



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DO PROCESSO CONTÍNUO PARA PRODUÇÃO  
DE AÇÚCAR INVERTIDO POR VIA ENZIMÁTICA**

**Ana Cláudia Santana de Almeida**

**Recife - PE**

**Junho - 2003**

ESTUDO DO PROCESSO CONTÍNUO PARA PRODUÇÃO  
DE AÇÚCAR INVERTIDO POR VIA ENZIMÁTICA

**Ana Cláudia Santana de Almeida**

*Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Curso de Pós –Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos  
da Universidade Federal de Pernambuco*

**Área de concentração:** Reatores Bioquímicos e Biocatálise

**Orientadores:** Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha  
Prof. Dr. César Augusto Moraes de Abreu

**Recife - PE  
Junho - 2003**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 25 de junho de 2003 pela banca examinadora constituída pelos professores:

---

Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha  
Orientadora

---

Prof. Dr. César Augusto Moraes de Abreu  
Co-orientador

---

Profa. Dra. Maria Alice de Andrade Gomes Lima

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Queiroz

Este trabalho é dedicado a “DEUS” e a meus “PAIS” que sempre me deram a maior de todas as forças, o “Amor”. Também dedico com muito carinho a “Sivonaldo” por sua cumplicidade e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha e Prof. Dr. César Augusto Moraes de Abreu pela dedicação e compreensão durante todo o trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química, na pessoa do Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho, Coordenador de Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos da UFPE.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pelo fornecimento da cultura isolada do fungo *Cladosporium cladosporioides*, na pessoa da professora Cristina Maria de Souza Motta.

À Profa. Valdinete Lins que disponibilizou as instalações e equipamentos do Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade para ensaios de espectrofotometria realizados.

À Química Olga Martins Marques, do laboratório de Microbiologia Industrial e Processos Fermentativos, por sua ajuda na montagem do reator, sempre mostrando amizade e muita dedicação no que faz.

À laboratorista Maria da Conceição Gomes da Silva e à técnica Márcia Marques de Menezes, do laboratório de Microbiologia, pela ajuda.

À Profa. Laísse Carvalho de Albuquerque Maranhão pela ajuda durante as Análises Espectrofotométricas das amostras coletadas, e pelas explicações necessárias.

À amiga Luciares Costa de Araújo, pela sua colaboração permanente e paciência.

À Profa. Maria Fernanda Pimentel pela contribuição no aprendizado das técnicas estatísticas para otimização de experimentos.

Aos componentes da banca de leitura, professoras Sônia e Laísse, pela ajuda valiosa na correção deste trabalho.

Aos Professores que passaram seus conhecimentos durante as disciplinas.

Aos secretários Flávio Garret e Voleide Barros, pelo apoio necessário.

Aos colegas de Mestrado por sua amizade, apoio e incentivo.

À Capes pela bolsa concedida, possibilitando assim a realização deste trabalho.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

---

## RESUMO

A enzima invertase (E.C.3.2.1.26-D-fructofuranosidase) catalisa a hidrólise da sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose denominada açúcar invertido, que possui maior poder edulcorante, é mais facilmente adicionada em preparos industriais e possui maior valor agregado que a sacarose. O fungo *Cladosporium cladosporioides* possui invertase em sua constituição, sendo interessante o uso dessa biomassa como suporte de imobilização natural para tal enzima (auto-imobilização).

Neste trabalho, foi estabelecido o procedimento para a hidrólise enzimática da sacarose em sistema contínuo de leito fixo, utilizando-se a enzima invertase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides*. Foram realizados ensaios de caracterização da enzima fúngica, a fim de se determinar as condições que otimizam sua atividade. Foi aplicada a Técnica de Planejamento Fatorial para verificar a influência de parâmetros relevantes, tais como pH, temperatura e agitação sobre o percentual de hidrólise. A partir desse estudo, foram obtidas as condições ótimas de hidrólise, que são: pH 5,0, temperatura de 60°C e agitação de 170 rpm.

Com a definição das condições ótimas de hidrólise, estudos cinéticos foram realizados em sistema descontínuo para se avaliar a influência da alta concentração de substrato na atividade enzimática, bem como determinar os parâmetros cinéticos da reação. A partir da linearização da curva de velocidade de reação em função da concentração de substrato, foram calculadas a constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_M = 145,63\text{gL}^{-1}$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{\max} = 0,915\text{min}^{-1}$ ) para a invertase auto-imobilizada.

Um estudo hidrodinâmico foi realizado para a obtenção dos valores da velocidade e da altura mínimas de fluidização. Os resultados mostraram que o sistema em estudo não pode ser utilizado para leito fluidizado, uma vez que a velocidade mínima de fluidização não foi atingida.

O sistema contínuo de leito fixo apresentou-se como a alternativa com melhores condições operacionais para a obtenção de açúcar invertido em concentrações de substrato elevadas, obtendo-se uma conversão de 62%, utilizando-se sacarose,  $100\text{gL}^{-1}$ , a uma vazão de alimentação de  $2,8\text{ cm}^3\text{min}^{-1}$ . A partir dos resultados obtidos, foi proposto um modelo pseudo-homogêneo que considera os efeitos heterogêneos de acesso de substrato à estrutura celular. Tal modelo se ajustou bem aos perfis de concentração obtidos experimentalmente.

---

**Palavras-chave:** Açúcar Invertido, Invertase, Hidrólise Enzimática, *Cladosporium cladosporioides*, Leito Fixo e Leito Fluidizado.

---

## ABSTRACT

The enzyme invertase (E.C.3.2.1.26-D-fructofuranosidase) catalyses the sucrose hydrolysis, producing an equimolar mixture of glucose and fructose named inverted sugar, which has higher edulcorant power, is incorporated more easily in industrial preparations and has more market value than the sucrose. The fungus *Cladosporium cladosporioides* keeps invertase in its cells, so the use of that biomass as a natural immobilized support for its enzymes is interesting (auto-immobilization).

In this work, the procedure to the enzymatic hydrolysis of sucrose in a fixed bed continued system was proposed, using the auto-immobilized enzyme into the fungus *Cladosporium cladosporioides*. Characterization assays of the fungus's enzyme were done in order to determine the best conditions to maximize its activity. The Factorial Planning Technique was applied to verify the importance of parameters such as pH, temperature and perturbation level upon hydrolysis percentage. From this study, the optimum conditions to the hydrolysis were obtained: pH 5,0, temperature of 60°C and perturbation level of 170 rpm.

With the hydrolysis optimum conditions defined, kinetic studies were realized in discontinued system to evaluate the substrate high concentration influence onto enzymatic activity, as well as to determine the kinetic parameters of the reaction. From the linearization of the velocity reaction curve as function of substrate concentration, the apparent Michaelis-Menten constant ( $K_M = 145,63\text{gL}^{-1}$ ) and the maximum reaction velocity ( $V_{\max} = 0,915\text{min}^{-1}$ ) to the auto-immobilized invertase were calculated.

A hydrodynamic study was done to obtain the minimum values of fluidization velocity and height. The results revealed that the studied system cannot be used for fluidized bed, since the minimum fluidization velocity was not achieved.

The fixed bed continued system was the best alternative with the best operational conditions for the inverted sugar obtainment at high substrate concentrations, with 62% of conversion, using sucrose  $100\text{gL}^{-1}$  and an outflow feed of  $2,8\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ . From the obtained results, a pseudo-homogeneous model was proposed, considering the heterogeneous effects of the substrate access to the cells structure. This model fitted well the concentrations profile obtained experimentally.

---

**Keys-Words:** Inverted Sugar, Invertase, Enzymatic Hydrolysis, *Cladosporium cladosporioides*, Fixed Bed e Fluidized Bed.

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2.	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1.	<b>Catálise Enzimática</b> .....	4
2.1.1.	<i>Aplicação de Enzimas na Indústria</i> .....	5
2.1.2.	<i>Perspectivas Futuras</i> .....	7
2.2.	<b>Catálise Enzimática Aplicada à Hidrólise da Sacarose</b> .....	8
2.3.	<b>Enzimas Imobilizadas</b> .....	10
2.4.	<b>Invertase Imobilizada</b> .....	12
2.5.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> como Fonte de Invertase .....	15
2.6.	<b>Cinética Enzimática Aplicada à Hidrólise da Sacarose</b> .....	16
2.7.	<b>Modelagem Cinética da Enzima Auto-Imobilizada</b> .....	19
2.8.	<b>Sistemas de Contato Fluido-Sólido</b> .....	20
2.9.	<b>Modelagem para Consumo de Substrato em Sistema Descontínuo</b> .....	22
2.10.	<b>Sistemas Contínuos de Contato Enzima-Substrato</b> .....	24
2.11.	<b>Fluidização</b> .....	27
3.	<b>MATERIAIS E EQUIPAMENTOS</b> .....	31
3.1.	<b>Enzima</b> .....	31
3.2.	<b>Meios de Cultura</b> .....	31
3.3.	<b>Substratos e Reagentes</b> .....	31
3.4.	<b>Vidraria e Equipamentos</b> .....	32
4.	<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	33
4.1.	<b>Cultivo do <i>Cladosporium cladosporioides</i></b> .....	33
4.1.1.	<i>Preparação dos Meios de Cultivo</i> .....	33
4.1.2.	<i>Cultivo do Microrganismo</i> .....	34
4.1.3.	<i>Crescimento Celular</i> .....	34
4.1.4.	<i>Determinação da Biomassa</i> .....	34
4.1.5.	<i>Determinação do Diâmetro Médio dos Pellets</i> .....	35
4.1.6.	<i>Caracterização Textural dos Pellets</i> .....	35
4.2.	<b>Determinações Analíticas</b> .....	36
4.2.1.	<i>Atividade Hidrolítica sobre a Sacarose</i> .....	36



4.2.2.	<i>Dosagem da D-Glicose</i> .....	37
4.3.	<b>Caracterização da Invertase Auto-Imobilizada no Fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i></b> .....	37
4.3.1.	<i>Determinação da Concentração Ótima da Enzima Auto-Imobilizada</i> .....	37
4.3.2.	<i>Determinação das Condições Ótimas de Hidrólise através de Planejamento Experimental</i> .....	38
4.3.3.	<i>Determinação do Consumo Preferencial de Carboidratos pelo Fungo</i> .....	40
4.4.	<b>Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose</b> .....	40
4.5.	<b>Hidrólise da Sacarose em Sistema Descontínuo</b> .....	41
4.6.	<b>Hidrólise da Sacarose em Sistema Contínuo</b> .....	42
4.6.1.	<i>Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fluidizado</i> .....	42
4.6.2.	<i>Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fixo</i> .....	43
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1.	<b>Cultivo do <i>Cladosporium cladosporioides</i></b> .....	44
5.1.1.	<i>Curva de Crescimento do <i>Cladosporium cladosporioides</i></i> .....	44
5.1.2.	<i>Determinação do Diâmetro Médio dos Pellets</i> .....	46
5.1.3.	<i>Caracterização Textural dos Pellets</i> .....	46
5.2.	<b>Caracterização da Invertase Auto-Imobilizada no Fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i></b> .....	47
5.2.1.	<i>Velocidade de Reação da Invertase Auto-Imobilizada em Função da Concentração da Enzima</i> .....	47
5.2.2.	<i>Determinação das Condições Ótimas de Hidrólise através de Planejamento Experimental</i> .....	48
5.2.3.	<i>Determinação do Consumo Preferencial de Carboidratos pelo Fungo</i> .....	51
5.3.	<b>Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose</b> .....	53
5.4.	<b>Hidrólise da Sacarose em Sistema Descontínuo</b> .....	57
5.4.1.	<i>Modelagem Cinética do Processo Descontínuo</i> .....	58
5.5.	<b>Hidrólise da Sacarose em Sistema Contínuo</b> .....	61
5.5.1.	<i>Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fluidizado</i> .....	61
5.5.2.	<i>Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fixo</i> .....	62
5.5.3.	<i>Avaliação Cinética do Processo Enzimático Contínuo em Biorreator de Leito Fixo</i> .....	64
6.	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b> .....	67
6.1.	<b>Conclusões</b> .....	67
6.2.	<b>Sugestões</b> .....	69
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

8.	<b>ANEXOS</b> .....	76
8.1.	<b>Resumo do Trabalho Apresentado no XLII Congresso Brasileiro de Química</b> .....	76
8.2.	<b>Resumo do Trabalho Apresentado no IV Encontro de Catálise do Norte/Nordeste</b> .....	77
8.3.	<b>Trabalho Completo Apresentado no XIV Simpósio Nacional de Fermentação</b> .....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Curva de saturação por substrato para uma reação catalisada por enzima .....	17
Figura 2.2	Gráfico qualitativo do comportamento da perda de carga e da altura do leito em função da velocidade, de leitos fixos e fluidizados .....	28
Figura 4.1	Esquema do sistema contínuo para produção de açúcar invertido .....	42
Figura 5.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> em sua forma fungiforme .....	44
Figura 5.2	<i>Cladosporium cladosporioides</i> em sua forma <i>pelletizada</i> .....	44
Figura 5.3	Curva de crescimento do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	45
Figura 5.4	Distribuição de tamanho dos <i>pellets</i> constituídos pela biomassa do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	46
Figura 5.5	Velocidade de reação da invertase auto-imobilizada em função da concentração de enzimas (correlação do trecho linear $R^2=0,994$ ) .....	48
Figura 5.6	Perfil da porcentagem de hidrólise em função do pH e da agitação .....	50
Figura 5.7	Perfil da porcentagem de hidrólise em função do pH e da temperatura .....	50
Figura 5.8	Evolução do consumo de glicose em presença do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> em temperatura de 60°C e pH 5,0 .....	51
Figura 5.9	Evolução do consumo de frutose em presença do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> em temperatura de 60°C e pH 5,0 .....	53
Figura 5.10	Conversão percentual em função da concentração de sacarose, sob condições ótimas de hidrólise .....	54
Figura 5.11	Cinética de Michaelis-Menten da invertase auto-imobilizada .....	55
Figura 5.12	Cinética de Michaelis-Menten da invertase solúvel Sigma® Grau V .....	55
Figura 5.13	Linearização de Lineweaver-Burk para a invertase auto-imobilizada .....	56
Figura 5.14	Linearização de Lineweaver-Burk para a invertase solúvel .....	57
Figura 5.15	Perfil de concentração de substrato e produto em função do tempo .....	58
Figura 5.16	Ajuste linear dos resultados experimentais do processo descontínuo de hidrólise enzimática .....	59
Figura 5.17	Altura do leito em função da vazão de alimentação .....	61
Figura 5.18	Concentração de substrato e produto em função do tempo, em condições de leito expandido ( $Q=8,7\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ; $H_{\text{leito}}=27\text{cm}$ ; $t=3\text{horas}$ ) .....	62
Figura 5.19	Perfis de concentração de sacarose em função do tempo para sistema contínuo de leito fixo ( $[S_0] = 100\text{gL}^{-1}$ ) .....	63
Figura 5.20	Perfis de concentração de sacarose em função do tempo para sistema contínuo de leito fixo ( $[S_0] = 200\text{gL}^{-1}$ ) .....	64
Figura 5.21	Ajuste linear dos resultados experimentais do processo contínuo de hidrólise enzimática (dados operacionais; $Q=2,87\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ e $\tau=31,6\text{min}$ ) .....	65

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1	Mercado de enzimas em função das vendas (BORZANI, 2001) .....	6
Tabela 2.2	Classificação de suportes inertes (BORZANI, 2001) .....	11
Tabela 2.3	Características cinéticas para a invertase nas formas solúvel e insolúvel .....	12
Tabela 2.4	Equação de Michaelis-Menten e quatro equações de linearização derivadas (BAILEY & OLLIS, 1986) .....	18
Tabela 2.5	Comparação dos métodos de contato fluido-sólido (HOWARD <i>et al.</i> , 1989) .....	21
Tabela 2.6	Relações para a velocidade mínima de fluidização (DAVIDSON <i>et al.</i> , 1985) .....	29
Tabela 4.1	Variáveis e níveis estudados no Planejamento Fatorial 2 <sup>3</sup> aplicado à hidrólise enzimática da sacarose .....	39
Tabela 5.1	Características dos <i>pellets</i> de <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	47
Tabela 5.2	Matriz do Planejamento Fatorial 2 <sup>3</sup> e resultados em termos da porcentagem de hidrólise .....	48
Tabela 5.3	Efeitos calculados para o Planejamento Fatorial 2 <sup>3</sup> .....	49
Tabela 5.4	Valores dos parâmetros necessários à avaliação dos efeitos de transferência de massa para o processo descontínuo heterogêneo .....	60
Tabela 5.5	Concentrações de sacarose no estado estacionário e rendimentos em açúcar invertido para os processos contínuos de leito fixo .....	64
Tabela 5.6	Valores dos parâmetros necessários à avaliação dos efeitos de transferência de massa para o processo contínuo de leito fixo .....	66

## LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS

$K_M$	Constante de Michaelis-Menten	$(\text{g L}^{-1})$
$V_{\max}$	Velocidade máxima da reação catalisada	$(\text{g L}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{cat}})$
$[S]$	Concentração de substrato	$(\text{g L}^{-1})$
$v$	Velocidade inicial da reação catalisada	$(\text{g L}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{cat}})$
$K_I$	Constante de equilíbrio para o substrato na forma inibitória	$(\text{g L}^{-1})$
$a_{LS}$	Área interfacial líquido-sólido	$(\text{cm}^{-1})$
$k_{LS}$	Coefficiente de transporte de massa do para o sistema descontínuo	$(\text{cm min}^{-1})$
$[S]_{\text{ext}}$	Concentração de substrato na superfície catalítica	$(\text{g L}^{-1})$
$r_{\text{Saparente}}$	Velocidade da reação aparente específica	$(\text{min}^{-1})$
$N_S$	Fluxo de substrato dentro da partícula catalítica	$(\text{g cm}^{-3}\text{min}^{-1})$
$m_{\text{cat}}$	Massa do biocatalisador	$(\text{g})$
$V_L$	Volume de substrato no reator descontínuo	$(\text{L})$
$t$	Tempo de reação	$(\text{min})$
$\mu_L$	Viscosidade da solução de substrato	$(\text{g cm}^{-1}\text{min}^{-1})$
$D_{LS}$	Difusividade líquido/sólido	$(\text{cm}^2\text{min}^{-1})$
$\rho_L$	Massa específica do substrato	$(\text{g cm}^{-3})$
$\rho_{\text{Sol}}$	Massa específica do biocatalisador	$(\text{g cm}^{-3})$
$d_p$	Diâmetro da partícula do biocatalisador ( <i>pellet</i> )	$(\text{cm})$
$g$	Aceleração da gravidade	$(\text{cm min}^{-2})$
$V_S$	Volume molar do substrato	$(\text{cm}^3\text{gmol}^{-1})$
$T$	Temperatura	$(^\circ\text{K})$
$u_f$	Velocidade linear do líquido em um reator tubular	$(\text{cm min}^{-1})$
$S_T$	Área transversal do reator tubular	$(\text{cm}^2)$
$Q$	Vazão volumétrica	$(\text{cm}^3\text{min}^{-1})$
$G$	Vazão mássica	$(\text{g min}^{-1})$
$\tau$	Tempo de residência no reator	$(\text{min})$
$k'_{LS}$	Coefficiente de transporte de massa para o sistema contínuo	$(\text{cm min}^{-1})$
$Sh$	Número de Sherwood	adimensional
$Re$	Número de Reynolds	adimensional

$Sc$	Número de Schimidt	adimensional
$\varepsilon$	Fração de vazios do biorreator	adimensional
$u_{mf}$	Velocidade mínima de fluidização	( $\text{cm min}^{-1}$ )
$Re_{mf}$	Número de Reynolds para mínima fluidização	adimensional
$C_D$	Coefficiente de arraste	adimensional
$Ga$	Número de Galileo	adimensional
$M_U$	Razão de massas específicas	adimensional
$\varepsilon_f$	Fração de vazios do leito fluidizado	adimensional
$\varepsilon_{mf}$	Fração de vazios de mínima fluidização	adimensional
$V_f$	Volume do leito fluidizado	( $\text{cm}^3$ )
$L_f$	Altura do leito fluidizado	( $\text{cm}$ )
$\varepsilon_b$	Porosidade interna do biocatalisador	adimensional
$[E_T]$	Concentração de enzima auto-imobilizada	( $\text{g L}^{-1}$ )
$[ART]$	Concentração de Açúcares Redutores Totais	( $\text{g L}^{-1}$ )
$k_{cat}$	Número de <i>turnover</i>	adimensional
$\mu$	Taxa específica de crescimento celular	( $\text{h}^{-1}$ )
$X$	Concentração de biomassa fúngica	( $\text{g L}^{-1}$ )
$\mu_{max}$	Taxa específica máxima de crescimento celular	( $\text{h}^{-1}$ )
$K_S$	Concentração de substrato para a qual $\mu = \mu_{max}/2$ (constante de Monod)	( $\text{g L}^{-1}$ )
$\phi^2$	Módulo de Thiele	adimensional
$V_0$	Velocidade inicial de desaparecimento de substrato	( $\text{g cm}^{-3} \text{min}^{-1}$ )
$R$	Raio da partícula do catalisador ( <i>pellet</i> )	( $\text{cm}$ )
$H_{leito}$	Altura do leito	( $\text{cm}$ )
$[S]_0$	Concentração inicial de sacarose	( $\text{g L}^{-1}$ )

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda do setor alimentício, seja através de alimentos, bebidas ou aditivos, bem como o aumento da produção agrícola de matérias-primas vegetais com conteúdo sacarídico pressionam no sentido de se desenvolver processos químicos e/ou bioquímicos que compatibilizem a disponibilidade e/ou tratamento dessas matérias-primas para obtenção de derivados sucroquímicos.

A biomassa de característica lignocelulósica ou amilácea, abundante na natureza como produto principal ou como resíduo industrial ou agrícola, caracteriza-se como fonte economicamente viável de açúcares ou derivados destes. Faz-se necessário, portanto, o conhecimento e uso de reações químicas e/ou bioquímicas de modo a otimizar os mecanismos de conversão, facilitando a produção de adoçantes, edulcorantes e derivados de carboidratos naturais que apresentem alto valor agregado.

A sacarose é um dissacarídeo extensivamente utilizado em alimentos e bebidas como adoçante, e como nutriente em processos fermentativos. Ela é produzida a partir da beterraba ou da cana-de-açúcar, sendo esta última sua fonte natural mais importante (GLAZER & NIKAIDO, 1995). A hidrólise da sacarose fornece uma mistura equimolar de frutose e glicose denominada **açúcar invertido**, que tem aplicação em vários processos industriais, possuindo maior valor agregado que a sacarose, aumentando a viabilidade econômica do processo de produção da mesma.

