1140; 1999
- GHAZI, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J.; **Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus***; Journal of Biotechnology; 8 pp.; 2006; doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.09.017
- GAZHI, I.; de SEGURA, A. G.; FERNÁNDEZ-ARROJO, L.; ALCALDE, M.; YATES, M.; ROJAS-CERVANTES, L.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; **Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sephabeads EC for the synthesis of fructooligosaccharides**; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; v. 35; I 1-3; pp. 19-27; 2005

- GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B.; **Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics**; Nutrition Research Reviews; v. 17; pp. 259-275; 2004
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B.; **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of prebiotics**; The Journal of Nutrition; v. 125; n. 6; pp. 1401-1412; June; 1995
- GOLDBERG, I. *et al.*; **Functional foods – Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals**; Chapman & Hall, Inc.; Israel; 571 pp.; 1994
- GOPINATH, S.; SUGUNAN, S.; **Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity**; Applied Clay Science; v. 35; pp. 67-75; 2007
- GRIFFIN, I. J.; DAVILA, P. M.; ABRAMS, S. A.; **Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes**; British Journal of Nutrition; v. 87; suppl. 2; pp. S187-S191; 2002
- GUIGOZ, Y.; ROCHAT, F.; PERRUISSEAU-CARRIER, I.; ROCHAT, I.; SCHIFFRIN, E. J.; **Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people**; Nutrition Research; v. 22; pp. 13-25; 2002
- GUISÁN, J. M.; **Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes**; Enzyme and Microbial Technology; v. 10, pp.375-382; 1988
- GUSHIKEM, Y.; ROSATTO, S. S.; **Metal oxide thin grafted on silica gel surfaces: recent advances on the analytical application of these materials**; Journal of the Brazilian Chemical Society; v. 12; n. 6; pp. 695-705; 2001
- HARTEMEIER, W.; **Immobilized Biocatalysts: an introduction**; Springer-Verlag; New York; 212 pp.; 1998
- HARTEMINK, R.; van LAERE, K. M. L.; ROMBOUTS, F.M.; **Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides**; Journal of Applied Microbiology, v. 83; pp. 367-374; 1997
- HENRY, C. J. K.; CHAPMAN C.; **The Nutrition Handbook for food processors**; Woodhead Publishing Limited; England; 483 pp.; 2002
- HERNALSTEENS, S.; **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileira**; Tese de Doutorado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Campinas-SP; 186 pp.; 2006
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; **Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides**; Biochemical Society Transaction; v. 19; pp. 561-565; 1991
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; **A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611**; Agricultural Biological Chemical; v. 52; n. 5; pp. 1181-1187; 1988
- HULST, A. C.; TRAMPER, J.; **Immobilized plant cells: a literature survey**; Enzyme Microbial Technology; v. 11; pp. 66-73; 1989

- JAY, J. M.; **Microbiología Moderna de los Alimentos**; Tercera edición; Editorial Acribia S.A.; España; 804 pp.; 1992
- JEHNG; J. M.; WACHS, I. E.; **Molecular design of supported niobium oxide catalysts**; *Catalysis Today*; v. 16; pp. 417-426; 1993
- JUNG, K. H. J.; YUN, J. W.; KANG, K. R.; LIM, J. Y.; **Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose**; *Enzyme Microbial Technology*; v. 11; pp. 491-494; 1989
- KASCHE, V.; **Correlation of experimental and theoretical data for artificial and natural systems with immobilized biocatalysts**; *Enzyme and Microbial Technology*; v. 5; pp. 2-13; 1983
- KROLL, D.; **GA-100 Functional/Designer Foods and Beverages: Trends and Developments for Marketers**; Business Communications Company, Inc.; Outubro 1997, disponível em 15/11/06 em: <http://www.bccresearch.com/fod/FOD013B.asp>
- KUEK, C.; ARMITAGE, T. M.; **Scanning electron microscopic examination of calcium alginate beads immobilizing growing mycelia of *Aspergillus phoenicus***; *Enzyme Microbial and Technology*, v. 7; pp. 121-125; 1985
- LAM, S.; MALIKIN, G.; **Analytical applications of immobilized enzyme reactors**; Blackie Academic & Professional; Glasgow; 276 pp.; 1994
- LASKIN, A. I.; **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**; Biotechnology Series; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc; California; 312 pp.; 1985
- L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, S.; **Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023**; *Journal of Biotechnology*, v. 81; pp. 73-84; 2000
- LOO; J. V.; **The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy**; *Nutrition Research Reviews*; v. 17; pp. 89-98; 2004
- LOPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C. FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M.; **Stabilization of different alcohol oxidase via immobilization and post immobilization techniques**; *Enzyme and Microbial Technology*; v. 40; pp. 278-284; 2007
- LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUIÁN, J. M.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; **Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports**; *Journal of Biotechnology*; v. 119; pp. 70-75; 2005
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; **Protein measurement with the Folin phenol reagent**; *Journal of Biology and Chemistry*; v. 193; pp. 265-275; 1951
- MANOLOV, R. J.; KAMBOUROVA, M. S.; EMANUILOVA, E. I.; **Immobilization and properties of *Bacillus stearothermophilus* pullulanase**; *Biotechnology and Applied Biochemistry*; v. 18; pp. 409-415; 1993
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, R.; GUIÁN, J. M.; **Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial**