Segundo BAJPAI & MARGARITIS (1985), o crescimento na utilização do açúcar invertido reside no fato deste ser um açúcar natural que apresenta capacidade adoçante cerca de 70% superior à da sacarose, possuir propriedades antioxidantes, ser mais resistente a contaminações microbiológicas, além de poder ser estocado sob altas concentrações (80%), sem risco de cristalizar. Essas propriedades contribuem para aumentar o seu uso em vários produtos alimentícios, sobretudo na indústria de refrigerantes. O produto de maior interesse comercial é aquele com nível de inversão próximo a 55%, pois nessa faixa a solubilidade é máxima, possibilitando trabalhar com concentrações em torno de 76,5% de sólidos solúveis, diminuindo assim a susceptibilidade à contaminação microbiana, sem riscos de cristalização (BLANCHARD & GEIGER, 1984).

A produção de açúcar invertido pode ser alcançada através de hidrólise ácida ou enzimática. A acidez gerada na hidrólise ácida pode ser devida à ação direta de um ácido (hidrólise homogênea) ou à liberação de  $H^+$  de uma resina catiônica (hidrólise heterogênea). A hidrólise ácida homogênea é um processo econômico, onde a escolha do ácido depende de sua compatibilidade com o produto final, porém os xaropes assim obtidos são altamente coloridos devido às condições drásticas de reação (pH e temperatura) (CHOU & JASOVSKY, 1993). Por outro lado, o meio ácido promovido pela resina catiônica pode causar perda de açúcar por degradação do mesmo, levando à formação do hidroximetil furfural (HMF) com conseqüente desenvolvimento de cor no xarope. (BLANCHARD & GEIGER, 1984).

O processo enzimático para a hidrólise da sacarose, por não gerar resíduos ácidos e subprodutos tóxicos, sendo desnecessária sua neutralização, é considerado um processo limpo (UENG *et al.*, 1982). Além disso, a hidrólise enzimática catalisada pela invertase produz um alto grau de hidrólise, originando um produto de alta qualidade com baixos teores de cinzas, cor e HMF (RODRIGUES *et al.*, 2000). O fator limitante para a utilização da hidrólise enzimática em escala industrial tem sido o elevado custo da invertase que está, sobretudo, associado ao baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação desta enzima. Por outro lado, técnicas naturais de imobilização de enzimas (auto-imobilização) sob condições bem controladas de reação têm despontado como alternativas atraentes para utilização em processos industriais, principalmente por oferecerem grande estabilidade operacional à enzima, possibilitando contínuas reutilizações sem perda significativa de atividade (COUTINHO FILHO *et al.*, 1999).

Em 1991, ANDRADE, dando continuidade às pesquisas realizadas por LACERDA (1987), investigou o consumo e efeito de diferentes fontes de carbono durante o cultivo de *Cladosporium cladosporioides*, bem como a utilização de suas células como suporte de imobilização natural para enzimas na hidrólise de frutanas. Os resultados obtidos mostraram que células de *C. cladosporioides* produzem atividades inulase e invertase de forma semelhante, ou seja: maior estabilidade térmica a 60°C (temperatura ótima de hidrólise), maior produtividade volumétrica, maior estabilidade operacional e taxa de conversão semelhante, quando comparadas àquelas de outros biocatalisadores citados na literatura para a mesma finalidade.

A maioria dos processos bioquímicos é hoje realizada em leito fixo devido ao melhor comportamento fluidodinâmico que garante maior estabilidade ao catalisador



(FERREIRA *et al.*, 1992). No entanto, o funcionamento em leito fluidizado constituído de biomassa fúngica apresenta-se como alternativa por estabelecer um maior contato entre a fase sólida e a fase líquida, melhorando a transferência de massa e, conseqüentemente, aumentando as taxas de bioconversão (ZHANG *et al.*, 2000).

Com base nessas características, e considerando a possibilidade de crescimento do *Cladosporium cladosporioides* em meio sacarídico, foi proposta deste trabalho o estudo das condições adequadas quanto à temperatura, à concentração de substrato e à massa celular para a obtenção de xaropes concentrados de glicose e frutose, bem como o desenvolvimento de processos bioquímicos contínuos em leito fixo e em leito fluidizado para a produção de concentrados de açúcar invertido a partir de xaropes com elevado teor de sacarose, utilizando-se o fungo *Cladosporium cladosporioides* como fonte natural de enzima invertase (EC 3.2.1.26).

A utilização da biomassa em reator de leito fixo apresentou-se como a alternativa com melhores condições operacionais para a produção de açúcar invertido, em concentrações elevadas de substrato. Foram analisadas diferentes concentrações de substrato, bem como diferentes vazões específicas de aplicação, obtendo-se os melhores resultados com concentração de  $100 \text{ gL}^{-1}$  de substrato a uma vazão de  $2,8 \text{ cm}^3\text{min}^{-1}$ . As operações contínuas foram conduzidas de forma isotérmica ( $60^\circ\text{C}$ ), condição esta que garantiu a solubilidade da sacarose e a efetiva inversão em presença da invertase.

O controle cinético do processo recorreu à formulação de modelos da cinética enzimática, onde se estudou o efeito da concentração do substrato na hidrólise enzimática quando esta se encontra imobilizada no interior da célula, considerando também os efeitos heterogêneos de acesso de substratos à estrutura celular (ILLANES *et al.*, 2001). Um modelo pseudo-homogêneo foi aplicado, tendo em vista as previsões de perfis de conversão no processo enzimático.

A realização dessa pesquisa foi justificada em função da crescente necessidade da indústria sucro-alcooleira de obter co-produtos de maior valor agregado como alternativa para se aumentar a viabilidade econômica de alguns processos que apresentam menor rentabilidade, como a produção de açúcar.

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Catálise Enzimática

Todas as reações químicas que configuram o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Estes biocatalisadores são altamente específicos e ativos em condições moderadas, o que lhes confere um grande potencial de uso em processos químicos (ILLANES, 1994).

A capacidade catalítica da enzima reside em seu sítio ativo que está conformado por um número reduzido de resíduos de aminoácidos que se agrupam na estrutura tridimensional para gerar um nicho, onde o substrato é fixado e quimicamente transformado. A preservação da estrutura deste nicho é essencial para a expressão da capacidade catalítica, uma vez que a estabilidade conformacional da enzima se torna fundamental para sua funcionalidade (ILLANES, 1994).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e especificidade da enzima, dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, afetam a estrutura da enzima, e, em decorrência, suas propriedades (VOET & VOET, 1995).

A ação catalítica das enzimas se faz, como a dos catalisadores inorgânicos, através da redução da energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzirem significativamente a energia de ativação, incrementando a velocidade de reação, as enzimas apresentam elevada especificidade (BORZANI *et al.*, 2001).

A expressão da atividade de uma enzima é medida através da velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. Em uma reação catalisada por enzimas, a concentração de produto formado aumenta linearmente com o tempo, tendendo, após um dado intervalo, a tornar-se constante. Vários fatores podem contribuir para a diminuição da velocidade, entre eles, a diminuição da concentração do substrato, a possível inativação parcial da enzima no decorrer da reação, a inibição pelo produto e deslocamento do equilíbrio, se a reação for reversível (CAMPBELL, 2000).

Para evitar a influência dos fatores mencionados, costuma-se associar a atividade à medida da velocidade de reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura velocidades constantes. É importante frisar, no entanto, que em processos industriais, as enzimas atuam sob condições diferentes daquelas vigentes na célula, ou ainda, em condições laboratoriais, sob velocidade constante (CAMPBELL, 2000; BORZANI *et al.*, 2001).

### 2.1.1. *Aplicação de Enzimas na Indústria*

As aplicações de enzimas encontram-se inseridas no mercado mundial, movimentando cerca de US\$1,5 bilhão, envolvendo as indústrias de química fina, metodologia analítica, medicamentos, alimentos, bebidas, detergentes, celulose e papel, além de beneficiamento de fibras têxteis e couros. ([www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br), 2002). Na indústria de alimentos, estão envolvidas tanto na transformação de matérias-primas, quanto como aditivos em processos que beneficiam o produto final. No primeiro caso, tem-se o uso da lactase em leite bovino, atendendo desta forma um contingente populacional alérgico à lactose; já no segundo caso, é comum a adição de proteases, papaína em particular, no acabamento de cervejas. Esses catalisadores, quando utilizados na indústria de alimentos, podem promover a melhoria de processos, possibilitando o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características organolépticas e/ou físico-químicas (GLAZER & NIKAIDO, 1995). O uso de enzimas e/ou microrganismos para obtenção de bens, convencionou-se chamar de biotecnologia, termo este que se transformou numa panacéia de atividades ligadas à ciência e à tecnologia. Sendo uma atividade multidisciplinar, envolve profissionais de diferentes áreas como a microbiologia, a química, a bioquímica, a genética, a matemática, a engenharia, entre outras (ABRAHÃO, 2001).

Para que a utilização das enzimas seja economicamente viável, estas devem ser capazes de melhorar a qualidade do produto, com baixa ou nenhuma concentração de subprodutos, otimizando os processos de forma a reduzir custos de laboratório e operacionais, uma vez que os custos para extraí-las e purificá-las são elevados (LUCARINI, *et al.*, 2000). Sendo assim, as enzimas podem ser úteis em um amplo campo de aplicações, seja melhorando a qualidade de um produto, facilitando sua obtenção ou produzindo um intermediário dentro de um cadeia no qual este seria difícil de se obter

quimicamente, como, por exemplo, na manufatura de queijos. Neste caso, as lipases podem acelerar o processo de cura.

Devido à notável quimioseletividade, além de enantioseletividade, as enzimas apresentam grande relevância na síntese orgânica, uma vez que a funcionalidade do produto encontra-se geralmente associada a um dos isômeros, possibilitando a obtenção de produtos isolados, o que seria impossível por via química. É o caso da talidomida, que, entre 1958 e 1963, foi produzida como uma mistura racêmica, com finalidade analgésica e contra enjôos na gravidez, causando graves deformidades em fetos. Após anos de estudo, os cientistas puderam observar que apenas o isômero levógero é teratogênico (BAMONTE & OLAZAR, 2002).

Apesar das incontáveis enzimas conhecidas, são poucas as comercializadas, destacando-se as hidrolases e entre estas, as amilases, lipases e proteases. Além destas, destaca-se a glicose isomerase utilizada para obtenção de frutose a partir da glicose. A Tabela 2.1 chama atenção para a comercialização de algumas enzimas em função da demanda (ABRAHÃO, 2001; BORZANI, 2001).

Tabela 2.1- Mercado Nacional de enzimas em função das vendas (BORZANI, 2001)

<b>Enzimas</b>	<b>Vendas em %</b>
Protease de <i>Bacillus</i>	30 – 35
Amilase de <i>Bacillus</i>	10 – 12
Renina bovina	10 – 12
Glicoamilase	8 – 10
Glicose isomerase	5 – 7
Renina microbiana	2 – 4
Pectinase	4 – 5
Pancreatina	2 – 4
Papaína, bromelina	4 – 6
Lipase	2 – 3
Outras ( $\beta$ -amilase, amilase fúngica, glicose-oxidase, invertase, lactase, lisozima, penicilina acilase, pululanase)	5 – 10

As enzimas mais estudadas pela comunidade científica brasileira são, justamente, as amilases, só em 1997, o Brasil investiu US\$ 17.429,321.00 na importação dessas enzimas. É interessante observar que, se por um lado o país importa essas enzimas, por outro lado as exporta para o mercado sul americano, especialmente para a Argentina e Paraguai. Os grandes produtores mundiais de amilases são a Finlândia, Dinamarca e Estados Unidos que, juntos, detém cerca de 80% das exportações pelo Brasil. As proteases formam o segundo grupo de enzimas mais intensamente estudado no país, constituindo também o segundo grupo mais comercializado pelo Brasil. Dentre as proteases mais importantes, o coalho, obtido por extração do quarto estômago de pré-ruminantes e utilizado na fabricação de queijos, movimentou isoladamente US\$ 2.579 milhões, sendo o Brasil importador de, aproximadamente, 70% do mercado argentino. Outro grande mercado, no qual o Brasil investiu cerca de US\$ 62.216,00 em importações, foi o da bromelina, obtida do abacaxi, e da papaína, estas enzimas são intensamente utilizadas na indústria de bebidas, de alimentos e de fármacos. Outras enzimas que merecem destaque são aquelas de uso terapêutico, que apresentam alto valor agregado, não só pela relevância de suas aplicações, mas, principalmente, pela dificuldade de obtenção, separação e purificação. Estas são importadas, e sua comercialização para o exterior envolve uma demanda de US\$ 2.734.463,00. Diante do exposto, é interessante constatar que, sendo o Brasil grande produtor da matéria-prima dessas proteases, é incapaz de produzi-las, comprando aos Estados Unidos e à Suíça cerca de 70% do total desse produto ([www.biotechnologia.com.br](http://www.biotechnologia.com.br), 2002).

### 2.1.2. *Perspectivas Futuras*

Apesar do Brasil ser um grande produtor das matérias-primas envolvidas na produção de enzimas, o país apresenta alguns obstáculos para emancipar-se do ponto de vista biotecnológico: o primeiro constitui a flutuação do câmbio, responsável pela inibição de investimentos nacionais e internacionais na área; o segundo, derivado do primeiro, consiste na falta de desenvolvimento tecnológico. Apesar disso, o país é sede de uma indústria de porte, a NOVO Enzymes, multinacional de origem dinamarquesa que detém mais de 50% do mercado internacional. No entanto, devido à necessidade de biocatalisadores de baixo custo e em grande quantidade, é necessário o desenvolvimento

de tecnologias menos onerosas para a produção daquelas enzimas utilizadas em maior quantidade, como as da indústria de detergentes, têxtil e alimentícia. Entre estas se destacam a invertase, a papaína, as amilases, as celulases, as lipases que, sendo produzidas no Brasil, permitiriam ao país uma certa independência biotecnológica.

## 2.2. Catálise Enzimática Aplicada à Hidrólise da Sacarose

As bioconversões, reações químicas catalisadas por enzimas ou células e executadas em meio com alta ou baixa concentração de água, apresentam grande interesse na síntese orgânica, sobretudo de compostos opticamente ativos (ROCHA-FILHO & VITOLO, 1998). O sucesso da biocatálise se deve ao fato da transformação ocorrer em condições brandas de pH e temperatura, ser altamente seletiva, produzir efluentes menos tóxicos e facilmente tratáveis, alguns deles biodegradáveis, obter produtos sensíveis a condições extremas de processo, além de possibilitar a execução de reações simultâneas (NIELSEN & VILLADSEN, 1993). Um dos principais objetivos em um bioprocessos é atingir elevado rendimento em tempo mínimo, com elevada conversão do substrato e seletividade química (BOMMARIUS, 1993).

A degradação enzimática da sacarose se faz por hidrólise de suas ligações glicosídicas sob a ação de glicosidases. Entre as glicosidases podemos citar as  $\beta$ -frutofuranosidases, em especial as inulases classificadas como 2,1- $\beta$ -D-fruto-frutohidrolases (EC 3.2.1.7) e as invertases (EC 3.2.1.26) (ETTALIBI & BARATTI, 1987). Ambos os tipos de enzimas  $\beta$ -frutofuranosidases são ativas para a sacarose, no entanto, as inulases são também capazes de hidrolisar inulina, um polímero de frutose comumente encontrado entre os representantes das famílias *Graminae* (centeio, cevada, trigo, etc) e *Compositae* (dália, chicória, alcachofra de Jerusalém, dente-de-leão, etc) como carboidratos de reserva. (BAJPAI & MARGARITIS, 1985).

Em trabalho recente, RUBIO *et al.* (2002) encontraram que a biossíntese da invertase a partir de uma linhagem de *Rhodotorula glutinis* foi extremamente influenciada pelo açúcar utilizado como fonte principal de carbono. Dentre os açúcares testados (frutose, glicose, lactose, maltose, rafinose e sacarose) apenas as culturas incubadas em sacarose e rafinose apresentaram atividade invertásica, indicando que esta enzima é induzida pelo substrato. Resultados similares foram obtidos com invertases de

*Schwanniomyces occidentalis* (COSTAGLIOLI *et al.*, 1997) e *Aspergillus niger* (RUBIO *et al.*, 1997).

As invertases hidrolisam sacarose e polissacarídeos contendo uma ligação  $\beta$ -D-frutofuranosil em frutofuranosídeos e, no caso da sacarose, obtém-se uma mistura equimolar de glicose e frutose. Dentre as várias aplicações para a invertase, destaca-se a fabricação de xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) a partir de substratos ricos em sacarose como: açúcar de cana, açúcar de beterraba ou melaço. O produto obtido a partir desses substratos apresenta 51% de glicose, 42% de D-frutose e 7% de oligossacarídeos (RIBEIRO, 1997). A perspectiva de aplicação industrial de invertases microbiológicas na produção de açúcar invertido depende principalmente da enzima apresentar atividade e estabilidade operacional a temperaturas superiores a 60°C (ZITTAN, 1981).

A invertase, uma enzima intracelular, é produzida pelo metabolismo de numerosos microrganismos, sendo sua principal fonte comercial a *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, encontra-se na literatura numerosos trabalhos que tratam da extração e purificação de invertases provenientes de diversos microrganismos, destacando-se: *Saccharomyces uvarum* (VITOLLO, 1979), *Torulospora pretoriensis* (ODA & TONOMURA, 1994), *Candida utilis* (CHÁVEZ *et al.*, 1997), *Pichia anomala* (RODRIGUEZ *et al.*, 1995), *Rhodotorula glutinis* (RUBIO, *et al.*, 2002) entre outros. As propriedades físicas e cinéticas das enzimas obtidas a partir destes microrganismos foram similares àquelas encontradas para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A necessidade de romper a célula sem destruir a enzima e os baixos rendimentos de extração obtidos tornam as invertases muito mais caras que as hidrolases extracelulares. O custo da invertase Sigma ® Grau VII (parcialmente purificada) de levedura de panificação, por exemplo, é de \$196,50 / 5gramas, enquanto que a Sigma ® Grau V (prática) custa \$37,80 / 500gramas<sup>a</sup>. Este fator, somado ao fato da invertase ser muito sensível a vários inibidores (metais pesados, ácidos, substrato e produtos), sugere como atraente alternativa a imobilização da enzima sob condições bem controladas de reação (BAILEY & OLLIS, 1986).

---

<sup>a</sup> Dados fornecidos pela Sigma Chemical Company, 2002)

### 2.3. Enzimas Imobilizadas

A grande especificidade de ação das enzimas e as condições muito brandas nas quais elas funcionam, conferem-lhes vantagem sobre os catalisadores químicos comuns. Dessa forma, a utilização das preparações enzimáticas desenvolve-se, consideravelmente, em numerosos setores, porém o custo elevado dos processos de extração e purificação das macromoléculas enzimáticas e sua grande instabilidade em solução são obstáculos à recuperação do biocatalisador, após a utilização. Por isso, a maioria das operações industriais é feita de maneira descontínua, por batelada, com a renovação da enzima no início de cada ciclo (BLANCH & CLARK, 1997).

A imobilização sobre suporte insolúvel, que é acompanhada, freqüentemente, de um aumento na estabilidade da enzima, facilita o emprego de reatores contínuos, funcionando por longos períodos, sem renovação do catalisador. Dessa forma, ela permite utilizar preparações mais puras, mais caras, embora com especificidade de ação estreita, o que melhora a qualidade dos produtos obtidos (BLANCH & CLARK, 1997).

Para os enzimologistas, a fixação em suporte realiza um modelo próximo das condições da célula viva, onde as enzimas se encontram, freqüentemente, ligadas à membrana ou a organelas intracelulares. Desde 1916, Nelson e Griffin tinham mostrado que a invertase adsorvida em carvão ativado conservava a sua atividade, contudo, foi a partir dos anos 60 que as pesquisas se intensificaram no sentido de se estabelecer métodos eficientes para ligar enzimas, quer por meios físicos ou meios químicos, a suportes inertes insolúveis (BORZANI *et al.*, 2001).

Os sistemas de imobilização podem se classificar naqueles em que a enzima se liga a um suporte por meio de algum tipo de interação, que freqüentemente se considera uma ligação química, e aqueles em que a enzima é confinada em um espaço determinado por entrelaçamento molecular. Entre os primeiros, podem ser considerados: a união por ligações químicas covalentes, que são geralmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes das enzimas com os grupos reativos do suporte (-CHO; -NCS, dentre outros), a união por ligações iônicas, por simples adsorção ou por formação de agregados proteicos macromoleculares, mediante agentes de entrecruzamento. Entre os segundos, podem ser considerados: a retenção molecular mediante membranas moleculares semipermeáveis de morfologias variadas (fibras, cápsulas, lâminas, dentre outras) e o entrelaçamento em polímeros geliformes (ILLANES, 2001).



A literatura relata a existência de inúmeros materiais inertes que podem ser usados para imobilizar enzimas. A natureza física desses suportes pode variar, desde materiais geliformes até superfícies sólidas. Na Tabela 2.2 são apresentados alguns exemplos de materiais usados como suportes (BORZANI, 2001).

Tabela 2.2 – Classificação de suportes inertes (BORZANI, 2001)

<b>Tipo de suporte</b>	<b>Materiais</b>	<b>Porosidade</b>	<b>Estabilidade</b>
Não poroso	Vidro, sílica, aço	-	Alta
Microencapsulado	Triacetato de celulose	35 Å	Moderada
Entrelaçado	Poliacrilamida, PVP	Variada	Baixa
Macroporoso	Alumina, sílica	200 – 1000 Å	Alta

A imobilização de enzimas em suportes insolúveis tem sido um tópico para pesquisa ativa na tecnologia enzimática, além de ser essencial para as suas aplicações em processos industriais. Um grande número de enzimas foram imobilizadas com sucesso, acompanhadas de altas atividades quando em suportes apropriados. Estes produtos imobilizados foram utilizados na construção de biossensores ou biorreatores. A imobilização proporciona uma série de vantagens, tais como: (1) manter a estabilidade da enzima pela proteção do material ativo da desativação; (2) propiciar o uso repetido; e conseqüentemente, a redução significativa nos custos de operação; (3) facilitar a separação e recuperação da enzima. A disponibilidade de vários materiais para suporte e de métodos de imobilização, teoricamente, faz com que as enzimas tenham uma rota adequada de imobilização. No entanto, é importante que a escolha do material para suporte e do método de imobilização estejam em consonância (ARICA *et al.*, 1995; ULBRICHT *et al.*, 1999).