- enzymes via very intense multipoint covalent attachment**; Biotechnology Progress; v. 18; n. 3; pp. 629-634; 2002
- MAUGERI, F.; BERNAL, O. L.; M., MUKUNO, J. L.; **Alimento Funcional Composição Probiótica, Composição Alimentícia e Processo de Produção de Alimento Funcional Fermentado a Base de Soja, Contendo Agentes Probióticos e Prebióticos**; Universidade Estadual de Campinas; BR; Pedido de Patente PI0404152-6; Outubro 2004
- MAUGERI, F.; PINHEIRO, S. A.; **Produção de xarope de açúcar contendo frutose e glicose, enriquecido ou não com frutooligossacarídeos, a partir de sacarose**; Universidade Estadual de Campinas; BR; Pedido de Patente PI 0202602-3; Fevereiro 2002.
- MEDEIROS, F.P.; **Obtenção e caracterização de fosfatos de zircônio amorfo e cristalino a partir de cloreto de zirconila proveniente da zirconila brasileira para uso como trocador iônico**; Dissertação de Mestrado; Escola de Engenharia de Lorena; Faculdade de Engenharia Química; Lorena-SP; 73 pp.; 1994
- MELANDER, W. R.; CORRADINI, D.; HORVÁTH, C.; **Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography**; Journal of Chromatography; v. 317; pp. 67-85; 1984
- MENDES, G. L.; **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados**; Dissertação de mestrado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Campinas-SP; 81 pp.; 2006
- MESSING, R. A.; **Immobilized enzymes for industrial reactors**; Academic Press; New York; 232 pp.; 1975
- MIRANDA, M.; **Aprimoramento do procedimento de imobilização da lipase microbiana em óxido de nióbio para modificação de óleos vegetais**; Dissertação de Mestrado; Escola de Engenharia de Lorena; Faculdade de Engenharia Química; Lorena-SP; 116 pp.; 2004
- MODELL, M.; REID, R. C.; **Thermodynamics and its applications**; Prentice-Hall; 2nd ed.; New Jersey; 448 pp.; 1983
- MOSCATTO, J. A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; HAULY, M. C. O.; **Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate**; Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas; v. 24; n. 4; pp. 634-640; 2004
- NELSON, N.; **A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose**; Journal Biological Chemical; v. 153, pp. 375-380; 1944
- NÓBREGA, F. J.; TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; *et al.*; **Efeitos do probiótico (oligossacarídeos) em leite em pó modificado na flora intestinal: comparação com leite em pó modificado sem prebiótico em estudo duplo-cego**; Revista Paulista de Pediatria; v. 22; pp. 205-211; 2004
- NOWAK, I.; ZIOLEK, M.; **Niobium Compounds: Preparation, Characterization and Application in Heterogeneous Catalysis**; Chemical Review; v. 99; pp. 36033-3624; 1999
- PARK, P. K.; KIM, E. Y.; CHU, K. H.; **Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments**; Separation and Purification Technology, Disponível somente on-line em 28 nov. de 2006 em: <http://www.sciencedirect.com>