Por outro lado, ao se agregar uma enzima a um material inerte, por mais suave que seja o procedimento, é razoável esperar algum tipo de efeito sobre sua atividade catalítica, a qual está intimamente relacionada com a estrutura da macromolécula. Na Tabela 2.3 são mostrados alguns parâmetros cinéticos, tanto para a invertase solúvel quanto para ela imobilizada em três suportes diferentes (a- alginato de cálcio, b- quitina, c- polietileno ativado). A partir desses dados fica clara a interferência da imobilização sobre a atividade catalítica da enzima, obtendo-se, por exemplo, um  $K_M$  (constante de

Michaelis-Menten) mais alto e uma  $V_{M\acute{a}x}$  (velocidade maxima) menor para a enzima imobilizada, comparativamente  a enzima solovel (VITOLLO & BARROS, 1992; DE QUEIROZ *et al.*, 1995; ARRUDA, 1996).

Tabela 2.3 – Características cinéticas para a invertase nas formas solovel e insolovel

Parâmetro	Invertase solovel	Invertase imobilizada
$K_M$	26,0 mM	<sup>a</sup> 8,1 mM <sup>b</sup> 52,2 mM <sup>c</sup> 32,2 mM
$V_{M\acute{a}x}$	1,10 U	<sup>a</sup> 0,25 U <sup>b</sup> 0,74U <sup>c</sup> 0,32U

<sup>a,b,c</sup> Referem-se aos dados da invertase insolubilizada em alginato de cálcio, quitina e polietileno ativado, respectivamente.

Assim, as desvantagens mais relevantes da imobilização de enzimas seriam a aleatoriedade da interação suporte-enzima, a inexistência de um método geral de imobilização e a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusivos no microambiente e efeitos estéricos/conformacionais (BORZANI *et al.*, 2001).

Contudo, com o advento da técnica de imobilização foi possível diversificar as aplicações de enzimas, podendo-se citar: a) a adaptação de reatores químicos convencionais a processos enzimáticos contínuos; b) em eletrodos enzimáticos, dispositivos formados basicamente de um sensor eletroquímico e da enzima imobilizada (GUILBAULT *et al.*, 1991); c) a técnica para diagnóstico clínico, denominada de enzima-imunoensaio, entre outras (TREVAN, 1996).

Finalmente, pode-se dizer que o uso de enzimas imobilizadas, ainda se encontra no limiar de sua plena potencialidade aplicativa e econmica.

## 2.4. Invertase Imobilizada

A hidrólise enzimática da sacarose possui bom potencial para a aplicação da tecnologia de imobilização de enzimas, uma vez que pode oferecer vantagens técnicas e econmicas decorrentes da possibilidade de reduzir a quantidade de enzima utilizada, já que, quando imobilizada, esta apresenta vida média maior que na forma solovel. Além

disso, a enzima imobilizada conduz a processos contínuos que podem usar tanto reatores de leito fixo como fluidizado, nos quais é possível usar maiores dosagens de enzima por volume de reator o que contribui para altas taxas de reação e, conseqüentemente, menores dimensões dos reatores (ZANIN & MORAES, 1998; BASSETTI *et al.*, 1997).

Encontram-se na literatura, numerosos trabalhos que tratam da hidrólise da sacarose utilizando a invertase imobilizada em suportes artificiais, incluindo aqueles em que a célula inteira é imobilizada. A maior parte deles trata de novos métodos de imobilização e caracterização de enzimas, alguns descrevem seu uso em reatores contínuos (ARICA *et al.*, 1995).

BASSETTI *et al.* (2000) estudaram a estabilidade térmica e a energia de inativação da invertase imobilizada em sílica com porosidade controlada e compararam os valores obtidos com aqueles da enzima livre. Os resultados mostraram que a invertase imobilizada é mais estável que a invertase solúvel, apresentando meia vida de 20,9 horas a 65°C, enquanto que para a enzima solúvel a meia-vida caiu para 13,9 horas, à mesma temperatura. Além disso, a energia de inativação foi de 83,1 kcal mol<sup>-1</sup> para a enzima imobilizada e 72,0 kcal mol<sup>-1</sup> para a enzima livre.

D'SOUZA & MELO (2001) imobilizaram leveduras de panificação intactas por adesão à juta tratada com 2% de polietilenoamina, permitindo uma ligação forte entre a levedura e o suporte, mesmo sob condições adversas de pH (3-10) e concentração de NaCl (0,5M). Estas células foram utilizadas em um reator tubular para a hidrólise de xaropes concentrados de sacarose (60%-80%) a 45°C, durante 45 dias, sem perda aparente de eficiência.

TANRISEVEN (2001) imobilizou invertase de *Saccharomyces cerevisiae* em cápsulas de alginato de cálcio. A invertase imobilizada se mostrou mais estável a elevados pH e temperatura que a enzima livre: a 80°C, a enzima livre perdeu toda a atividade, enquanto que a imobilizada reteve 27% da atividade e a enzima livre foi completamente desativada em pH 8, enquanto a imobilizada reteve 40% da atividade inicial neste pH. Além disso, os parâmetros cinéticos foram similares para as duas formas da enzima.

KRASTANOV (1997) imobilizou células de *Saccharomyces cerevisiae* em lã utilizando glutaraldeído. O catalisador imobilizado foi testado em um reator tubular de leito fixo para investigar a possibilidade de sua utilização no processo contínuo de

hidrólise da sacarose em larga escala. O sistema demonstrou excelente produtividade a uma temperatura de 70°C para uma concentração de substrato de 2,0M, mantendo a atividade constante durante os primeiros 30 dias de trabalho contínuo, sendo reduzida a menos que 50% após 60 dias.

AKGÖL *et al.* (2001) estudaram a hidrólise da sacarose pela invertase imobilizada em microesferas de polivinilalcool magnético (PVAL). O valor de  $K_M$  para a enzima imobilizada (55mM de sacarose) foi maior que o da enzima livre (24mM de sacarose) indicando um decréscimo na afinidade da enzima pelo substrato, enquanto que o valor de  $V_{máx}$  foi menor para a invertase imobilizada. A temperatura operacional ótima foi 5°C superior àquela da enzima livre e as estabilidades térmica e operacional foram incrementadas com a imobilização.

ETTALIBI & BARATTI (2001) estudaram a possibilidade de usar inulases termoestáveis, provenientes de *Aspergillus ficuum*, como substitutas da invertase, para a hidrólise da sacarose. A inulase comercial foi imobilizada dentro de cápsulas de vidro poroso, previamente ativadas com reagente silano e glutaraldeído, através de ligações covalentes. Os passos da imobilização foram otimizados, resultando em um catalisador com atividade correspondente a 77% da atividade da enzima livre. As propriedades enzimáticas foram similares às das enzimas livres com pH ótimo em torno de 5,0. No entanto, a temperatura para a qual se obteve atividade máxima foi 10°C superior àquela obtida com a enzima livre, comprovando uma melhoria na estabilidade térmica após a imobilização. O tempo de meia-vida operacional para a inulase imobilizada a 50°C, utilizando como substrato uma solução 2M de sacarose, foi de 350 dias.

Células não viáveis de *Kluyveromyces marxianus* foram imobilizadas em agar e utilizadas em um reator de leito fixo para a hidrólise contínua de frutanas (BAJPAI & MARGARITIS, 1985). A coluna foi carregada com 103 UI e alimentada com extrato de Alcachofra de Jerusalém contendo 52,5 gL<sup>-1</sup> de frutanas. Operando a 45°C e com uma taxa de diluição de 0,61 h<sup>-1</sup>, apresentou 95% de conversão, produtividade volumétrica de açúcares redutores de 31 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e meia vida de 17 dias .

Os processos de imobilização utilizados nos trabalhos mencionados, na sua maioria, envolvem o confinamento da enzima/célula em um suporte através de métodos químicos, onde ligações covalentes são formadas, e de métodos físicos de adsorção, que envolvem interações mais fracas. Apesar das vantagens oferecidas pelas técnicas artificiais de imobilização, observou-se que, em geral, quando enzimas/células são

imobilizadas ocorre uma significativa perda de atividade, seja pela destruição dos sítios ativos pelos reagentes utilizados ou obstrução destes pelo material utilizado como suporte, seja pelos efeitos de resistência à transferência de massa interna e externa (RICHARDSON & PEACOCK, 1994). Além disso, essas técnicas requerem geralmente tecnologias bastante sofisticadas, tornando-as, muitas vezes, pouco viáveis para aplicação industrial.

Segundo RIBEIRO (1997), em geral, a invertase produzida pelo microrganismo não é liberada para o meio, mas fica retida no espaço periplásmico da célula. Neste contexto, a utilização de biomassa como suporte natural para invertase (auto-imobilização) apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo e que apresentou bons resultados na hidrólise da sacarose (LUCARINI *et al.*, 2000). Esses pesquisadores observaram que apesar das limitações difusivas impostas pela membrana celular, esta atua como um suporte de imobilização da enzima que melhora sua estabilidade operacional, já que, dentro da célula, a invertase apresenta menor susceptibilidade às variações de processo (pH, temperatura, força iônica). Logo, o menor custo operacional aliado à maior estabilidade justifica a escolha do uso da biomassa no lugar da invertase purificada ou artificialmente imobilizada para uso em biorreatores industriais.

ANDRADE (1991) investigou a invertase e inulase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides*, usando sacarose e inulina como substrato e variando a temperatura entre 40°C e 80°C. Nessas condições, houve estabilidade térmica dessas enzimas para uma temperatura ótima de reação igual a 60°C, a uma concentração de substrato igual a 270gL<sup>-1</sup> e pH 5,0.

## **2.5. *Cladosporium cladosporioides* como Fonte de Invertase**

*Cladosporium cladosporioides* é um fungo filamentosos do grupo Deuteromycetes encontrado principalmente no solo. O fungo *Cladosporium cladosporioides* é facilmente isolado, aparecendo, freqüentemente, quando se aplica a técnica de isolamento por diluições sucessivas.

LACERDA (1987) isolou células de *C. cladosporioides* de inhame (*Dioscorea sp.*) e selecionou esse microrganismo como produtor de inulase e invertase intracelulares, cuja temperatura ótima foi de 60°C e pH 5. Ele demonstrou a existência de dois tipos de invertase na célula: uma situada no citoplasma (intracitoplasmática) e outra no espaço

periplásmico, entre a parede celular e a membrana (extracitoplasmática), sendo que esta última representa 95% da enzima produzida pelo fungo.

ANDRADE (1991) e, posteriormente, FERREIRA (1992) estudaram o comportamento deste fungo em diversas fontes de carbono (sacarose, inulina, extrato de inhame e alcachofra de Jerusalém), e concluíram que o microrganismo produz atividades invertásica e inulásica, sendo termoestável e apresentando excelente estabilidade operacional, mantendo-se estável durante 4,5 horas, após pré-tratamento a 60°C sem substrato, sendo esse tempo aumentado para 20 horas à temperatura ambiente.

## 2.6. Cinética Enzimática Aplicada à Hidrólise da Sacarose

O estudo cinético de um processo químico ou bioquímico é uma etapa vital para investigar a formação de produtos. Um modelo cinético adequado permite uma fácil análise de dados e fornece uma estratégia para resolver problemas encontrados na etapa posterior, relacionada ao projeto de reatores.

As enzimas são catalisadores naturais, presentes em todas as atividades biológicas. Elas aumentam a velocidade de reações químicas específicas que, sem elas, ocorreriam muito lentamente, não podendo alterar o ponto de equilíbrio das reações que aceleram, e também não são usadas ou transformadas por estas reações (BLANCH & CLARK, 1997). A cinética enzimática para enzimas solúveis, também chamada de cinética intrínseca, é geralmente descrita pela relação de Michaelis-Menten ou de equilíbrio rápido (Equação 2.1)

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Nesta equação,  $v$  é a velocidade inicial da reação catalisada pela enzima ( $\text{gcm}^{-3}\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{enzi}}$ ),  $[S]$ , a concentração de substrato ( $\text{gcm}^{-3}$ ),  $V_{\max}$ , a velocidade máxima da reação catalisada ( $\text{gcm}^{-3}\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{enzi}}$ ) e  $K_m$ , a constante de Michaelis-Menten ( $\text{gcm}^{-3}$ ).

A equação de Michaelis-Mentem descreve uma curva conhecida da geometria analítica como uma hipérbole equilátera (Figura 2.1). Nesta curva, à medida que  $[S]$  cresce,  $v$  se aproxima de um valor limite  $V_{\max}$ , de forma assintótica. O valor aproximado de  $V_{\max}$  pode ser obtido, experimentalmente, a partir de uma curva de

saturação por substrato. Quando a velocidade da reação é metade de seu valor máximo, a concentração de substrato é igual a constante de Michaelis-Menten, e esse fato é a base para a determinação gráfica do  $K_M$ . Portanto, as duas constantes da equação de Michaelis-Menten podem ser obtidas a partir do gráfico de  $v$  em função de  $[S]$  (GARRETT & GRISHAM, 1995).

Observando-se a Figura 2.1, para baixas concentrações de substrato, a reação é de primeira ordem, implicando que a velocidade,  $v$ , depende da concentração do substrato,  $[S]$ . Para altas concentrações de substrato, a reação é de ordem zero, a velocidade independente de sua concentração. Os sítios ativos de todas as moléculas de enzima estarão, neste caso, saturados. A reação se processa em velocidade máxima,  $V_{\max}$  (GARRETT & GRISHAM, 1995).

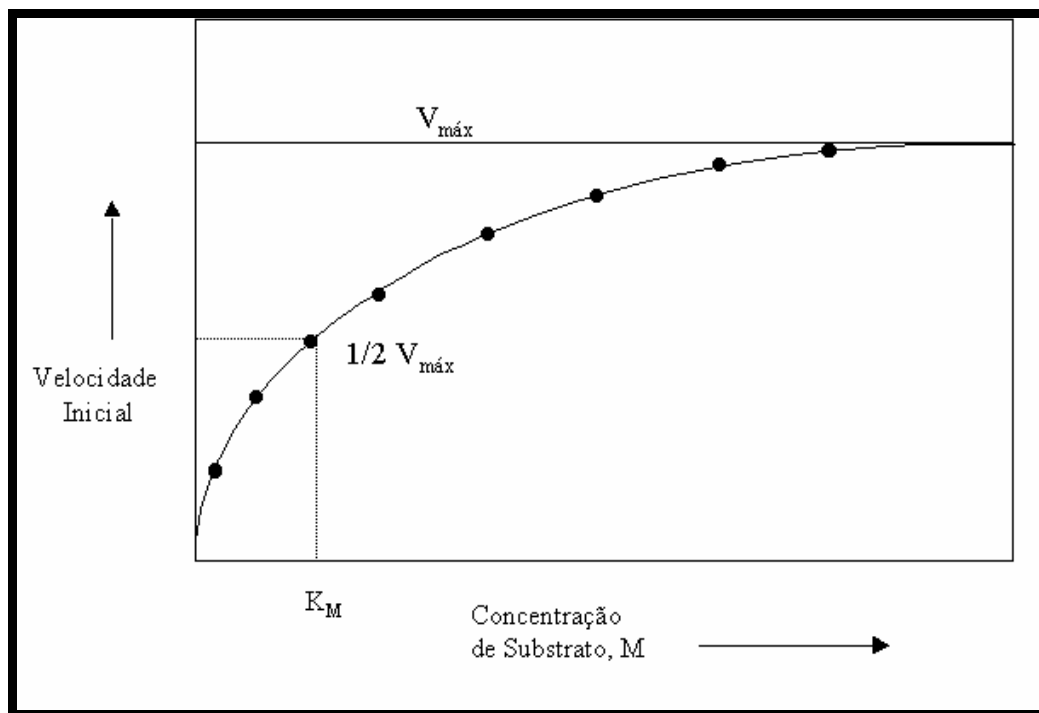


Figura 2.1 – Curva de saturação por substrato para uma reação catalisada por enzima.

Torna-se difícil determinar, experimentalmente, a partir de que ponto a velocidade é máxima, portanto, o  $V_{\max}$  da enzima. É consideravelmente mais fácil trabalhar com uma linha reta do que com uma curva.

Existem vários métodos de linearização do modelo cinético de Michaelis-Menten (Tabela 2.4) e é necessária a escolha daquele que melhor se adequa aos pontos obtidos experimentalmente. RIBEIRO & VITOLO (1997) demonstraram que

para a invertase solúvel os quatro métodos conhecidos (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, Woolf-Hofstee e Eadie-Scatchard) correlacionaram adequadamente todos os pontos experimentais, permitindo a determinação dos valores de  $K_M$  e  $V_{máx}$  com variação intermétodos de 1% para ambas as constantes cinéticas.

Tabela 2.4 – Equação de Michaelis-Menten e quatro equações de linearização derivadas (BAILEY & OLLIS, 1986).

Autores	Equação
Michaelis-Menten	$v = \frac{v_{máx} \cdot S}{K_M + S}$
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{máx}} + \frac{K_M}{v_{máx}} \cdot \frac{1}{S}$
Hanes-Woolf	$\frac{S}{v} = \frac{K_M}{v_{máx}} + \frac{S}{v_{máx}}$
Woolf-Hofstee	$v = v_{máx} - K_M \cdot \frac{v}{S}$
Eadie-Scatchard	$\frac{v}{S} = \frac{v_{máx}}{K_M} - \frac{v}{K_M}$

A imobilização da enzima em partículas porosas ou na própria célula impõe resistências adicionais que produzem parâmetros cinéticos diferentes daqueles encontrados para a enzima solúvel. Dentre estas podemos citar as restrições difusivas e interações com o suporte ou a desativação devido à imobilização (ÖZDURAL *et al.*, 2001).

A variação da velocidade da reação da invertase frente à concentração de substrato segue, parcialmente, o modelo de Michaelis–Menten. Para a sacarose, ocorre decréscimo da velocidade com concentração de substrato acima de 12%(m/v) e esta cai à metade para cerca de 25%(m/v), podendo atingir um quarto da atividade inicial com 70%(m/v) (TREVISAN, 1993). Os efeitos que causam essa redução são: menor concentração de água no sistema, efeitos inibitórios do substrato sobre o catalisador e aumento da viscosidade do meio (VITOLO, 1984; LUCARINI *et al.*, 2000).

COUTINHO FILHO *et al.* (1999) estudaram um modelo cinético para a conversão enzimática da sacarose em glicose e frutose utilizando a forma livre da enzima



invertase. As taxas iniciais para a conversão da sacarose em glicose e frutose foram estudadas tendo-se como substrato a sacarose em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que o modelo de inibição não competitivo pelo substrato, para obtenção da glicose e frutose pode ser usado para descrever a cinética da reação com um intervalo de confiança em torno de 99,9%. Segundo a literatura, o modelo de inibição por substrato é o que melhor se ajusta para descrever esse processo. Uma comparação usando uma simulação para este modelo e comparando com os resultados experimentais mostraram que o modelo descreve bem a reação em um reator em batelada usando uma concentração inicial de sacarose de  $600\text{gL}^{-1}$ .

Na situação em que ocorre inibição por substrato, duas moléculas do substrato ligam-se rapidamente a um mesmo sítio ativo, originando um complexo Enzima-Substrato cataliticamente inativo. A inibição por substrato é uma forma especial de inibição incompetitiva que pode ser, satisfatoriamente, representada pela Equação 2.2 (BLANCH & CLARK, 1997):

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (2.2)$$

em que  $K_i$  é a constante de equilíbrio para o substrato na forma inibitória ( $\text{g.cm}^{-3}$ ).

## 2.7. Modelagem Cinética da Enzima Auto-Imobilizada

Quando a enzima é imobilizada dentro de um suporte sólido, o substrato deve se difundir do seio da solução até o sítio ativo da enzima. Assim, quando a velocidade de difusão do substrato é menor do que a velocidade de transformação pela enzima, a velocidade observada é mais baixa do que a esperada para uma dada concentração de enzima em solução, visto que nem todas as moléculas de enzima estarão em contato com o substrato. Sendo assim, a avaliação do bioprocessamento descontínuo com enzimas imobilizadas deve ser realizada com base na equação de Michaelis-Menten, considerando-se os efeitos de transferência de massa (Equação 2.3).

$$v = \frac{V_{\max} [S]_{\text{ext}}}{K_m + [S]_{\text{ext}}} \quad (2.3)$$

A velocidade de fluxo de substrato ( $N_s$ ) do seio da solução para a superfície catalítica pode ser descrita pela relação:

$$N_s = a_{LS}k_{LS}([S] - [S]_{\text{ext}}) \quad (2.4)$$

na qual,  $a_{LS}$  é área interfacial líquido-sólido ( $\text{cm}^2$ ),  $k_{LS}$  é o coeficiente de transporte de massa do substrato ( $\text{cm min}^{-1}$ ),  $[S]$  é a concentração de substrato no seio da solução ( $\text{gcm}^{-3}$ ) e  $[S]_{\text{ext}}$  é a concentração de substrato na superfície catalítica ( $\text{gcm}^{-3}$ ).

Na superfície de reação, o fluxo de substrato para a superfície e sua transformação pela enzima, a qual obedece a lei de Michaelis-Menten, ocorrem simultaneamente. Quando o equilíbrio é alcançado, os dois processos ocorrem com a mesma velocidade. Assim:

$$v = N_s = r_{s\text{ aparente}} \quad (2.5)$$

Aplicando 2.3 e 2.4, tem-se:

$$r_{s\text{ aparente}} = a_{LS}k_{LS}([S] - [S]_{\text{ext}}) = \frac{V_{\text{max}}[S]_{\text{ext}}}{K_M + [S]_{\text{ext}}} \quad (2.6)$$

$$r_{s\text{ aparente}} = \frac{[S] - [S]_{\text{ext}}}{a_{LS}k_{LS}} = \frac{[S]_{\text{ext}}}{\frac{K_M}{V_{\text{max}}} + \frac{[S]_{\text{ext}}}{V_{\text{max}}}} \quad (2.7)$$

$$r_{s\text{ aparente}} = \frac{[S]}{\frac{1}{a_{LS}k_{LS}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} + \frac{[S]_{\text{ext}}}{V_{\text{max}}}} \quad (2.8)$$

No início da reação, quando  $t \cong 0$ , temos que  $[S]_{\text{ext}} \ll [S]$ , logo  $\frac{[S]_{\text{ext}}}{V_{\text{max}}} \rightarrow 0$  e

$$r_{s\text{ aparente}} = \frac{[S]}{\frac{1}{a_{LS}k_{LS}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}}} \quad (2.9)$$

Os efeitos difusivos externos podem ser minimizados tanto pelo aumento da agitação, no caso de sistemas descontínuos ou contínuos perfeitamente agitados, quanto pelo aumento do fluxo de substrato, caso do reator tipo pistão (BORZANI *et al.*, 2001).

## 2.8. Sistemas de Contato Fluido-Sólido

Para uma biocatálise eficiente necessita-se de um biocatalisador específico e um biorreator adequado. O biorreator pode ser considerado o equipamento central de

qualquer bioprocesso industrial. Este é precedido pelas operações de preparo de meios e seguido pelas operações de separação e purificação do produto de interesse. A integração da maioria das etapas envolvidas no bioprocessamento pode se tornar importante para redução de custos e elevação da produtividade (LUCARINI *et al.*, 2000).

Nos processos em escala industrial, reatores contínuos com enzimas imobilizadas tendem a ser mais utilizados que os reatores em batelada, pois eles permitem a reutilização do biocatalisador sem a necessidade de recuperação dos mesmos a cada batelada. Os processos contínuos com enzimas imobilizadas podem ser realizados em diferentes tipos de reatores. A Tabela 2.5 apresenta, resumidamente, as vantagens e desvantagens dos métodos mais comumente utilizados (HOWARD *et al.*, 1989).

Tabela 2.5 – Comparação dos métodos de contato fluido-sólido (HOWARD *et al.*, 1989).

<b>Método</b>	<b>Leitos Fixos</b>	<b>Leitos Fluidizados</b>
<b>Vantagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto tempo de residência do fluido;</li> <li>• Vazões altas através de leitos confinados à custa de uma maior perda de carga.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bom contato fluido-sólido;</li> <li>• Temperatura uniforme e controle do processo, resultando em qualidade uniforme dos produtos;</li> <li>• Pode ser usada uma maior faixa de tamanho de partículas;</li> </ul>
<b>Desvantagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa velocidade do fluido e tamanho reduzido do reator;</li> <li>• Somente partículas grandes;</li> <li>• Gradientes de temperatura excessivos ;</li> <li>• Perigo de sinterização ou obstrução do reator e não uniformidade do produto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perda de carga e aumento da turbulência do sistema;</li> <li>• Erosão do recipiente e tubos e formação de partículas de diferentes tamanhos produzidas pelo atrito;</li> <li>• Elutriação de partículas que pode limitar o desempenho do reator;</li> <li>• Refluxo de fluido pode ser excessivo.</li> </ul>

Como pode ser observado nesta tabela, os reatores de leito fluidizado possuem várias vantagens sobre os de leito fixo. Segundo BÓDALO *et al.*, (1995), os reatores de leito fluidizado são convenientes quando os substratos são viscosos ou particulados, pois a fluidização melhora o contato fluido-sólido e, conseqüentemente, as propriedades de transferência de massa. Além disso, neste tipo de reator pode ser usada uma maior faixa de tamanho de partículas e, como não é necessária agitação mecânica, evita-se a destruição do suporte pelo impacto com o agitador. Porém, vale ressaltar que o projeto de sistemas de contato deve levar em consideração, além das restrições operacionais, as restrições econômicas.

## 2.9. Modelagem para Consumo de Substrato em Sistema Descontínuo

Um reator descontínuo perfeitamente agitado ideal é espacialmente homogêneo como resultado de uma intensiva agitação. Com o controle adequado da temperatura e do pH, estes parâmetros podem também ser mantidos em valores uniformes no reator. Os bioprocessos que utilizam biocatalisadores imobilizados apresentam desvios da idealidade, em razão de resistências oferecidas ao transporte de matéria na fase fluida externa e próxima aos grãos sólidos (BAILEY & OLLIS, 1986). Levando-se em consideração estas resistências à transferência de massa, o balanço de massa para o substrato em um biorreator descontínuo fornece:

$$-r_{\text{Saparente}} \cdot m_{\text{cat}} = \frac{d[S]}{dt} \cdot V_L \quad (2.10)$$

na qual,  $r_{\text{Saparente}}$  é a velocidade da reação aparente específica, que leva em consideração os efeitos de transferência de massa ( $\text{min}^{-1}$ );  $m_{\text{cat}}$  é a massa do catalisador (g);  $d[S]/dt$  é a taxa de consumo de substrato ( $\text{g cm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ); e  $V_L$  é o volume de substrato no reator ( $\text{cm}^3$ ).

Substituindo a Equação 2.8 na Equação 2.10, obtém-se:

$$-V_L \frac{d[S]}{dt} = \frac{[S]m_{\text{cat}}}{\frac{1}{a_{\text{LS}}k_{\text{LS}}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} + \frac{[S]}{V_{\text{max}}}} \quad (2.11)$$

Fazendo-se:

$$M = \left( \frac{1}{a_{\text{LS}}k_{\text{LS}}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \right) \quad (2.12)$$

na qual  $k_{LS}$  é estimado pela correlação de Calderbank & Jones (BAILEY & OLLIS, 1986) expressa pela equação:

$$k_{LS} \left( \frac{\mu_L}{\rho_L (D_{LS})} \right)^{2/3} = 0,34 \left( \frac{(\rho_{sol} - \rho_L) \mu_L g}{\rho_L^2} \right)^{1/2} \quad (2.13)$$

e

$$a_{LS} = \frac{6\omega}{\rho_{sol} \cdot d_p} \quad (2.14)$$

Nestas equações  $\mu_L$  é a viscosidade da solução de substrato ( $g \text{ cm}^{-1} \text{ min}^{-1}$ );  $D_{LS}$  a difusividade líquido/sólido ( $\text{cm}^2 \text{ min}^{-1}$ );  $\rho_{sol}$ , a massa específica do biocatalisador ( $\text{g cm}^{-3}$ );  $\rho_L$  a massa específica do substrato ( $\text{g cm}^{-3}$ );  $d_p$  o diâmetro da partícula (cm);  $\omega$  é expresso em g de partícula  $\text{cm}^{-3}$  de substrato e  $g$  é a aceleração da gravidade ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-2}$ ). O valor de  $D_{LS}$  é calculado pela correlação de WILKE & CHANG (1955):

$$D_{LS} = \frac{7,4 \times 10^{-8} (\xi_{H_2O} M_{H_2O})^{1/2} T}{V_S^{0,6} \mu_L} \quad (2.15)$$

na qual,  $\xi_{H_2O}$  é 2,6 quando o solvente é a água;  $V_S$ , o volume molar do substrato ( $\text{cm}^3 \text{ gmol}^{-1}$ );  $M_{H_2O}$ , a massa molecular da água (g) e T, a temperatura ( $^{\circ}\text{K}$ ).

Substituindo a Equação 2.12 na Equação 2.11, tem-se:

$$-\frac{V_L}{m_{cat}} \frac{d[S]}{dt} = \frac{[S]}{M + \frac{[S]}{V_{max}}} \quad (2.16)$$

Separando as variáveis obtém-se:

$$\frac{\left( M + \frac{[S]}{V_{max}} \right)}{[S]} d[S] = -\frac{m_{cat}}{V_L} dt \quad (2.17)$$

Integrando de  $[S]_0$  a  $[S]$  e de 0 a t, resulta:

$$\ln \frac{[S_0]}{[S]} = \frac{1}{MV_{max}} ([S] - [S_0]) + \frac{m_{cat}}{MV_L} t \quad (2.18)$$

A Equação 2.18 fornece o perfil do consumo de substrato no decorrer da reação em sistema descontínuo.

## 2.10. Sistemas Contínuos de Contato Enzima-Substrato

Encontram-se na literatura alguns modelos de projeto para reatores contínuos com enzimas imobilizadas, mas, enquanto uns modelos não levam em consideração os efeitos difusivos dentro das partículas, outros foram desenvolvidos para cinéticas simples. BÓDALO *et al.* (1995) desenvolveram um modelo geral para o projeto de um biorreator contínuo, levando em consideração as limitações de transferência de massa interna e externa e resolveram-no para uma cinética de Michaelis-Menten irreversível.

O tratamento matemático que será apresentado a seguir fundamenta-se neste trabalho (BÓDALO *et al.*, 1995).

Para formular as equações que descrevem o comportamento do reator, foram feitas as seguintes considerações:

- ◆ O diâmetro do reator é uniforme e a altura é determinada pela altura do leito. Assume-se que o reator está sob condições isotérmicas e em regime estacionário.
- ◆ A enzima encontra-se imobilizada dentro de partículas esféricas, as quais encontram-se uniformemente suspensas no reator.
- ◆ O fluxo difusivo do substrato dentro da partícula catalítica pode ser modelado pela primeira Lei de Fick:

$$N_s = -D_{LS} \frac{d[S]}{dr} \quad (2.19)$$

sendo  $r$ , o raio da partícula catalítica e  $D_{LS}$ , a difusividade efetiva que é independente da concentração.

- ◆ O transporte de substrato através do filme líquido estagnado em torno das partículas é descrito por:

$$N_s = a_{LS} k_{LS} ([S] - [S]_{\text{ext}}) \quad (2.20)$$

na qual,  $a_{LS}$  é área interfacial líquido-sólido ( $\text{cm}^2$ ),  $k_{LS}$  é o coeficiente de transporte de massa do substrato ( $\text{cm min}^{-1}$ )  $[S]$  é a concentração de substrato no seio da solução ( $\text{gcm}^{-3}$ ) e  $[S]_{\text{ext}}$  é a concentração do substrato na superfície externa do catalisador ( $\text{gcm}^{-3}$ ).

De acordo com as considerações feitas pode-se formular a seguinte expressão para o Balanço de Massa Global do substrato dentro do reator:

$$\left[ \begin{array}{l} \text{taxa molar de} \\ \underline{S} \text{ na entrada do} \\ \text{reator} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{l} \text{taxa molar de} \\ \underline{S} \text{ na saída do} \\ \text{reator} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{l} \text{taxa de consumo} \\ \text{de } \underline{S} \text{ dentro do} \\ \text{reator} \end{array} \right]$$

Quando aplicado a um reator contínuo com escoamento do tipo pistão ideal em regime estacionário, a expressão do balanço de massa torna-se:

$$-u_f S_T \frac{d[S]}{dm} = r_{S\text{aparente}} \quad (2.21)$$

na qual,  $u_f$  é a velocidade linear do líquido ( $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ ) (no caso de reator de leito fluidizado,  $u_f = u_{mf}$  = velocidade mínima de fluidização),  $S_T$ , a área transversal do reator tubular ( $\text{cm}^2$ ),  $m$ , a massa do biocatalisador e  $r_{S\text{aparente}}$ , a velocidade aparente de consumo de substrato por unidade de massa de catalisador ( $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de catalisador).

Lembrando que:

$$u_f S_T = Q = \frac{G}{\rho_{\text{sol}}} \quad \text{e} \quad \tau = \frac{m}{G}$$

nas quais  $Q$  é a vazão volumétrica ( $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ );  $G$ , a vazão mássica ( $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ );  $\rho_{\text{sol}}$ , a massa específica da partícula de catalisador ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ );  $m$ , a massa do catalisador ( $\text{g}$ ) e  $\tau$ , o tempo de residência no reator ( $\text{min}$ ), a equação do balanço de massa pode ser reescrita como:

$$-\frac{1}{\rho_{\text{sol}}} \frac{d[S]}{d\tau} = r_{S\text{aparente}} \quad (2.22)$$

As Equações 2.21 e 2.22 contêm a velocidade média da reação,  $r_{S\text{aparente}}$  que é definida com base nas concentrações observáveis do substrato medidas no seio do fluido, e cuja quantificação deve considerar os fenômenos de transferência de massa no filme estacionário de fluido em torno da partícula e no interior de sua estrutura porosa. Da avaliação cinética vista na Equação 2.8, tem-se que:

$$r_{S\text{aparente}} = \frac{[S]}{\frac{1}{a_{LS}k_{LS}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} + \frac{[S]}{V_{\text{max}}}} \quad (2.8)$$

Assim, substituindo-se a Equação 2.8 na equação do balanço de massa, Equação 2.22, obtém-se:

$$-\frac{1}{\rho_{\text{sol}}} \frac{d[S]}{d\tau} = \frac{[S]}{M' + \frac{[S]}{V_{\text{max}}}} \quad (2.23)$$

Nesta equação,  $M'$  é dado por:

$$M' = \left( \frac{1}{a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}}} + \frac{K_{\text{M}}}{V_{\text{max}}} \right) \quad (2.24)$$

Para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa líquido-sólido para o sistema contínuo,  $a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}}$ , recorre-se à correlação de FAN *et al.* (1960), expressa pela equação:

$$\text{Sh} = 2,0 + 1,031[(1 - \varepsilon) \text{Re}]^{1/2} \text{Sc}^{1/3} \quad (2.25)$$

Os números adimensionais, Sh, Re e Sc, da correlação 2.25 são dados por:

$$\text{Sh} = \frac{k'_{\text{LS}} d_{\text{p}}}{D_{\text{LS}}}, \quad \text{Re} = \frac{\rho_{\text{L}} u_{\text{f}} d_{\text{p}}}{\mu_{\text{L}}}, \quad \text{Sc} = \frac{\mu_{\text{L}}}{\rho_{\text{L}} D_{\text{LS}}} \quad (2.26)$$

Nestas equações  $\mu_{\text{L}}$  é a viscosidade da solução de substrato ( $\text{g cm}^{-1} \text{min}^{-1}$ );  $k'_{\text{LS}}$  é o coeficiente de transporte de massa ( $\text{cm min}^{-1}$ );  $D_{\text{LS}}$  a difusividade líquido/sólido ( $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$ );  $\rho_{\text{L}}$ , a massa específica do substrato ( $\text{g cm}^{-3}$ );  $d_{\text{p}}$  o diâmetro da partícula (cm); e  $\varepsilon$  é a fração de vazios do reator (adimensional). O valor de  $D_{\text{LS}}$  é calculado pela correlação de WILKE & CHANG (1955):

$$D_{\text{LS}} = \frac{7,4 \times 10^{-8} (\xi_{\text{H}_2\text{O}} M_{\text{H}_2\text{O}})^{1/2} T}{V_{\text{S}}^{0,6} \mu_{\text{L}}} \quad (2.15)$$

na qual,  $\xi_{\text{H}_2\text{O}}$  é 2,6 quando o solvente é a água;  $V_{\text{S}}$ , o volume molar do substrato ( $\text{cm}^3 \text{gmol}^{-1}$ );  $M_{\text{H}_2\text{O}}$ , a massa molecular da água (g) e T, a temperatura ( $^{\circ}\text{K}$ ).

Admitindo-se que  $\varepsilon$ ,  $\rho_{\text{sol}}$  e os parâmetros cinéticos  $K_{\text{M}}$  e  $V_{\text{max}}$  são constantes e separando-se as variáveis na Equação 2.23, obtém-se:

$$-\frac{1}{\rho_{\text{sol}}} \left[ M' \frac{d[S]}{[S]} + \frac{[S]}{V_{\text{max}}} \frac{d[S]}{[S]} \right] = d\tau \quad (2.27)$$

Integrando de  $[S]_0 \rightarrow [S]$  e de  $0 \rightarrow \tau$ , resulta:



$$\ln \frac{[S_0]}{[S]} = \frac{\rho_{\text{sol}}}{M'} \left[ \frac{1}{V_{\text{max}}} ([S] - [S_0]) + \tau \right] \quad (2.28)$$

A Equação 2.28 relaciona a concentração de substrato na saída do reator em função da concentração de substrato na entrada e dos parâmetros cinéticos de  $M'$ ,  $K_M$  e  $V_{\text{Max}}$ , tendo-se  $\tau$ , o tempo de residência no biorreator.

Devido à não-linearidade da expressão cinética, a resolução da Equação 2.28, ou seja, a determinação da concentração do substrato na saída do reator, torna-se bastante complexa. Neste caso, é conveniente resolver as equações numericamente. Para facilitar o procedimento numérico, uma série de variáveis e parâmetros adimensionais devem ser introduzidos a fim de reescrever as equações acima mencionadas em suas formas adimensionais.

## 2.11. Fluidização

Em processos industriais nem sempre se tem uma homogeneidade das partículas ou mesmo do fluido. Para resolver estes problemas adota-se um valor médio para as propriedades do sistema, onde as partículas são admitidas de mesmo tamanho e o fluido monofásico. Desta forma tem-se um sistema mais simples possível. Este artifício poderá ser utilizado para estudar sistemas irregulares, onde se tem partículas de tamanhos diferentes ou várias fases presentes no fluido, nestes casos são utilizadas propriedades médias para o diâmetro das partículas, densidade das partículas e viscosidade da fase fluida (SIQUEIRA, 2001).

Uma equação capaz de representar bem os dados experimentais para um sistema de leito fluidizado se torna complexa, devido, principalmente, ao fato de que para haver a fluidização de um leito é necessária uma vazão suficientemente grande, o que pode não ocorrer, já que a perda de carga na coluna pode ser alta e o sistema de alimentação pode não promover a fluidização (DAVIDSON *et al.*, 1985).

Para o projeto de sistemas que operem a leito fluidizado, a determinação da velocidade mínima de fluidização é muito importante, pois uma má determinação pode levar a sistemas mal projetados, utilizando vazões superiores à necessária para a fluidização.

A Figura 2.2 mostra um gráfico qualitativo do comportamento da perda de carga e da altura do leito em função da velocidade, de leitos fixos e fluidizados (SIQUEIRA, 2001).

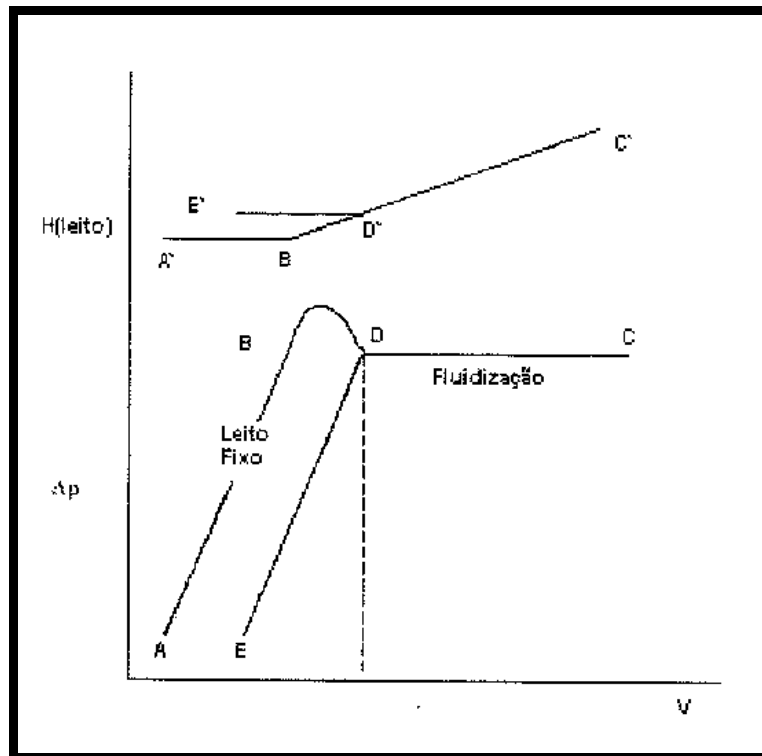


Figura 2.2 – Gráfico qualitativo do comportamento da perda de carga e da altura do leito em função da velocidade, de leitos fixos e fluidizados

Na Figura 2.2 a reta  $AB$  é obtida quando a velocidade superficial do fluido é baixa e as partículas estão imóveis, nesta região temos a situação de leito fixo, onde a altura do leito permanece constante ( $A'B'$ ) e a perda de carga aumenta com a velocidade. A partir do ponto  $B$  há uma elevação da perda de carga devido ao rompimento das forças de atração que unia as partículas, em seguida, a perda de carga se torna constante mesmo com o aumento da velocidade superficial, e pequenas variações no leito começam a ser notadas. Por outro lado, verifica-se que a altura do leito aumenta com a velocidade do fluido.

Partindo-se do ponto  $C$ , pode-se observar que uma nova curva é formada ( $CDE$ ) e ( $C'D'E'$ ), onde o ponto  $D$  e  $D'$  correspondem ao novo ponto de mínima fluidização. A explicação para a mudança ocorrida se deve a uma melhor acomodação das partículas, o que resulta numa fração de vazios,  $\epsilon_{mf}$ , conhecida como fração de vazios de mínima fluidização.

No ponto D a fluidização é insipiente, se a velocidade superficial do fluido aumentar, o leito irá para a situação de fluidização.

Muitas correlações são descritas para o cálculo da velocidade mínima de fluidização e algumas, que tiveram reconhecimento por sua validade, estão descritas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Relações para a velocidade mínima de fluidização (DAVIDSON *et al.*, 1985)

Autor	Faixa de Utilização $Re_{mf}$	Equação
Rowe & Henwood (1961)	0,023 - 1030	$C_D \cdot Re_{mf}^2 = \frac{1}{68,5} \cdot \frac{4}{3} \cdot \frac{d_p^3 \rho_L (\rho_{Sol} - \rho_L) \cdot g}{\mu^2}$ $C_D = \frac{24}{Re_{mf}} \cdot (10,15 \cdot Re_{mf}^{0,687})$
Wen & Yu (1966)	0,01 - 1000	$Re_{mf} = \left[ (33,7)^2 + 0,0408 \cdot Ga \cdot Mv \right]^{1/2} - 33,7$
Riba <i>et al.</i> (1978)	10 - 1000	$Re_{mf} = 154 \cdot 10^2 \cdot Ga^{0,66} \cdot Mv^{0,70}$

Nesta tabela os termos  $Re_{mf}$ ,  $C_D$ ,  $Ga$  e  $Mv$  são, respectivamente, número de Reynolds para mínima fluidização, coeficiente de arraste, número de Galileo e razão de massas específicas. As equações utilizadas nos cálculos destes termos são expressas da seguinte forma:

$$Re_{mf} = \frac{u_{mf} \cdot d_p \cdot \rho_L}{\mu_L}, \quad Ga = \frac{d_p^3 \cdot \rho_L^2 \cdot g}{\mu_L^2}, \quad Mv = \frac{\rho_{Sol} + \rho_L}{\rho_L}$$

nas quais,  $u_{mf}$ , é a velocidade mínima de fluidização ( $cm \cdot min^{-1}$ ),  $d_p$ , o diâmetro da partícula ( $cm$ ),  $\rho_L$ , a massa específica do líquido ( $g \cdot cm^{-3}$ ),  $\rho_{Sol}$ , a massa específica da partícula ( $g \cdot cm^{-3}$ ) e  $\mu_L$ , a viscosidade do líquido ( $g \cdot cm^{-1} \cdot min^{-1}$ ).