- PARK, Y. K.; PASTORE, G. M.; **Process for preparing beta-fructofuranosidase enzyme and a process for producing fructooligosaccharides**; United States Patent Application n. 20020182682, Kind Code: A1; December, 5th.; 2002
- PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K.; **Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos**; Ciência Rural; Santa Maria; v. 33; n. 2; pp. 385-390; 2003
- PEREIRA, E. B.; PEREIRA, M. M.; LAM, Y. L.; PEREZ, C. A. C.; SCHMAL, M.; **Synthesis and characterization of niobium oxide layers on silica and the interaction with nickel**; Applied Catalysis A: General; v. 197; pp. 99-106; 2000
- POOL-ZOBEL, B.; LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M. B.; **Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer**; British Journal of Nutrition; v. 87; suppl. 2; pp. S273-S281; 2002
- REMAUD-SIMEON, M.; LOPEZ-MUNGUÍA, A.; PELENC, V.; PAUL, F.; MONSAN, P.; **Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1,2) linkages**; Applied Biochemistry and Biotechnology; v.44, n.2, pp.101-117; 1994.
- RESHMI, R.; SANJAY, G.; SUGUNAN, S.; **Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis**; Catalysis Communications; v. 8; pp. 393-399; 2007
- RIVERO-URGELL, M. SANTAMARIA-ORLEANS, A.; **Oligosaccharides: application in infant food**; Early Human Development; n. 65; suppl.; pp. S43-S52; 2001
- ROBERFROID M ; FLAMM, G.; GLINSMANN, D. K.; PROSKY, L.; **Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence**; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, n. 41; v. 5; pp. 353-362; 2001
- ROSEVEAR, A.; **Immobilized Biocatalysts – a critical review**; Journal of Chemical Technology and Biotechnology; v. 34B; pp. 127-150; 1984
- ROYER, G. P.; **Immobilized Enzymes Catalysis Reviews, 1978**; Catalysis Review; Science and Engineering; v. 22; n. 1; pp. 29-73, 1980
- RUBIO, M. C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A. R.; **Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis***; Phytochemistry, v. 61; pp. 605-609; 2002
- SAAD, S. M. I.; **Probióticos e prebióticos: o estado da arte**; Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; v. 42; n. 1; pp. 1-16; 2006
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R.; **Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods**; Food Chemistry; v. 91; l. 4; pp. 621-632; 2005
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G.; **Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202**; Process Biochemistry, v. 40; pp. 1085-1088; 2005

- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S.G.; **Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides**; Trends in Food Science & Technology; pp. 1-16; 2005
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S.; **Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10**; Food Chemistry; v. 94; pp. 573-579; 2006
- SANTOS, A. M. P.; **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Campinas-SP; 162 pp.; 2002
- SCHLEY, P. D.; FIELD, C. J.; **The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics**; British Journal of Nutrition; v. 87; suppl. 2; pp. S221-S230; 2002
- SERAFIM, M. J. S.; **Obtenção e caracterização de hidróxido de nióbio V como trocador iônico**; Dissertação de mestrado; Escola de Engenharia de Lorena; Faculdade de Engenharia Química; Lorena-SP; 1994.
- SKLIUTAS, A. R.; **Estudo do desenvolvimento de barra dietética de cereais e goiaba desidratada pelo processo de osmose a vácuo com utilização de fructooligosacarídeo**; Dissertação de mestrado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Campinas-SP; 116 pp.; 2002
- SHULER, M. L.; KARGI, F.; **Bioprocess Engineering: basic concepts**; Prentice Hall; New Jersey; 479 pp.; 1992
- SIRINGAN, P.; RAKSAKULTHAI, N.; YONGSAWATDIGUL, J.; **Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy**; Food Chemistry; v. 101; pp. 82-89; 2007
- SMALLA, K.; TURKOVA, J.; ČOUPEK, J.; HERMAN, P.; **Influence of salts on the covalent immobilization of proteins to modified copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with ethylene dimethacrylate**; Biotechnology and Applied Biochemistry; v. 10; pp. 21-31; 1988
- SOARES, C.M.F.; **Otimização por planejamento experimental da imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de estabilizantes**; Dissertação de Mestrado; Universidade Estadual de Campinas; Faculdade de Engenharia Química; Campinas-SP; 107 pp.; 2000
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; OLIVO, J. E.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; **Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity**; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; v. 29; pp. 69-79; 2004
- SOMOGYI, M. A.; **A new reagent for the determination of sugars**; Journal of Biological Chemical; v. 160, pp. 61-68; 1945
- [SPSS, INC.]; **TABLECURVE™ 2D** for Windows [computer program manual]; v. 4; USA, 1996
- [STATSOFT, INC.]; **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]; USA; 2000