Para um leito ser operado, seguramente, em regime fluidizado, é aconselhável a operação a 20% acima da mínima fluidização (DAVIDSON *et al.*, 1985)

A fração de vazios ( $\epsilon_f$ ) e o volume ( $v_f$ ) do leito fluidizado são dependentes da velocidade de fluidização ( $u_f$ ).  $\epsilon_f$  é definido como a razão entre o volume de líquido e o volume total, e pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\varepsilon_f = 1 - \left( \frac{m_{\text{cat}}}{S_T L_f \rho_P} \right)$$

na qual  $m_{\text{cat}}$  é a massa de partículas de biocatalisador (g),  $S_T$ , a área da seção transversal do reator tubular ( $\text{cm}^2$ ) e  $L_f$ , a altura do leito fluidizado (cm).

Levando-se em consideração essas observações, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um processo bioquímico contínuo para produção de concentrados de açúcar invertido (glicose+frutose) a partir de xaropes com elevado teor de sacarose, utilizando-se o fungo *Cladosporium cladosporioides* como fonte natural de enzimas invertases (E.C. 3.2.1.26).

### **3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

#### **3.1. Enzima**

- Invertase Auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides* 4331 – URM
- Invertase Livre Purificada GRAU V Merck®

#### **3.2. Meios de Cultura**

- Meio semi-sintético Batata Dextrose Agar (BDA) Merck® para manutenção das culturas do fungo.
- Meio sintético Czapeck para crescimento

#### **3.3. Substratos e Reagentes**

- Acetato de Sódio P.A., Vetec
- Nitrato de Sódio P.A., Vetec
- Fosfato de Potássio Dibásico P.A., Vetec
- Sulfato de Magnésio P.A., Nuclear
- Cloreto de potássio P.A., Nuclear
- Sulfato Ferroso P.A., Riedel – De Haën.
- Tartarato de Sódio e Potássio Tetrahidratado P.A, Riedel – De Haën.
- Dispersante Tween 80, Vetec
- Ácido Dinitro-3,5 Salicílico P.A., Vetec
- KIT Enzimático para Determinação de Glicose, Laborlab
- Sacarose P.A. Vetec
- Glicose P.A. Vetec
- Frutose P.A. Vetec

### 3.4. Vidraria e Equipamentos

- Frascos de Erlenmeyer de 50 mL, 100 mL, 250 mL e 500 mL
- Balões volumétricos e béqueres de 100 mL, 200 mL e 250 mL
- Placas de Petri
- Tubos de ensaio
- Pipetas graduadas de 0,1 mL, 1 mL, 5 mL e 10 mL
- Tubos Eppendorf
- Tubos de Follin-Wu
- Lâminas e lamínulas
- Provetas.
- Estufa de secagem e esterilização FANEM<sup>®</sup> Modelo 315 SE
- Estufa incubadora para BOD modelo 347F FANEM<sup>®</sup>
- Fornos e autoclave
- Banho Termostático – Thermomix<sup>®</sup> BM, B. Braun Biotech International
- Banho-Maria Dubnoff Modelo 145, FANEM<sup>®</sup>
- Espectrofotômetro Espectroquant<sup>®</sup> NOVA 60 - Merck
- Microscópios ópticos Studar Lab
- Mesa agitadora
- Cabine de fluxo laminar Labconco
- Balança semi-analítica Kern 430-21
- Potenciômetro OP-265 Radelkis
- Bomba peristáltica Masterflex<sup>®</sup> L/S<sup>TM</sup> modelo 7519-20
- Bomba peristáltica Watson Marlow Perimax 12/16 Antiplus
- Reator tubular em vidro Pyrex, encamisado, de 39 cm de comprimento e 1,7 cm de diâmetro.

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo será apresentado o desenvolvimento experimental no estudo da produção de açúcar invertido por hidrólise enzimática, utilizando o fungo *Cladosporium cladosporioides* como suporte natural da enzima invertase em sistema descontínuo e em sistemas contínuos de leito fixo e fluidizado.

As atividades experimentais envolveram várias etapas, destacando-se o cultivo do microrganismo *Cladosporium cladosporioides*, a caracterização da invertase fúngica e comparação com a enzima livre, o planejamento experimental para a otimização do processo de hidrólise, a determinação dos parâmetros cinéticos em sistema descontínuo e a avaliação em sistemas contínuos de leitos fixo e fluidizado.

### 4.1. Cultivo do *Cladosporium Cladosporioides*

#### 4.1.1. Preparação dos Meios de Cultivo

As composições dos meios de cultivo utilizados nas etapas de manutenção e crescimento do microrganismo estão apresentadas a seguir:

◆ *Meiosemi- sintético Batata Dextrose Agar (BDA) Merck® para manutenção*

BDA .....	39 g
Água Destilada .....	1000 mL

Este meio, depois de preparado e esterilizado durante 20 minutos em autoclave a 120°C, foi distribuído em tubos de ensaio e placas de Petri, e armazenados sob refrigeração por até 20 (vinte) dias.

◆ *Meio sintético Czapeck para crescimento*

Nitrato de Sódio (NaNO <sub>3</sub> ) .....	3g
Cloreto de Potássio (KCl) .....	0,5g
Sulfato de Magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O).....	0,5g
Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) .....	0,01g
Fosfato de Potássio Dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	1g
Sacarose P.A. ....	30g
Água Destilada .....	1000mL

Este meio, depois de preparado por dissolução, teve o pH ajustado para 6,6, foi distribuído em frascos de Erlenmeyer e esterilizado durante 20 minutos em autoclave a 120°C. Posteriormente, foram armazenados à temperatura ambiente durante, no máximo, 5 (cinco) dias.

#### 4.1.2. *Cultivo do Microrganismo*

Foi utilizada a linhagem *Cladosporium cladosporioides* URM 4331, pertencente à coleção do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. As culturas foram preparadas em tubos de ensaio contendo 10ml de meio BDA inclinado. Após crescimento em estufa a 30°C durante 10 (dez) dias, a cultura foi conservada sob refrigeração, a 4°C, e repicada a cada 30 dias.

#### 4.1.3. *Crescimento Celular*

Após o crescimento da cultura em tubos de ensaio, foram adicionados, de forma asséptica, 10ml de água estéril, contendo o dispersante Tween 80 para desprendimento dos esporos e posterior contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, foram inoculados cerca de  $10^6$  esporos em frascos de Erlenmeyer de 250ml contendo 100ml de meio Czapeck (ANDRADE, 1991). O crescimento do fungo foi então realizado em mesa agitadora sob agitação constante de 300 rpm à temperatura ambiente (28°C-30°C), durante 20 (vinte) dias. O processo de crescimento foi acompanhado por medições de pH e testes de pureza para verificar a presença de contaminantes microbianos, através de observações microscópicas.

#### 4.1.4. *Determinação da Biomassa*

Para a determinação da biomassa, inoculou-se  $10^6$  esporos em 60 frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Czapeck que foram submetidos à agitação de 300 rpm durante 30 dias consecutivos. A cada 24 horas, o crescimento era interrompido em 2 frascos: as células eram separadas do sobrenadante por filtração a vácuo, lavadas com tampão acetato de sódio (0,1M e pH=5) e pesadas para determinação da biomassa úmida. Em seguida, as células eram colocadas em estufa à 105°C durante 12 horas ou até peso constante para posterior determinação da biomassa seca.



A partir dos dados obtidos foi construída uma curva de crescimento da concentração de biomassa ( $\text{gL}^{-1}$ ) em função do tempo de cultivo (dias).

#### 4.1.5. *Determinação do Diâmetro Médio dos Pellets*

A descrição das propriedades primárias das partículas, como o tamanho e sua distribuição, esfericidade e densidade fundamentam a tecnologia dos sistemas particulados. Essas propriedades, bem como as propriedades primárias do líquido, viscosidade e densidade, determinam características importantes do sistema tais como velocidade de sedimentação, porosidade e permeabilidade do leito de partículas, conhecimento este de vital importância para os projetos e operação com sistemas particulados. A caracterização da dimensão de partículas irregulares é normalmente feita por análise de alguma medida relevante que se encontra sob investigação, podendo-se levar em conta volume, densidade ou diâmetro estatístico. O diâmetro estatístico é obtido quando a dimensão linear é medida de forma direta. Neste caso, pode-se usar o diâmetro de Feret, onde a medida da partícula é feita entre duas tangentes paralelas, perpendiculares ao maior diâmetro (SVAROVSKY, 1981).

Após o cultivo do fungo *Cladosporium cladosporioides* em meio Czapeck, sob agitação de 300 rpm, foram selecionados, aleatoriamente, 50 *pellets* de biocatalisador tendo a forma esférica predominante, para os quais foi calculada a média de tamanho através de medidas representadas pelo diâmetro médio das partículas, segundo Feret (SVAROVSKY, 1981).

#### 4.1.6. *Caracterização Textural dos Pellets*

Os sistemas particulados, catalíticos ou não, são fortemente influenciados pelas propriedades texturais da partícula, a partir de seus parâmetros mais significativos como massa específica e porosidade. Esses parâmetros são fatores que afetam o processo catalítico, seja este enzimático ou não.

##### a) *Determinação da Massa Específica dos Pellets*

A massa específica é uma propriedade típica de toda matéria, correspondente à razão entre a massa e o volume de uma determinada matéria. Contudo, quando

precisamente medida, a massa específica revela muito sobre a composição do material, fornecendo informação com a qual se mantém um processo sob controle (SIQUEIRA, 2001).

A determinação da massa específica da amostra de *pellets* foi realizada em triplicata através do método do picnômetro – Micrometrics Multivolume Picnometer 1305.

#### b) Determinação da Porosidade dos *Pellets*

A porosidade é definida como a fração de volume aparente da amostra porosa que é ocupada pelos poros ou espaços vazios. Em valor numérico, varia entre 0 e 1, dependendo do tipo de estrutura porosa envolvida.

Para a determinação da porosidade dos *pellets*, 20g da amostra foram transferidos para uma proveta de 100mL. Em seguida, tomou-se 100mL de água destilada e completou-se o volume da proveta contendo os *pellets*. Anotou-se, então, o volume de água remanescente, subtraiu-se este volume do volume total ( $V_{\text{vazio}}$ ) e calculou-se a porosidade através da seguinte expressão:

$$\varepsilon_b = \frac{V_{\text{vazio}}}{V_{\text{total}}} \quad (4.1)$$

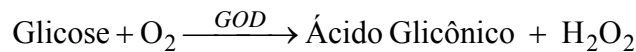
## 4.2. Determinações Analíticas

### 4.2.1. Atividade Hidrolítica sobre a Sacarose

A atividade hidrolítica da invertase foi feita pela dosagem dos açúcares redutores (frutose e glicose) formados pela ação da invertase sobre a sacarose. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do Ácido Dinitrossalicílico - DNS (MILLER, 1959). De acordo com este método, esses açúcares reduzem o ácido dinitrossalicílico, gerando complexos de coloração alaranjada, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria a 540 nm. A construção de uma curva-padrão contendo glicose permite associar a absorbância com a concentração dos produtos de reação da invertase. Desta forma, foi possível medir a velocidade de formação dos produtos por volume de enzima em um dado intervalo de tempo em todos os experimentos realizados.

#### 4.2.2. Dosagem da D-Glicose

A dosagem da glicose foi feita pelo método enzimático da glicose oxidase (GOD), através do *Kit* Bioclin GOD-CLIN, onde a glicose é oxidada a ácido glicônico por ação desta enzima, com liberação de peróxido de hidrogênio de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio, por sua vez, em presença da enzima peroxidase (POD) reage com a 4-amino-antipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho-cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose presente.



*Procedimento:* Foram marcados 3 tubos de ensaio: B (Branco), P (Padrão) e D (Amostra). Em cada tubo, foram colocados os seguintes volumes:

	B	P	D
Amostra (mL)	X	X	0,1
Padrão (mL)	X	0,1	X
Reativo de Trabalho (mL)	7,0	7,0	7,0

Incubou-se os tubos em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da Absorbância (Abs) a 505 nm. A cor permaneceu estável por 60 minutos.

*Cálculo:*

$$\text{mg dL}^{-1} \text{ Glicose} = \frac{\text{Abs Amostra}}{\text{Abs Padrão}} \times 100$$

### 4.3. Caracterização da Invertase Auto-Imobilizada no Fungo *Cladosporium cladosporioides*

#### 4.3.1. Determinação da Concentração Ótima da Enzima Auto-Imobilizada

Como a invertase apresenta-se auto-imobilizada no fungo, foi necessário determinar a concentração de massa fúngica que otimiza o processo de hidrólise. Sendo

assim, o objetivo deste experimento foi verificar em qual faixa de concentração de enzima se obtém a velocidade máxima de reação, através da análise de uma curva de velocidade de reação ( $\text{g ART L}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) em função da concentração de enzima ( $\text{gL}^{-1}$ ).

Foram realizados ensaios de atividade enzimática com repetição, variando-se a concentração da massa fúngica em  $10 \text{ gL}^{-1}$ ,  $20 \text{ gL}^{-1}$ ,  $40 \text{ gL}^{-1}$ ,  $50 \text{ gL}^{-1}$ ,  $70 \text{ gL}^{-1}$ ,  $80 \text{ gL}^{-1}$ ,  $100 \text{ gL}^{-1}$ ,  $150 \text{ gL}^{-1}$ ,  $250 \text{ gL}^{-1}$  e  $500 \text{ gL}^{-1}$ , para uma mesma concentração de substrato. Para isto as células úmidas foram pesadas e incubadas em frascos de Erlenmeyer de 50mL contendo 20mL de solução de sacarose  $50 \text{ gL}^{-1}$ , preparada em tampão de acetato de sódio 0,1M e pH=5. Os frascos foram colocados em banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  sob agitação de 170 rpm e a cada 15 minutos foram retiradas alíquotas de 0,2mL do sobrenadante, durante 3 horas. Após diluição adequada, foi avaliada a quantidade de açúcares redutores pelo método do DNS. Em todas as incubações, a velocidade inicial de hidrólise foi determinada a partir de uma curva construída relacionando a concentração de açúcar redutor liberado ( $\text{gL}^{-1}$ ) e o tempo (min).

#### 4.3.2. *Determinação das Condições Ótimas de Hidrólise através de Planejamento Experimental*

O bioprocesso de produção de açúcar invertido, assim como qualquer processo biotecnológico, é muito complexo devido ao grande número de variáveis envolvidas. Portanto, um meio de cultura balanceado, juntamente com valores ótimos de temperatura, pH, agitação e aeração são necessários para se alcançar uma boa produtividade (BAILEY & OLLIS, 1986).

Um recurso utilizado em estudos que envolvem diferentes variáveis é a técnica de planejamento fatorial, que permite correlacionar as variáveis independentes com as dependentes através de um número mínimo de ensaios. A metodologia do planejamento fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, fornecendo informações confiáveis do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX *et. al.*, 1978). Através dessa técnica de planejamento de experimentos é possível avaliar a influência das variáveis independentes nas variáveis de respostas, bem como as interações entre elas. A partir da análise da variância, pode-se obter um modelo probabilístico adequado que correlacione as respostas em função das variáveis independentes, o que permite determinar os valores destas, otimizando o desempenho do bioprocesso (RODRIGUES *et al.*, 1998).

Desta forma, este experimento teve como objetivo empregar a metodologia do planejamento fatorial de experimentos de modo a determinar as condições ótimas para a hidrólise enzimática da sacarose, utilizando-se a enzima invertase auto-imobilizada na massa celular do fungo *Cladosporium cladosporioides*.

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em sistema descontínuo, com e sem agitação, utilizando-se como substrato soluções de sacarose (concentração de 50 gL<sup>-1</sup>) preparadas em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4 e pH 6. Para os testes, 3g de células, na forma de *pellets*, foram incubados em frascos de Erlenmeyer de 50mL, contendo 30mL das soluções de sacarose e submetidos aos ensaios do planejamento fatorial, por 180 minutos.

Para a otimização do processo de hidrólise da sacarose foi utilizado um planejamento fatorial com três variáveis em dois níveis (2<sup>3</sup>), totalizando 8 ensaios, em duplicata, realizados de forma aleatória. As variáveis estudadas foram a temperatura, o pH e a agitação, cujos níveis estão apresentados na Tabela 4.1. De acordo com esta tabela, para o nível inferior foram admitidas as seguintes condições: temperatura de 50°C, pH 4 e sem agitação; e para o nível superior: temperatura de 70°C, pH 6 e agitação de 170 rpm.

Tabela 4.1 - Variáveis e níveis estudados no Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup> aplicado à hidrólise enzimática da sacarose.

Variáveis	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
<b>Agitação (A), rpm</b>	0	170
<b>pH</b>	4	6
<b>Temperatura (T), °C</b>	50	70

Os experimentos foram monitorados através da porcentagem de hidrólise, calculada por meio da Equação 4.1, onde [ART] é a concentração de Açúcares Redutores Totais (glucose + frutose) e S<sub>0</sub> é a concentração inicial de sacarose, ambas em gL<sup>-1</sup>.

$$\% \text{ de Hidrólise} = \frac{[\text{ART}]}{S_0} \times 100 \quad (4.1)$$

A dosagem dos açúcares redutores (glicose e frutose) foi realizada pelo método do DNS.

#### 4.3.3. *Determinação do Consumo Preferencial de Carboidratos pelo Fungo*

Uma vez que o *Cladosporium cladosporioides* consome em seu metabolismo preferencialmente a glicose (ANDRADE, 1991), e como a hidrólise da sacarose produz uma mistura equimolar de glicose e frutose, foi interessante avaliar os percentuais de glicose e de frutose absorvidos pelo fungo quando este era incubado em diferentes concentrações destes substratos. Sendo assim, foram pesadas amostras de 2g de massa celular úmida, que foram incubadas em frascos de Erlenmeyer contendo 20 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M e pH 5,0, contendo concentrações variáveis de glicose ( $20\text{gL}^{-1}$  a  $600\text{gL}^{-1}$ ) e de frutose ( $20\text{gL}^{-1}$  a  $600\text{gL}^{-1}$ ). Os frascos de Erlenmeyer foram colocados em banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  sob agitação moderada e a cada 15 minutos foram retiradas alíquotas de 0,2mL do sobrenadante, durante 3 horas. A dosagem da glicose residual foi feita pelo método enzimático da glicose oxidase, através do *Kit* Bioclin GOD-KLIN, enquanto que a frutose residual foi dosada pelo método do DNS (ANDRADE, 1991).

#### 4.4. **Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose**

A cinética da invertase foi pesquisada pelo método das velocidades iniciais, de acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten.

O objetivo dos experimentos foi estimar os parâmetros cinéticos:  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{m\acute{a}x}$  (velocidade máxima de reação), para o sistema enzimático em estudo, bem como quantificar a influência exercida pela concentração do substrato e pelos efeitos difusivos impostos pela estrutura celular do fungo e pelas condições hidrodinâmicas.

Assim, a enzima invertase foi utilizada de duas formas: na forma auto-imobilizada em células intactas de *Cladosporium cladosporioides*, insolúvel; e na forma comercial Sigma ® (Grade V: Practical, I-9253), solúvel.

As concentrações de invertase escolhidas para o estudo da cinética encontravam-se no trecho linear da variação da velocidade de reação com a concentração de enzima

(substrato saturante). Em estudos prévios, com as suspensões de *Cladosporium cladosporioides*, ficou definido que a melhor concentração de trabalho para o estudo da cinética era de  $100 \text{ gL}^{-1}$ . Para a invertase solúvel, a concentração de enzima foi definida em  $0,7 \text{ gL}^{-1}$ , por estar no trecho linear de velocidade de reação (velocidades máximas).

Os testes cinéticos foram realizados em sistema descontínuo, sob as condições ótimas obtidas no planejamento fatorial realizado. Para isso, a enzima auto-imobilizada e a enzima solúvel foram incubadas em diferentes concentrações de sacarose ( $20 \text{ gL}^{-1}$ ,  $40 \text{ gL}^{-1}$ ,  $60 \text{ gL}^{-1}$ ,  $80 \text{ gL}^{-1}$ ,  $100 \text{ gL}^{-1}$ ,  $200 \text{ gL}^{-1}$ ,  $300 \text{ gL}^{-1}$ ,  $400 \text{ gL}^{-1}$ ,  $500 \text{ gL}^{-1}$  e  $600 \text{ gL}^{-1}$ ) durante 3 (três) horas. A cada 20 minutos foram coletadas amostras para a dosagem de ART pelo método do DNS. A velocidade da reação para cada experimento foi, então, calculada utilizando-se a Equação 4.2, na qual  $V$  é a velocidade da reação, em  $\text{gL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $[\text{ART}]$  é a concentração de açúcares redutores formada durante a hidrólise da sacarose, em  $\text{gL}^{-1}$  e  $t$  é o tempo de reação, em minutos.

$$V = \frac{[\text{ART}]}{t} \quad (4.2)$$

Plota-se, então, a curva velocidade específica média ( $\text{g g}_{\text{cat}}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) em função da concentração de substrato ( $\text{gL}^{-1}$ ) e, através da linearização desta curva, obtém-se os parâmetros cinéticos procurados ( $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$ ).

#### 4.5. Hidrólise da Sacarose em Sistema Descontínuo

Os testes em sistema descontínuo foram realizados em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de solução de sacarose  $100 \text{ gL}^{-1}$ , preparada em tampão acetato de sódio 0,1M e pH 5, onde foram incubadas 10 g de células na forma de *pellets*. Estes frascos de Erlenmeyer foram, então, levados a um banho-maria ( $60^\circ\text{C}$ ), sob agitação contínua de 170 rpm, onde permaneceram durante 6 horas. A intervalos de 20 minutos foram retiradas alíquotas de 0,5 mL para a dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS.

Para a análise do processo descontínuo, foi construída uma curva concentração de sacarose ( $\text{gL}^{-1}$ ) em função do tempo de reação (min).

## 4.6. Hidrólise da Sacarose em Sistema Contínuo

Os testes em sistema contínuo foram realizados em um biorreator tipo torre, que consiste de uma coluna de vidro com 39,0 cm de altura e 1,7 cm de diâmetro interno, circundada por uma jaqueta com 4,0 cm de diâmetro externo por onde circula água aquecida para manter o reator na temperatura adequada (Figura 4.1). Para manter o reator a 60°C, esta temperatura foi controlada por um termopar ligado a um controlador de temperatura.

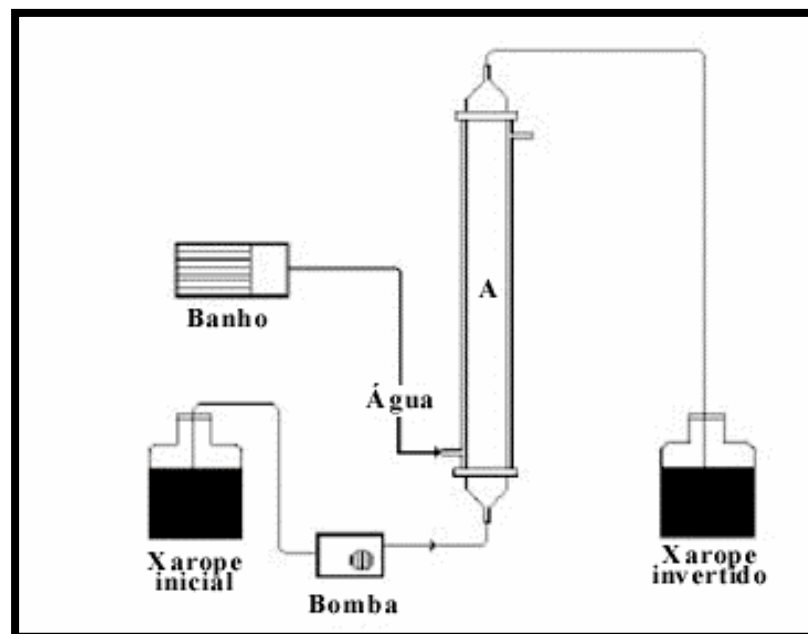


Figura 4.1 – Esquema do sistema contínuo para a produção de açúcar invertido

### 4.6.1. Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fluidizado

Inicialmente foram realizados testes de fluidodinâmica para obtenção das condições de operação do sistema, ou seja, condição mínima de fluidização. Esses testes foram desenvolvidos com os *pellets* (biocatalisador) e solução de sacarose 100 gL<sup>-1</sup>, preparada com tampão de acetato de sódio 0,1M e pH 5. O leito, constituído de partículas do biocatalisador (*pellets*) e com altura inicial de 20 cm, foi suportado sobre uma tela metálica perfurada. Para efetuar os testes, encheu-se o tanque de alimentação com a solução de sacarose e ligou-se a bomba peristáltica. Após a coluna estar



completamente cheia, a bomba foi desligada e ligada algumas vezes para obtenção de uma distribuição homogênea das partículas do leite.

Os ensaios consistiram na medição de vazão na saída do sistema e da altura do leite observada. Com este conjunto de dados foi construída a curva de altura do leite em função da vazão para determinar o ponto de mínima fluidização.

Após os testes fluidodinâmicos, foram desenvolvidos os ensaios de hidrólise em leite fluidizado. O leite foi suspenso pelas forças de arraste exercidas pela solução de sacarose (substrato) que foi bombeada de modo ascendente, utilizando-se uma bomba peristáltica.

Foram realizados experimentos nos quais foi variada a vazão de alimentação. Para cada experimento, foram retiradas amostras do efluente, em intervalos de 5 minutos para dosagem de açúcares redutores totais e sacarose, até alcançar o estado estacionário.

Com os dados obtidos e pela análise do percentual de hidrólise, foram determinadas as condições ótimas de funcionamento do sistema.

#### 4.6.2. *Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fixo*

Os testes com biorreator de leite fixo foram realizados utilizando-se o mesmo sistema descrito na seção anterior e apresentado na Figura 4.1. A coluna foi carregada com os *pellets* do biocatalisador e a solução de sacarose foi bombeada de modo ascendente, usando-se uma bomba peristáltica. Perdas de carga reduzidas foram adotadas tendo em vista evitar a compactação do leito de biomassa.

Foram realizados experimentos nos quais foram variadas a concentração de substrato e a vazão de alimentação. Para cada experimento, foram retiradas amostras do efluente em intervalos de 5 minutos, durante 3 horas, para dosagem de açúcares redutores totais pelo método do DNS, até alcançar o estado estacionário.

Para a avaliação do processo contínuo foram construídas curvas de concentração de substrato ( $\text{gL}^{-1}$ ) em função do tempo de reação (min) para cada vazão de alimentação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e suas discussões para os estudos descritos no capítulo 4.

### 5.1. Cultivo do *Cladosporium cladosporioides*

O cultivo do fungo *Cladosporium cladosporioides* em meio BDA a 30°C, durante 10 dias, forneceu colônias características de coloração verde musgo, com diâmetro aproximado de 5cm (Figura 5.1). Esta figura apresenta ainda a estrutura microscópica deste fungo.

A agitação aplicada durante a fase de crescimento em meio Czapeck, durante 20 dias, permitiu a formação de micélios em forma de novelos (*pellets*), que podem ser vistos na Figura 5.2. Tais *pellets* foram utilizados como suportes da enzima invertase, a qual atua como biocatalisador no processo de hidrólise.

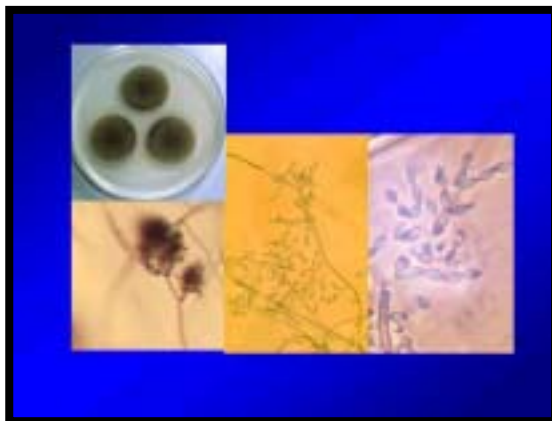


Figura 5.1 – *Cladosporium cladosporioides* em sua forma fungiforme



Figura 5.2 – *Cladosporium cladosporioides* em sua forma *pelletizada*

#### 5.1.1. Curva de Crescimento do *Cladosporium Cladosporioides*

A biomassa do fungo produzida a cada 24 horas de crescimento foi recuperada do meio de cultura por filtração, lavada, seca e pesada. O estudo do crescimento celular consistiu em seguir, a evolução da concentração em biomassa fúngica (g de massa seca / unidade de volume de meio de cultura) em função do tempo (t). A curva apresentada na Figura 5.3 apresenta as várias etapas do crescimento do *Cladosporium cladosporioides*.

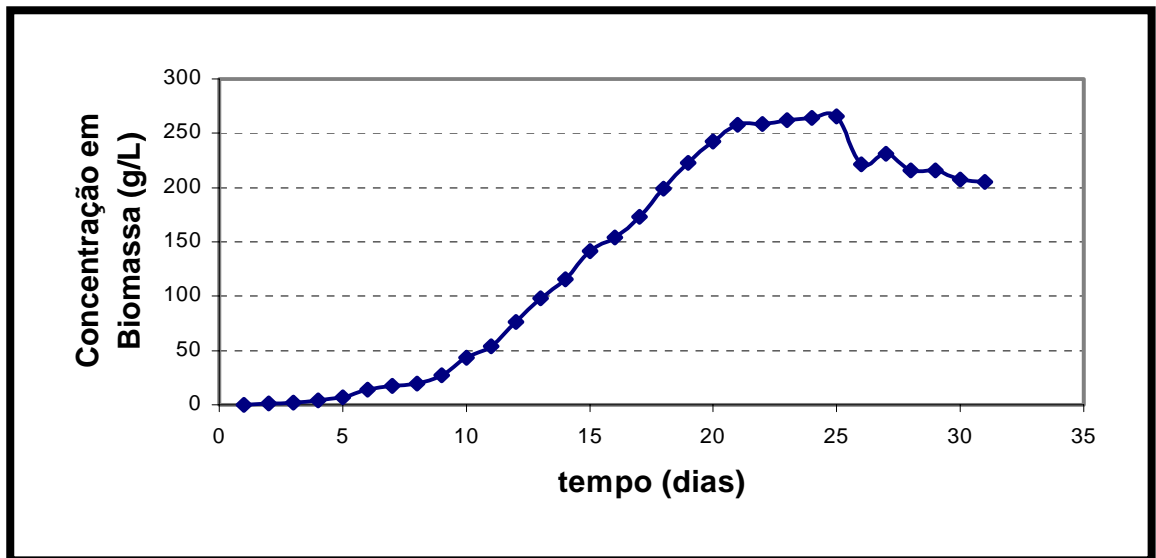


Figura 5.3 – Curva de crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*

No gráfico da Figura 5.3 observa-se que até o 5<sup>o</sup> dia a velocidade de crescimento celular é praticamente nula. Esta fase é conhecida como fase de latência, tratando-se de um período de adaptação, em cujo decorrer a célula sintetiza, particularmente, as enzimas que lhe são necessárias para metabolizar o substrato presente. Do 5<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia, verifica-se que o ambiente dinâmico onde se processa o catabolismo heterotrófico vai gradativamente favorecendo o aumento da concentração celular, é a chamada fase inicial de crescimento. A partir do 10<sup>o</sup> dia, a velocidade de crescimento celular aumenta, até atingir seu máximo em, aproximadamente, 20 dias de cultivo, é a fase logarítmica ou exponencial de crescimento. Após o 20<sup>o</sup> dia de cultivo, o crescimento passa por uma fase estacionária. Nesta fase as células conservam uma atividade metabólica, e a parada de crescimento acarreta modificações da estrutura bioquímica da célula, dando início à fase de declínio, quando o número de células viáveis diminui e, paralelamente, a concentração em biomassa decresce, devido à autólise sob a ação das enzimas da própria célula (SCRIBAN, 1985).

As células utilizadas como biocatalisadores no processo de hidrólise enzimática foram aquelas obtidas após 20 dias de crescimento, uma vez que, este tempo corresponde ao potencial de síntese e atividade bioquímica máximos das células, justificando seu emprego neste processo biotecnológico.

### 5.1.2. Determinação do Diâmetro Médio dos Pellets

O diâmetro médio dos pellets que constituem a biomassa de *Cladosporium cladosporioides* foi calculado a partir das medidas de diâmetros obtidas pelo método de Feret. O valor médio encontrado para o diâmetro dos pellets foi de  $0,1327 \pm 0,0007$ cm.

A Figura 5.4 mostra a distribuição de tamanho de partículas obtidas após o cultivo em função do número de medidas. Observa-se que o tamanho das partículas apresentou distribuição aleatória, concentrando-se em torno da média, com desvio padrão da ordem de  $10^{-4}$  obtido com 95% de confiança, para as medidas observadas.

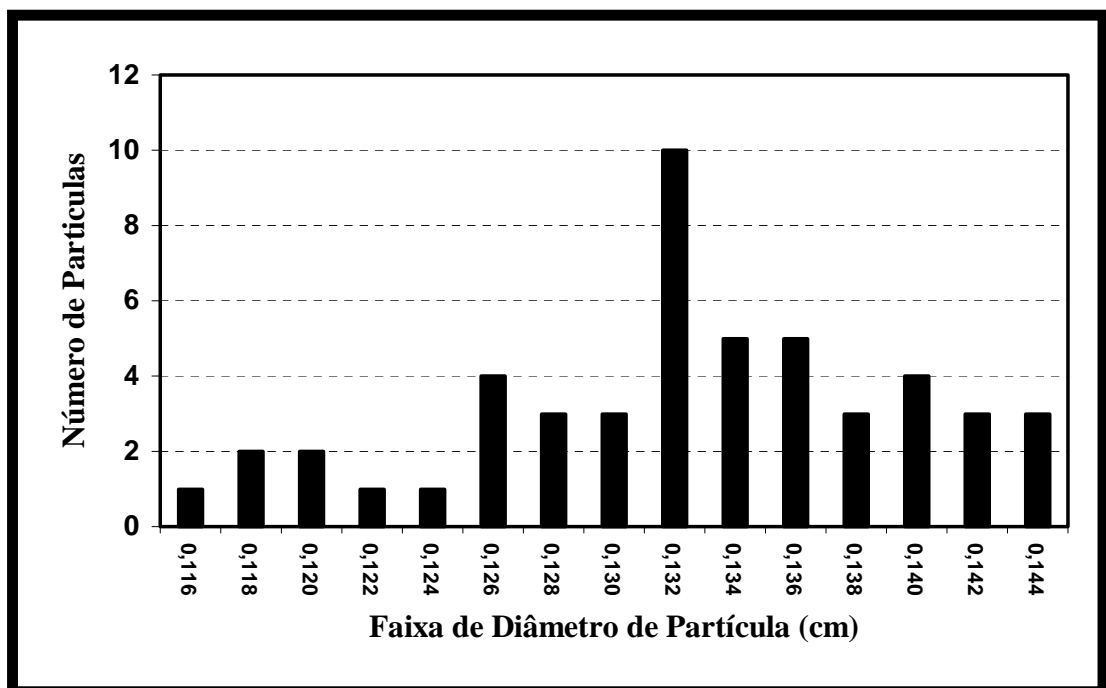


Figura 5.4 - Distribuição de tamanho dos *pellets* que constituem a biomassa do fungo *Cladosporium cladosporioides*

### 5.1.3. Caracterização Textural dos Pellets

Os resultados obtidos para a caracterização dos *pellets* através dos métodos descritos no item 4.1.6 estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Características dos *pellets* de *Cladosporium cladosporioides*

Característica	Valor
Diâmetro médio (cm)	0,1327±0,0007
Porosidade	0,37
Massa Específica (g cm <sup>-3</sup> )	1,016

Pela análise da Tabela 5.1, verifica-se que se trata de um material com baixa porosidade, característica dos materiais utilizados para catálise.

## 5.2. Caracterização da Invertase Auto-Imobilizada no Fungo *Cladosporium cladosporioides*

### 5.2.1. Velocidade de Reação da Invertase Auto-Imobilizada em Função da Concentração de Enzima

Este experimento teve o objetivo de determinar a concentração de enzima auto-imobilizada que otimiza o processo de hidrólise, e que foi utilizada para a realização do estudo cinético em uma etapa posterior.

A Figura 5.5 apresenta a curva de velocidade de reação em função da concentração de enzima. Nesta curva, o trecho linear representa uma cinética de primeira ordem ( $V = k_{cat} \cdot [E_T]$ ), em que  $V$  é a velocidade de reação,  $k_{cat}$  é a constante catalítica ou número de *turnover* e  $[E_T]$  é a concentração de enzima total presente). Neste trecho linear a enzima apresenta velocidade máxima e concentração saturante de substrato (GARRET & GRISHAM, 1995).

Observa-se com a Figura 5.5 que o trecho linear de velocidade de reação vai apenas até 100 gL<sup>-1</sup> de invertase auto-imobilizada, com coeficiente de correlação da regressão linear ( $R^2$ ) de 0,994. Abaixo de 20 gL<sup>-1</sup> a precisão é baixa, devido à baixa concentração de açúcares redutores formados e, por isso, os valores oscilam consideravelmente. A faixa ideal de concentração para trabalho é de 40 gL<sup>-1</sup> a 100 gL<sup>-1</sup> de invertase auto-imobilizada. Em função disso, a concentração utilizada para os ensaios de cinética enzimática foi de 100 gL<sup>-1</sup>.

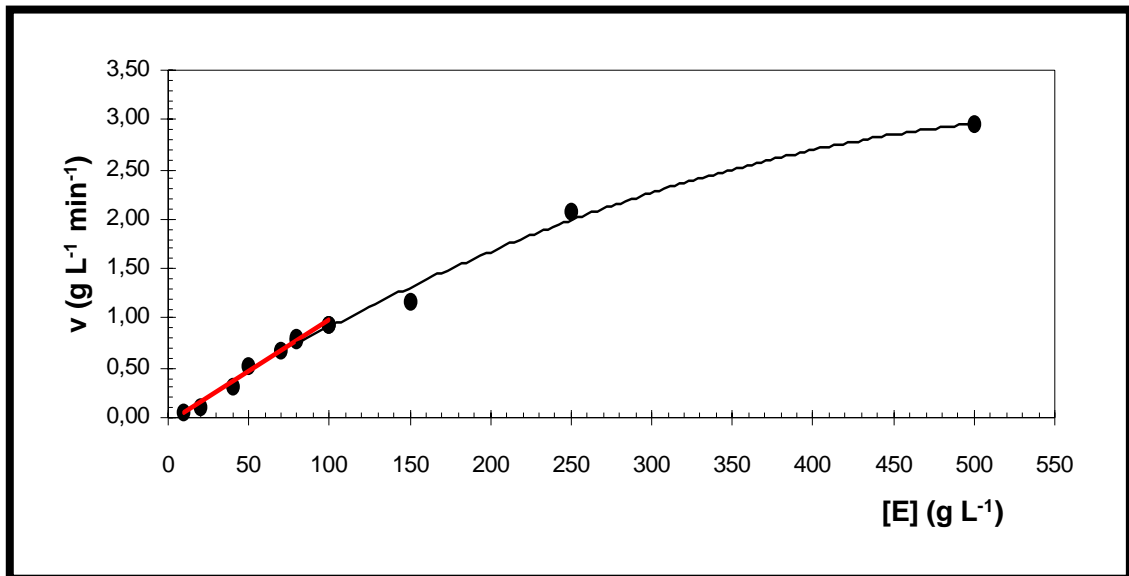


Figura 5.5 – Velocidade de reação da invertase auto-imobilizada em função da concentração de enzimas (correlação do trecho linear  $R^2 = 0,994$ )

### 5.2.2. *Determinação das Condições Ótimas de Hidrólise através de Planejamento Experimental*

A Tabela 5.2 apresenta as condições dos ensaios de hidrólise para o planejamento fatorial  $2^3$ , bem como os resultados obtidos em termos da porcentagem de hidrólise. De acordo com essa tabela, para a realização do ensaio 1, por exemplo, utilizou-se as variáveis do processo (agitação, pH e temperatura) em seus níveis inferiores (ver Tabela 4.1), obtendo-se, nestas condições, um percentual médio de hidrólise de 35,16. Da mesma forma, no ensaio 8, quando foram utilizados os níveis superiores das variáveis, obteve-se 94,17% de hidrólise.

Tabela 5.2 – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  e resultados em termos da porcentagem de hidrólise

Ensaio	A	pH	T	Hidrólise (%)		Média %
1	-	-	-	33,52	36,80	35,16
2	+	-	-	43,35	47,73	45,54
3	-	+	-	65,21	71,77	68,49
4	+	+	-	77,23	81,60	79,42
5	-	-	+	42,26	38,98	40,62
6	+	-	+	45,54	47,73	46,63
7	-	+	+	91,44	87,07	89,26
8	+	+	+	95,81	93,53	94,17

Os efeitos principais de cada variável do processo e aqueles resultantes da interação entre elas foram calculados utilizando-se o *software Statistic for Windows* versão 5.0. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.3.

De acordo com esta tabela, todas as variáveis são significativas e possuem efeitos positivos, ou seja, para as condições estudadas, os níveis superiores destas variáveis favorecem a hidrólise.

Tabela 5.3 – Efeitos calculados para o Planejamento Fatorial  $2^3$

Efeitos	Estimativa (%) $\pm$ erro padrão
<b>Média global</b>	62,41 $\pm$ 0,73*
<b>Efeitos principais</b>	
Agitação (A)	8,06 $\pm$ 1,46*
pH	40,84 $\pm$ 1,46*
Temperatura (T)	10,52 $\pm$ 1,46*
<b>Efeito de interação de dois fatores</b>	
Agitação x pH	- 0,14 $\pm$ 1,46
Agitação x Temperatura	- 2,59 $\pm$ 1,46
pH x Temperatura	7,24 $\pm$ 1,46*
<b>Efeito de interação de três fatores</b>	
Agitação x pH x Temperatura	- 0,41 $\pm$ 1,46

\*Valores significativos (95% de confiança)

Pela análise dos efeitos, apresentados na Tabela 5.3, nota-se que aumentando-se o pH de 4 para 6, ocorre um aumento médio de 40,84% no percentual de hidrólise. Isto sugere que as enzimas microbiológicas são mais ativas no intervalo de pH que viabiliza a célula e, no caso da invertase auto-imobilizada em células de *Cladosporium cladosporioides*, a atividade máxima ocorre com pH em torno de 6, como pode ser observado no gráfico da Figura 5.6, onde se analisa o percentual de hidrólise em função do pH e da agitação.

Da mesma forma, quando a temperatura passa de 50°C para 70°C, há um aumento médio do percentual de hidrólise de 10,52%. No entanto, aumentando-se a temperatura acima deste valor, observa-se um decréscimo na atividade, o qual está associado à redução da estabilidade da enzima devida à desnaturação proteica. De acordo com a superfície de resposta da Figura 5.7, nota-se que a temperatura ótima de hidrólise é de 60°C.

Quanto à agitação, observa-se que o sistema agitado aumenta a atividade em cerca de 8%, uma vez que ocorre um aumento na superfície de contato líquido-sólido, o que reduz as resistências à transferência de massa. No entanto, a agitação durante a reação de hidrólise apresenta menos influência que as demais variáveis estudadas.

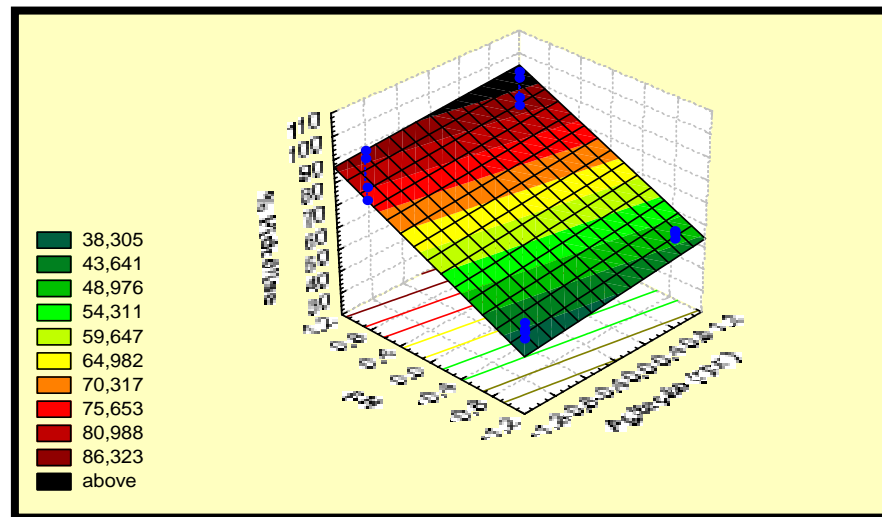


Figura 5.6 - Perfil da porcentagem de hidrólise em função do pH e da Agitação

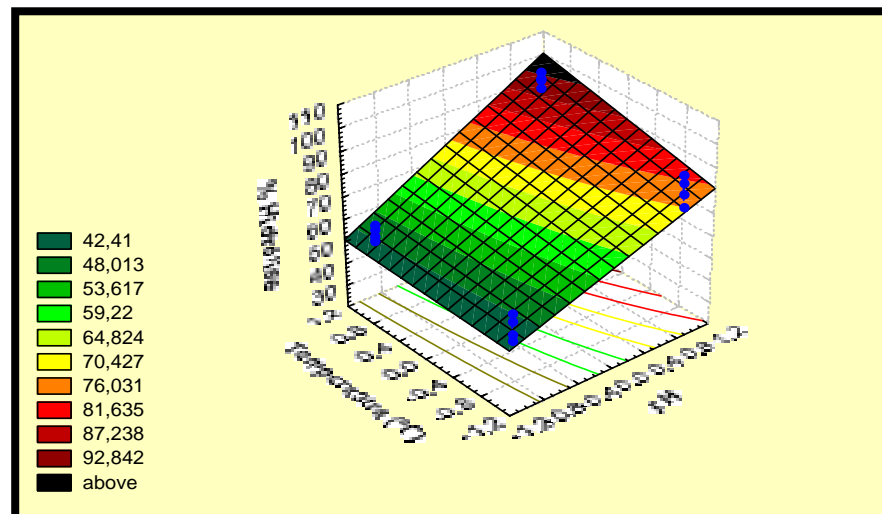


Figura 5.7 - Perfil da porcentagem de hidrólise em função do pH e da Temperatura

Para a invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi determinado o pH ótimo no intervalo de 3,5 a 6,0, dependendo da concentração de substrato e dos tampões utilizados (SIMIONESCU *et. al.*, 1987; WISEMAN & WOODWARD, 1975), já para a



invertase do fungo *Aspergillus niger*, em pH 4,7, a temperatura ótima encontrada foi 55°C (MONSAN & COMBRES, 1984). Estes resultados demonstram que o pH ótimo para a invertase depende do tipo de enzima, porque a mesma enzima produzida por diferentes microrganismos, normalmente, possui diferentes composições de aminoácidos, o que afeta o estado de ionização em solução. A temperatura ótima é também função do tipo de enzima e das condições experimentais, tendo sido reportados valores no intervalo de 45°C a 73°C (BERGAMASCO *et al.*, 2000; WISEMAN & WOODWARD, 1975).