- STEINBERG, D.; BACHRACH, G.; GEDALIA, I.; ABU-ATA, S.; ROZEN, R.; **Effects of various antiplaque agents on fructosyltransferase activity in solution and immobilized onto hydroxyapatite**; European Journal of Oral Sciences; v. 110; n. 5; pp. 374-379; 2002
- SYNOWIECKI, J.; WOŁOSOWSKA, S.; **Immobilization of thermostable β -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase**; Enzyme and Microbial Technology; v. 39; pp. 1417-1422; 2006
- TANABE, K.; **Catalytic application of niobium compounds**; Catalysis Today; v. 78; pp. 65-77; 2003
- TANABE, K.; MISONO, M.; ONO, Y.; HATTORI, H.; **Studies in Surface Science and Catalysis: New Solid Acids and Bases their catalytic properties**; v. 51; Kodansha LTDA; Tokyo; 369 pp.; 1989
- TANABE, K.; OKAZAKI, S.; **Various reactions catalyzed by niobium compounds and materials**; Applied Catalysis A: General; v. 133; pp. 191-218; 1995
- TANRISEVEN, A.; ASLAN, Y.; **Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides**; Enzyme and Microbial Technology; 36; pp. 550-554; 2005
- THAKORE, Y.; **C-147U Enzymes for Industrial Applications**; Business Communications Company, Inc., Dezembro; 2004; Disponível em 15/11/06 em: <http://www.bccresearch.com/bio/BIO030D.asp>
- THOMPSON, M. J.; EISENBERG, D.; **Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability**; Journal of Molecular Biology; n. 290; pp. 595-604; 1999
- TOMOMATSU, H.; **Health effects of Oligosaccharides**; Food Technology; v. 10; pp. 61-65; October; 1994
- TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M.; **Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor**; Journal of Food Engineering; v. 80; pp. 662-667; 2007
- TUOHY, K. M.; KOLIDA, S.; LUSTENBERGER, A. M.; GIBSON, G. R.; **The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolyzed guar gum and fructo-oligosaccharides – a human volunteer study**; British Journal of Nutrition; v. 86; pp. 341-348; 2001
- [USEPA], UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; **Drinking water standards and health advisories**; Washington; 2000; Disponível em 10/12/06 em: <http://www.epa.gov/waterscience/>
- VANDENPLAS, Y.; **Oligosaccharides in infant formula**; British Journal of Nutrition; v. 87; supl. 2; pp. S293-S296; 2002
- VEEREMAN-WAUTERS, G.; **Application of prebiotics in infant foods**; British Journal of Nutrition; v. 93; sup. 1; pp. S57-S60; 2005
- WHEATLEY, J. B.; SCHIMIDT, D. E.; **Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports**; Journal of Chromatography A, v. 849; pp. 1-12; 1999
- WHITAKER, J.R.; **Principles of enzymology for the food science**; New York; Marcel Dekker INC; pp. 65-101; 1972

- [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Copper**; International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 200); Geneva: WHO, 1998; Disponível em 10/12/06 em: <http://www.who.int>
- [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Copper in drinking-water**; Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality; Geneva: WHO, 2004; Disponível em 10/12/06, em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf
- WILCHEK, M.; MIRON, T.; **Oriented versus random protein immobilization**; Journal of Biochemical and Biophysical Methods; v. 55; pp. 67-70; 2003
- WISEMAN, A.; **Handbook of Enzyme Biotechnology**; 2^a Ed.; Ellis Horwood; New York; 457 pp.; 1985
- WOODWARD, J.; **Immobilised cells and enzymes: a practical approach**; IRL Press; Washington DC; 175 pp.; 1985
- WORKING PARTY ON BIOCATALYSTS; **Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts**; Enzyme Microbial and Technology, v. 5; pp. 304-307; 1983
- YECH, Y.; **Single-cell protein of *Rhodotorula* sp. Y-38 from ethanol, acetic acid and acetaldehyde**; Biotechnology Letters; v. 18; n. 4; pp. 411-416; 1996
- YAMAGUCHI, A.; ASAKURA, K.; IWASAWA, Y.; **A new aspect of catalysis at designed surfaces: the role of gas phase molecules in surface catalytic reactions**; Journal of Molecular Catalysis A: Chemical; v. 146; pp. 65-76; 1999
- YOSHIDA, H.; TANAKA, T.; YOSHIDA, T.; FUNABIKI, T.; YOSHIDA, S.; **Control of the structure of niobium oxide species on silica by the equilibrium adsorption method**; Catalysis Today; v. 28; pp. 79-89; 1996
- YUN, J. W.; **Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and application**; Enzyme and Microbial Technology, n. 19, pp. 107-117; 1996
- ZAITSEVA, G.; GUSHIKEM, Y.; RIBEIRO, E.; ROSATTO, S. S.; **Electrochemical property of methylene blue redox dye immobilized on porous silica-zirconia-antimonia mixed oxide**; Eletrochimica Acta; v. 47; pp. 1469-1474; 2002
- ZHANG, H.; YAO, H.; CHEN, F.; WANG, X.; **Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ**; Food Chemistry; v. 101; pp. 1670-1676; 2007
- ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z., YANG, Q.; **Biomass production from glutamate fermentation wastewater by the co-culture of *Candida halophila* and *Rhodotorula glutinis***; Bioresource Technology; v. 96; pp. 1522-1524; 2005