### 5.2.3. Determinação do Consumo Preferencial de Carboidratos pelo Fungo

A massa celular do fungo *Cladosporium cladosporioides*, incubada em concentrações variáveis de glicose durante 3 horas, mostrou um consumo deste substrato em relação ao aumento da concentração inicial do açúcar (Figura 5.8)

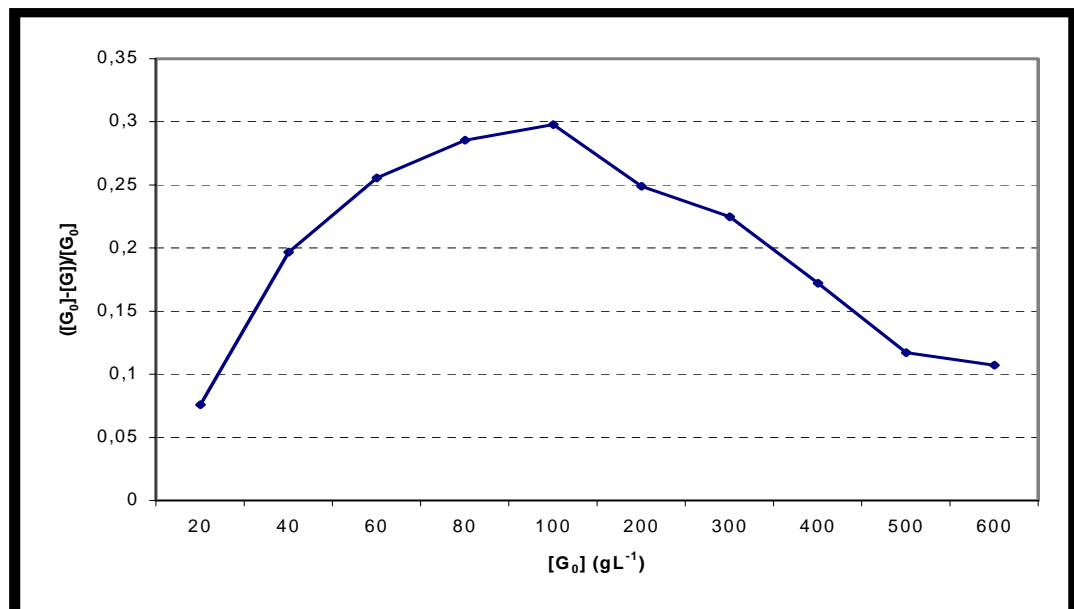


Figura 5.8– Evolução do consumo de glicose em presença do fungo *Cladosporium cladosporioides* em temperatura de 60°C e pH 5,0

Analisando-se a Figura 5.8, verifica-se que à proporção que a concentração inicial de açúcar aumenta, diminui significativamente a percentagem de açúcar

consumido. Tal procedimento adequa-se à cinética microbiana de MONOD (1949), para baixas concentrações de substrato (Equação 5.1).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \text{ e } \mu = \frac{\mu_{\max} * S}{K_S + S} \quad (5.1)$$

nesta equação,  $dX/dt$  é a velocidade de crescimento ( $g L^{-1} h^{-1}$ ),  $\mu$  é a taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ ),  $X$  é a concentração de células ( $g L^{-1}$ ),  $\mu_{\max}$  é a taxa específica de crescimento máximo ( $h^{-1}$ ),  $K_S$  é a concentração de substrato pela qual a taxa específica de crescimento chega à metade de seu valor máximo ( $g L^{-1}$ ), e  $S$  é a concentração de substrato ( $g L^{-1}$ ).

Neste caso, a velocidade de crescimento aumenta, com o aumento da concentração do substrato. No entanto, a medida que a concentração de glicose no meio aumenta, há uma inibição do crescimento celular. Assim, observa-se que a partir de  $100g L^{-1}$  ocorre uma forte inibição pelo substrato, o que, já em 1968, era preconizado pelo modelo de Andrews:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * [S]}{K_S + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (5.2)$$

no qual  $K_I$  é a constante inibitória por excesso de substrato (SCRIBAN, 1985)

Na Figura 5.8 mostra-se a quantidade de glicose consumido em função da quantidade de glicose na solução inicial. Observa-se que até a concentração de  $60g L^{-1}$  o consumo de glicose foi elevado. Nas concentrações de  $80g L^{-1}$  a  $100g L^{-1}$ , o consumo permaneceu praticamente constante, porém considerado pequeno em relação à concentração inicial. A partir de  $100g L^{-1}$ , observa-se uma queda no consumo do substrato, indicativo de que ocorreu uma inibição pela presença em excesso do mesmo, ou seja, à medida que se aumenta a concentração deste substrato, o consumo do mesmo diminui.

No caso da frutose, como pode ser observado na Figura 5.9, o mecanismo é basicamente o mesmo da glicose, porém, neste caso, o consumo de açúcar é insignificante para qualquer concentração utilizada.

Diante do exposto, pode-se concluir que, durante o processo de hidrólise, o consumo dos açúcares redutores (glicose e frutose) formados pode ser desconsiderado

para efeito de cálculo de rendimento, uma vez que este consumo é insignificante, principalmente quando estes açúcares estão presentes em elevadas concentrações.

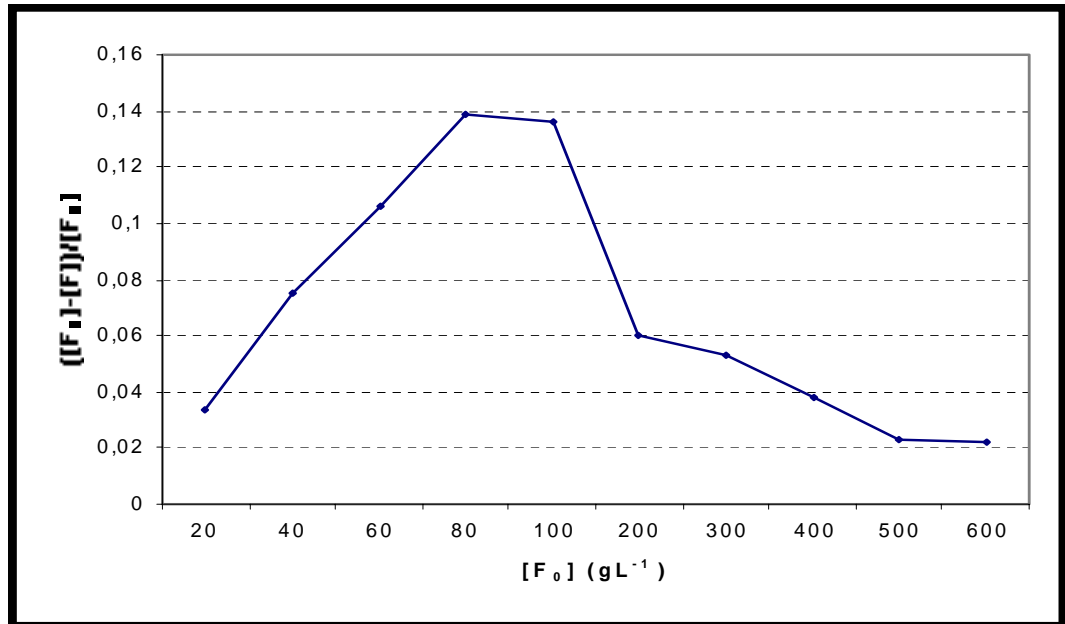


Figura 5.9– Evolução do consumo de frutose em presença do fungo *Cladosporium cladosporioides* em temperatura de 60°C e pH 5,0

O estudo desenvolvido por Andrade (1991) indicou que o *Cladosporium cladosporioides* consumia preferencialmente a glicose quando cultivado em sacarose, extratos de alcachofra de Jerusalém e misturas de glicose e frutose, o que gerava um acúmulo de frutose de 62% a 95% da disponibilidade atual. No entanto, estes cultivos foram realizados em baixas concentrações destas fontes de carbono (10gL<sup>-1</sup>), indicando que, naquele estudo os efeitos inibitórios não estavam presentes.

### 5.3. Estudo Cinético da Hidrólise da Sacarose

O efeito da concentração de sacarose sobre a atividade hidrolítica da invertase auto-imobilizada em células de *Cladosporium cladosporioides* foi avaliada. A Figura 5.10 apresenta a conversão obtida a cada hora, durante 3 horas de reação, para as diversas concentrações iniciais de sacarose (20gL<sup>-1</sup> – 600gL<sup>-1</sup>). Observa-se que a melhor conversão ocorre para concentrações de sacarose em torno de 50gL<sup>-1</sup>, aproximadamente 90% em 3 horas de reação. Observa-se também que as conversões permanecem elevadas (em torno de 70%), com concentrações de até 100gL<sup>-1</sup>. Aumentando-se a concentração de substrato a partir de 100gL<sup>-1</sup>, a conversão é drasticamente reduzida,

indicando que ocorre inibição enzimática pelo excesso de substrato. Esta inibição está, provavelmente, associada ao aumento da pressão osmótica exercida pela elevada concentração de açúcar no interior da célula.

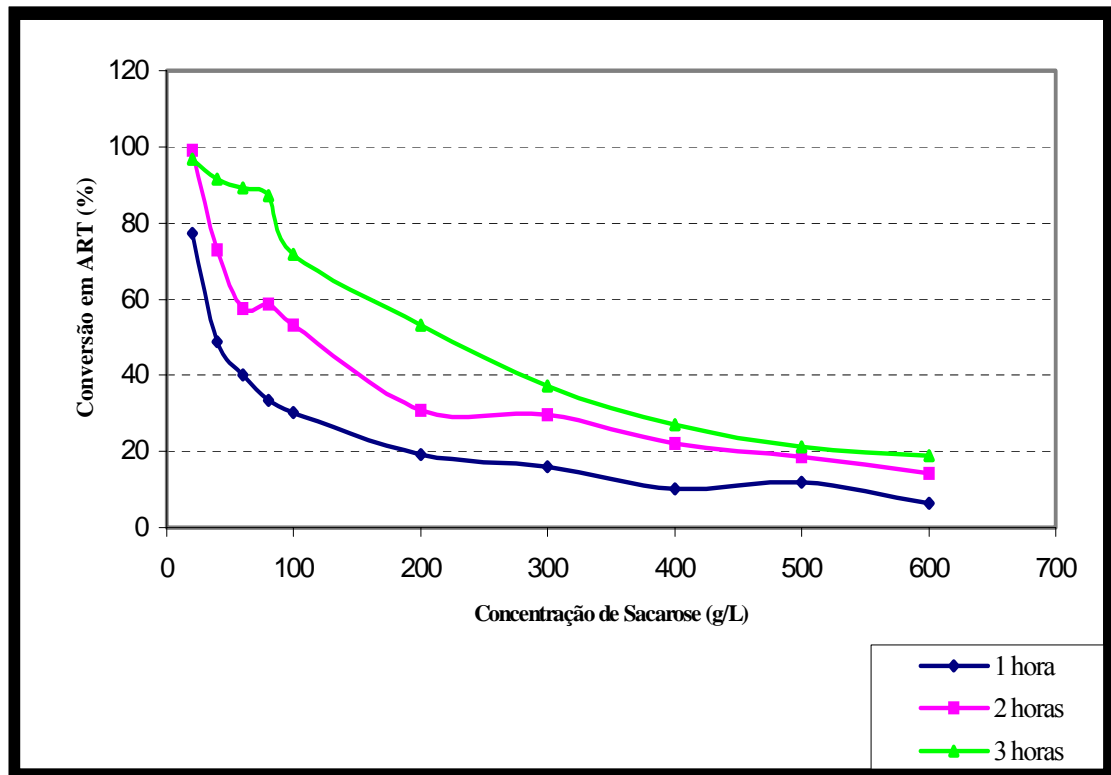


Figura 5.10 – Conversão de ART em função da concentração de sacarose, sob condições ótimas de hidrólise.

A evolução cinética do processo enzimático de hidrólise da sacarose utilizando-se a invertase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides* foi analisada e comparada com aquela obtida com a invertase na sua forma livre (solúvel).

Considerando uma lei cinética do tipo Michaelis-Menten (Equação 2.1) e aplicando-se um balanço de massa para o biorreator descontínuo, obtém-se:

$$-\frac{V_L}{m_{\text{cat}}} \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (5.3)$$

na qual  $V_L$  é o volume de solução de substrato (L) e  $m_{\text{cat}}$ , a massa de biocatalisador (g) utilizados.

Na forma linear a equação de Michaelis-Menten apresenta-se da seguinte forma:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (5.4)$$

nesta equação:  $V = -\frac{V_L}{m_{\text{cat}}} \frac{d[S]}{dt}$  e está expressa em  $\left(\frac{\text{g}_{\text{substrato}}}{\text{g}_{\text{cat}} \cdot \text{min}}\right)$ .

Os parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$ ) para ambos os processos foram estimados a partir da linearização das curvas de velocidade de reação em função da concentração de sacarose apresentadas nas Figuras 5.11 e 5.12.

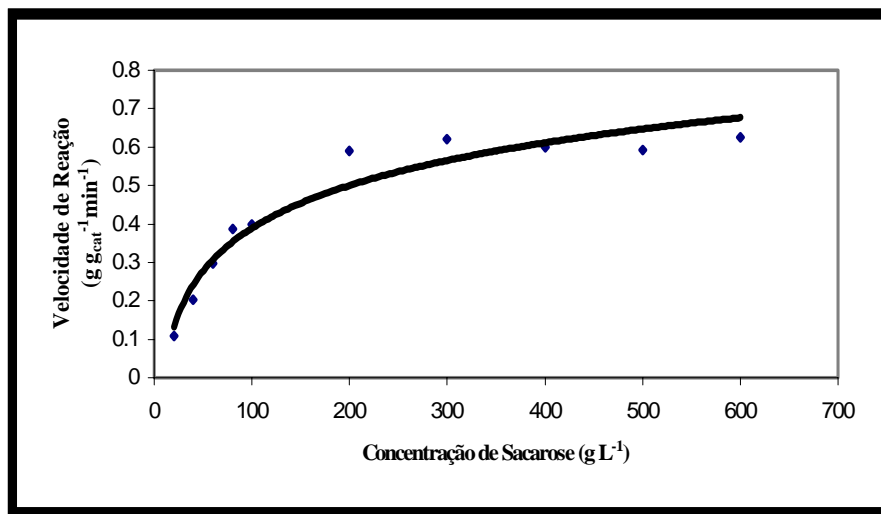


Figura 5.11– Cinética de Michaelis-Menten da invertase auto-imobilizada.

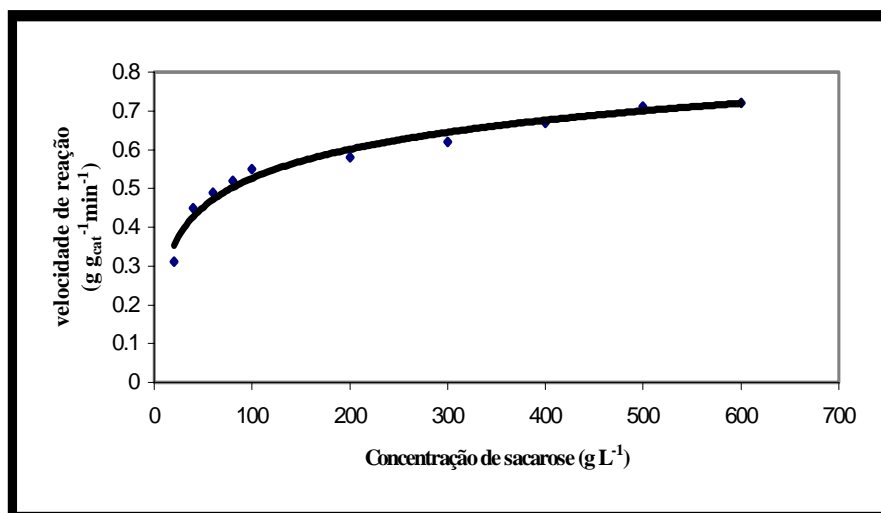


Figura 5.12 – Cinética de Michaelis-Menten da Invertase solúvel Sigma® Grau V

Pela análise das Figuras 5.11 e 5.12 observa-se que o desvio-padrão foi menor para a enzima solúvel, indicando que para processos que exijam maior controle é recomendado o uso da enzima solúvel, uma vez que esta garante maior confiabilidade na cinética da reação. A variabilidade das velocidades de reação no uso de células (invertase auto-imobilizada) está, provavelmente, relacionada com a heterogeneidade do meio de reação. Porém, o uso da invertase auto-imobilizada deve ser justificado pela redução considerável dos custos associados à extração e purificação da enzima, além do que, a imobilização da enzima no interior do próprio microrganismo, confere maior estabilidade à mesma, permitindo a sua reutilização em processos contínuos.

Os parâmetros cinéticos da reação enzimática foram calculados pela linearização de Lineweaver-Burk para o modelo cinético de Michaelis-Menten (Equação 5.4). A partir dos valores estimados pela regressão linear da curva  $1/V$  em função de  $1/S$ , apresentada nas Figuras 5.13 e 5.14, obteve-se para a enzima auto-imobilizada,  $K_M$  de  $145,63 \text{ g L}^{-1}$  e  $V_{M\acute{a}x}$  de  $0,915 \text{ min}^{-1}$ , e para a enzima livre,  $K_M$  foi de  $25,04 \text{ g L}^{-1}$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $0,70 \text{ min}^{-1}$ . O valor de  $K_M$  para a enzima auto-imobilizada é cerca de 5,8 vezes maior que o  $K_M$  da enzima livre. Esta mudança na afinidade da enzima pelo substrato é provavelmente causada pela menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima auto-imobilizada. No entanto, os valores de  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$  para a invertase livre e auto-imobilizada estão na mesma ordem de grandeza, indicando que a função catalítica desta enzima não é muito prejudicada por este método de imobilização.

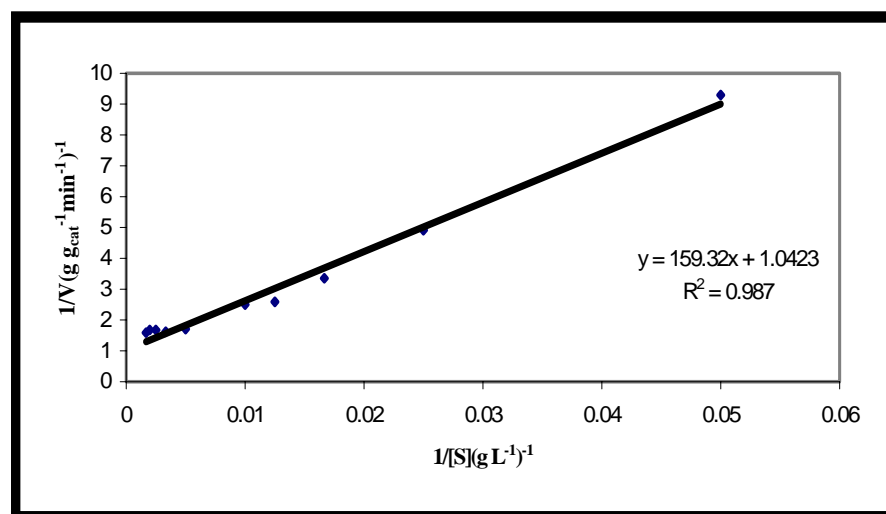


Figura 5.13 - Linearização de Lineweaver-Burk para a invertase auto-imobilizada

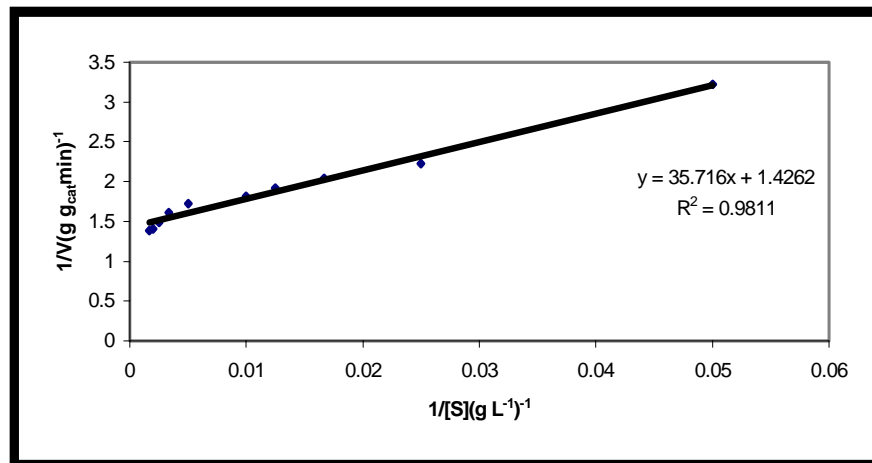


Figura 5.14 - Linearização de Lineweaver-Burk para a invertase solúvel

O valor de  $K_M$  encontrado para a enzima auto-imobilizada foi menor que aqueles encontrados na literatura para a invertase immobilizada em suportes artificiais:  $207,63 \text{ gL}^{-1}$  (D'SOUZA & MELO, 2001);  $181,33 \text{ gL}^{-1}$  (AKGÖL *et. al.*, 2001);  $155,73 \text{ gL}^{-1}$  (TANRISEVEN, A., 2001), indicando que a afinidade da enzima pelo substrato é menos afetada quando esta se encontra immobilizada no interior da própria célula.

#### 5.4. Hidrólise da Sacarose em Sistema Descontínuo

A Figura 5.15 apresenta a evolução cinética do consumo de sacarose durante o processo descontínuo de hidrólise enzimática. Nesta figura observa-se que, nas condições estudadas, obteve-se um rendimento em açúcares redutores de cerca de 80%, após 4 horas de reação, indicando que o biocatalisador auto-imobilizado possui uma elevada atividade, podendo ser utilizado de forma satisfatória para se conseguir xaropes concentrados de açúcar invertido.

RAIMUNDO (2003), utilizando o mesmo biocatalisador, nas mesmas condições de concentração de substrato, pH e temperatura, porém utilizando maiores diâmetros de partículas (0,255 cm) e sem agitação, obteve um rendimento de cerca de 60% em açúcares redutores, após 6 horas de reação. Tais resultados, quando comparados com aqueles obtidos neste trabalho, reforçam a importância de se tentar reduzir ao máximo os efeitos das resistências internas e externas de transferência de massa nos processos catalíticos, sejam estes enzimáticos ou não.

Analisando ainda a Figura 5.15, observa-se que a partir da 4ª hora de reação, os níveis de concentração no meio reacional se mantêm praticamente constantes, o que pode estar sendo ocasionado por uma inibição pelos produtos formados, uma vez que, nesta fase do processo, estes estão presentes em elevadas concentrações.

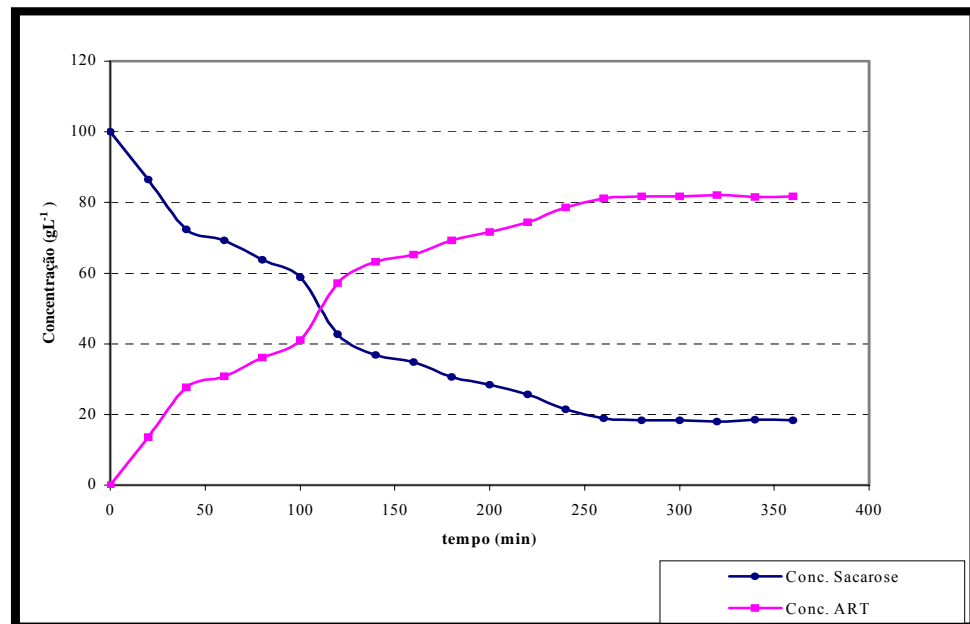


Figura 5.15 – Perfil de concentração de substrato e produto em função do tempo

#### 5.4.1. Modelagem Cinética do Processo Descontínuo

A evolução cinética do processo descontínuo de hidrólise enzimática da sacarose, estando a enzima auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides*, foi avaliada considerando-se os parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{max}$ ), obtidos anteriormente, porém, aplicando-se um modelo cinético que considera os efeitos de transferência de massa.

A aplicação de um balanço de massa em um biorreator descontínuo heterogêneo forneceu a seguinte proposta de modelo cinético segundo Michaelis-Menten:

$$\ln \frac{[S_0]}{[S]} = \frac{1}{MV_{max}} ([S] - [S_0]) + \frac{m_{cat}}{MV_L} t \quad (2.18)$$

$$\text{na qual, } M = \left( \frac{1}{a_{LS}k_{LS}} + \frac{K_M}{V_{max}} \right) \quad (2.12)$$



Observa-se, na Equação 2.18, que o coeficiente de transferência de massa externa,  $k_{LS}$ , aparece expressando efeitos de transferência de massa na camada externa de fluido que circunda o biocatalisador, que podem estar controlando a velocidade da reação. Torna-se fundamental, portanto, avaliar a ordem de grandeza que confirme a limitação imposta pela etapa controladora.

Tendo-se quantificado os parâmetros cinéticos da reação catalisada, foi possível determinar a ordem de grandeza de  $k_{LS}$  pelo ajuste linear dos dados experimentais obtidos na operação do processo descontínuo de hidrólise (Figura 5.16).

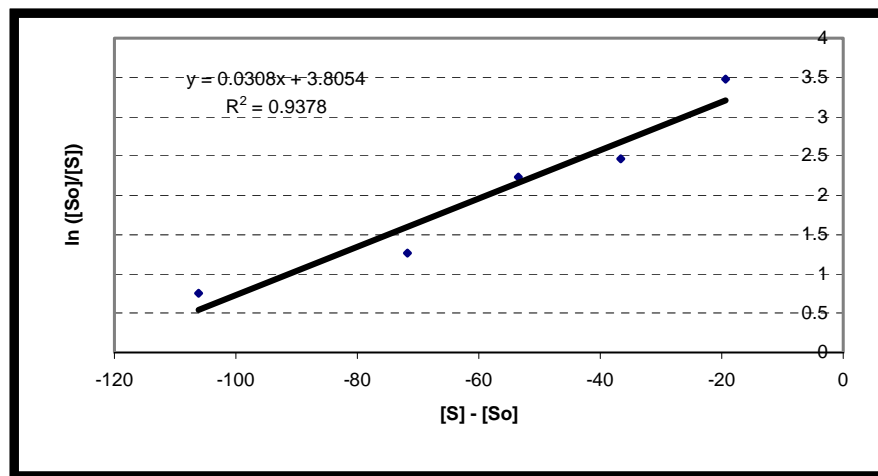


Figura 5.16 – Ajuste linear dos resultados experimentais do processo descontínuo de hidrólise enzimática.

A partir do ajuste linear dos valores experimentais e comparando-se com a Equação 2.18, é obtido o valor de  $M$ , assim calculado:

$$\frac{m_{\text{cat}}}{MV_L} t = 3,8054 \quad \Rightarrow \quad M = 4,730 \text{ min}$$

Substituindo o valor de  $M$  na Equação 2.12 e lembrando que  $a_{LS} = 6\omega/(\rho_{\text{Sol}} \cdot d_p)$  (Equação 2.14), pode-se determinar o valor de  $k_{LS}$ . Na Tabela 5.4 estão apresentados os resultados obtidos.

O valor encontrado para  $k_{LS}$  indica que os efeitos de transferência de massa externa devem ser considerados no modelo cinético, uma vez que o termo  $1/(a_{LS} k_{LS})$  não é desprezível na expressão de  $M$ . As condições hidrodinâmicas do processo podem ter favorecido a formação de um perfil de velocidade do seio do fluido até a superfície externa do *pellet*, e, conseqüentemente, o surgimento das resistências à transferência de massa na camada externa. Sendo assim, o estabelecimento de uma maior agitação no

sistema reacional poderia reduzir esses efeitos, ficando a transformação na dependência única da reação química na superfície do biocatalisador.

No processo heterogêneo desenvolvido, foi interessante também avaliar a existência de efeitos difusivos no interior da estrutura porosa do biocatalisador, que implicam na formação de um perfil de concentração do substrato, a partir da posição de entrada nos poros, desenvolvendo-se no interior do *pellet*. O cálculo do módulo de Thiele (Equação 5.5), que relaciona o regime químico com o regime difusivo, permitiu avaliar os efeitos de transferência de massa interna ao biocatalisador.

$$\Phi^2 = \frac{V_0 R^2}{D_{LS}[S]} \quad (5.5)$$

na qual  $V_0$  é a velocidade inicial de desaparecimento de substrato ( $\text{gcm}^{-3}\text{min}^{-1}$ ),  $D_{LS}$  é a difusividade efetiva do substrato ( $\text{cm}^2\text{min}^{-1}$ ) e  $R$  é o raio do *pellet* (cm).

Para a determinação da difusividade efetiva,  $D_{LS}$ , utilizou-se a correlação de Wilke & Chang (Equação 2.15).

$$D_{LS} = \frac{7,4 \times 10^{-8} (\xi_{\text{H}_2\text{O}} M_{\text{H}_2\text{O}})^{1/2} T}{V_S^{0,6} \mu_L} \quad (2.15)$$

para a qual:  $\xi_{\text{H}_2\text{O}} = 2,6$ ;  $M_{\text{H}_2\text{O}} = 18\text{g}$ ;  $T = 333 \text{ °K}$ ;  $V_S = 347,8\text{m}^3\text{gmol}^{-1}$ ;  $\mu_L = 1,329\text{poise}$  ( $1,329\text{gm}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Os valores de  $D_{LS}$  e de  $\phi^2$  calculados estão apresentados na Tabela 5.4. Como ao valor do módulo de Thiele é pequeno, conclui-se que a resistência à difusão no interior do *pellet* é insignificante quando comparada à velocidade da reação que ocorre no sítio ativo do biocatalisador.

Tabela 5.4 – Valores dos parâmetros necessários à avaliação dos efeitos de transferência de massa para o processo descontínuo heterogêneo.

$a_{LS} (\text{cm}^2\text{cm}^{-3})$	$k_{LS} (\text{cm min}^{-1})$	$a_{LS}k_{LS} (\text{min}^{-1})$	$D_{LS} (\text{cm}^2 \text{s}^{-1})$	$\phi^2$ (adimensional)
4,24	$5,16 \times 10^{-2}$	$2,19 \times 10^{-1}$	$3,62 \times 10^{-2}$	$8,12 \times 10^{-4}$

## 5.5. Hidrólise da Sacarose em Sistema Contínuo

Considerando as avaliações cinéticas do processo enzimático heterogêneo de hidrólise da sacarose, bem como os efeitos de transferência de massa que influenciam o processo, foram desenvolvidas operações unitárias em biorreatores de leito fixo e de leito fluidizado para avaliar a possibilidade de se desenvolver um modelo contínuo capaz de hidrolisar xaropes concentrados de sacarose, de forma a obter bons rendimentos de açúcar invertido.

### 5.5.1. Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fluidizado

Os resultados obtidos através do estudo hidrodinâmico estão apresentados na Figura 5.17.

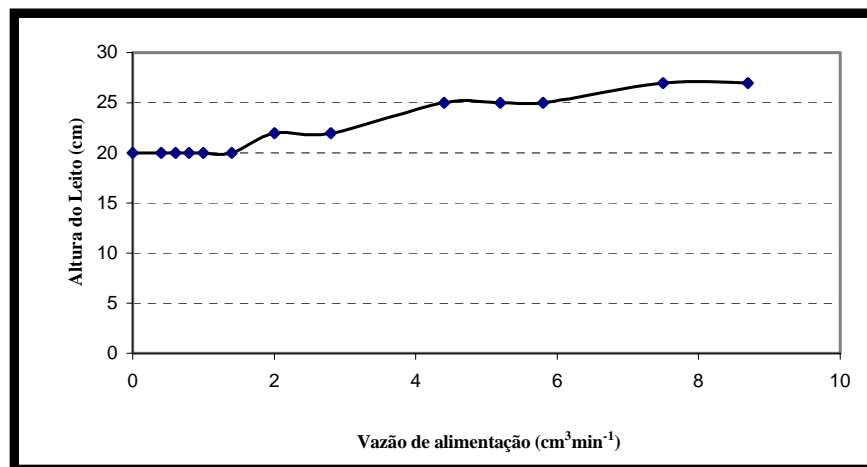


Figura 5.17 - Altura do leito em função da vazão de alimentação

Verifica-se na Figura 5.17 que, mesmo quando da aplicação de vazões elevadas, não ocorreu a fluidização do leito, ou seja, não foi atingida a velocidade mínima de fluidização nas condições de estudo.

Os testes de atividade realizados nas amostras coletadas na saída do reator nos casos em que ocorreu uma discreta expansão do leito ( $Vazão = 8,7\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ) forneceram baixos rendimentos de hidrólise, como pode ser observado na Figura 5.18, indicando que o aumento da vazão de alimentação, como uma tentativa de promover a fluidização, não produziria resultados desejáveis em termos de hidrólise, devido ao reduzido tempo de contato enzima-substrato. Uma alternativa que se apresenta é a utilização de um reator com maior altura, o que permitiria a utilização de vazões de alimentação mais

elevadas para promover a fluidização, sem comprometer a hidrólise, uma vez que, neste caso, o tempo de residência no reator seria, consideravelmente, maior.

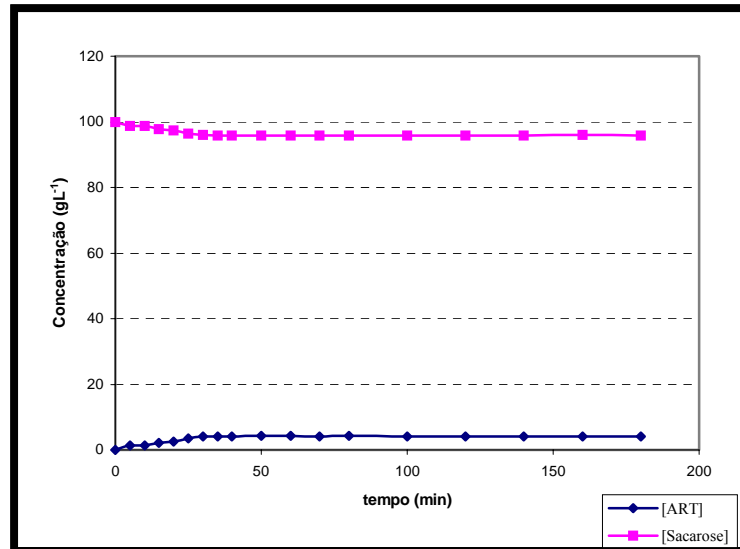


Figura 5.18 – Concentração de sacarose e de ART em função do tempo em condições de leito expandido ( $Q = 8,7\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ;  $H_{\text{leito}} = 27\text{cm}$ ;  $t = 3$  horas)

### 5.5.2. Hidrólise Contínua em Biorreator de Leito Fixo

As Figuras 5.19 e 5.20 apresentam os resultados obtidos para a hidrólise da sacarose em processos contínuos de leito fixo, utilizando-se o biocatalisador auto-imobilizado. Foram realizados experimentos utilizando-se duas concentrações de substrato ( $100\text{gL}^{-1}$  e  $200\text{gL}^{-1}$ ) e para cada concentração, foram testadas três vazões de alimentação ( $4,4\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ;  $3,5\text{cm}^3\text{min}^{-1}$  e  $2,8\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ). Cada experimento teve a duração de 3 horas.

Na Figura 5.19, observa-se que, utilizando-se uma concentração inicial de sacarose de  $100\text{gL}^{-1}$ , obteve-se um rendimento em açúcar invertido de até 62% após 31 minutos de contato enzima-substrato ( $Q = 2,8\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ). O estabelecimento de uma conversão constante a partir da 1<sup>a</sup> hora de operação do sistema indica a possibilidade de se poder utilizar um outro reator de leito fixo para converter a sacarose residual. Para vazões de alimentação mais elevadas, os rendimentos em açúcar invertido foram menores: 40% ( $Q = 3,5\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ) e 29% ( $Q = 4,4\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ ), o que pode ser justificado pelos menores tempos de residência no reator.

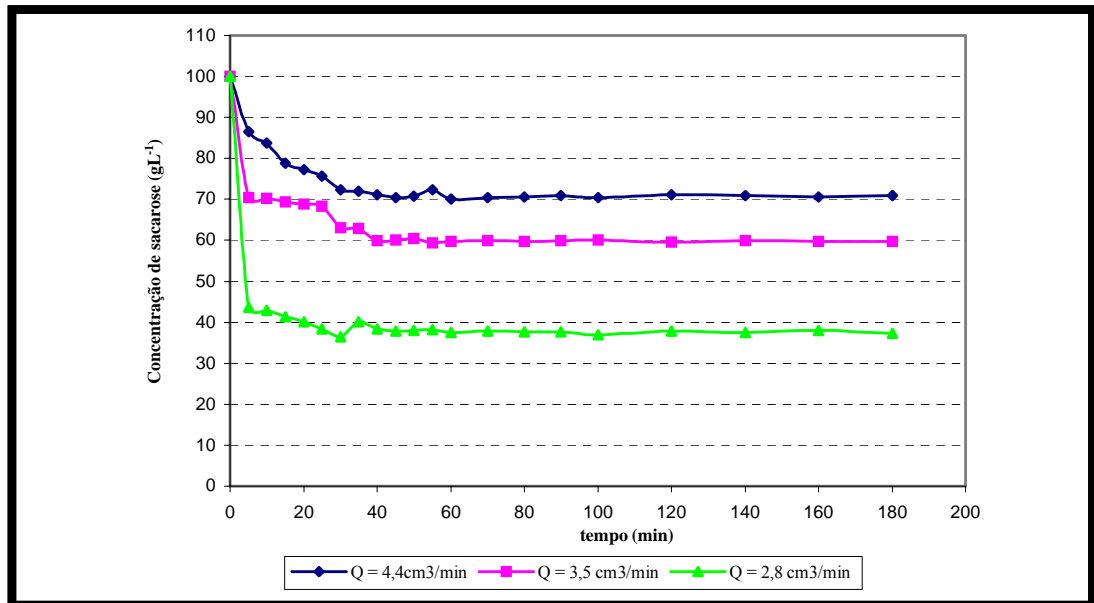


Figura 5.19 – Perfis de concentração de sacarose em função do tempo para sistema contínuo de leito fixo.  $[S_0] = 100\text{gL}^{-1}$

A Figura 5.20 apresenta os resultados obtidos com uma concentração inicial de  $200\text{gL}^{-1}$  de sacarose. As baixas conversões obtidas, neste caso, indicam que ocorre a inibição enzimática pelo excesso de substrato. Esta inibição, já identificada no processo descontínuo, está, provavelmente, associada ao aumento da pressão osmótica exercida pela elevada concentração de açúcar no interior da célula. Assim, mesmo quando da aplicação de baixas vazões de alimentação ( $2,8\text{ cm}^3\text{min}^{-1}$ ), o rendimento de hidrólise permanece baixo (em torno de 38%).

Os perfis de concentração observados nestas figuras indicam o estabelecimento de estados estacionários para cada vazão aplicada. A Tabela 5.5 apresenta as concentrações de substrato no estado estacionário, bem como os rendimentos percentuais obtidos em cada processo.

Os resultados obtidos mostram que o processo contínuo em leito fixo, operando com a enzima invertase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides*, apresenta-se como uma boa alternativa para a produção de açúcar invertido a partir de xaropes concentrados de sacarose.

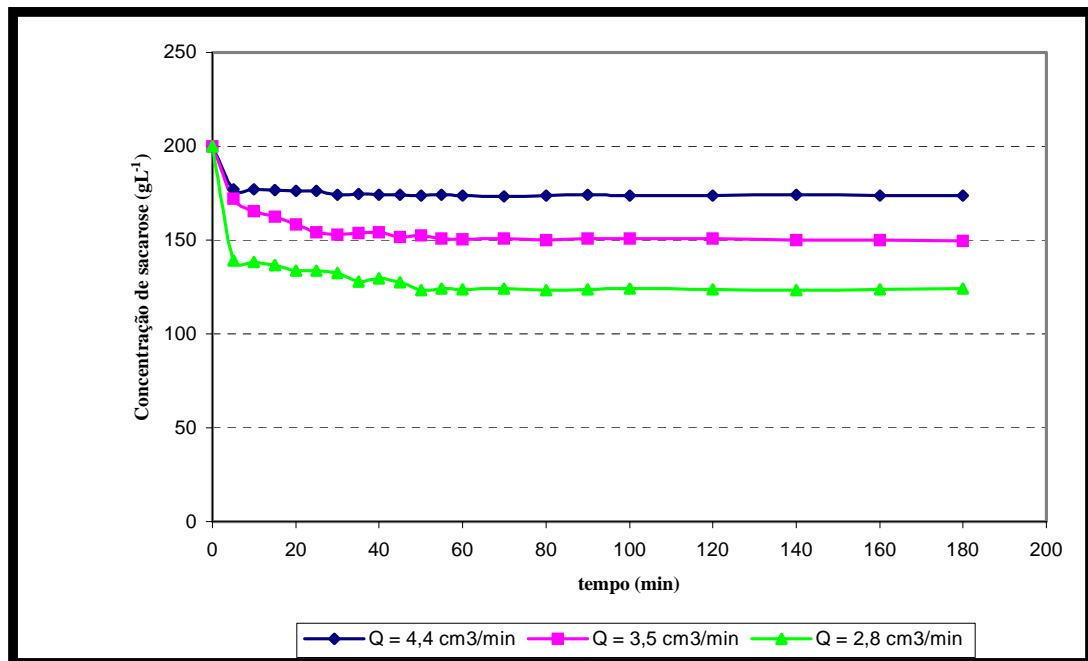


Figura 5.20 – Perfis de concentração de sacarose em função do tempo para sistema contínuo de leito fixo.  $[S]_0 = 200 \text{ gL}^{-1}$ .

Tabela 5.5 – Concentrações de sacarose no estado estacionário e rendimentos em açúcar invertido para os processos contínuos de leito fixo.

Q ( $\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ )	$[S]_0 = 100 \text{ gL}^{-1}$		$[S]_0 = 200 \text{ gL}^{-1}$	
	[S] ( $\text{gL}^{-1}$ )	% ART	[S] ( $\text{gL}^{-1}$ )	% ART
2,8	38	62	124	38
3,5	60	40	150	25
4,4	71	29	174	13

### 5.5.3. Avaliação Cinética do Processo Enzimático Contínuo em Biorreator de Leito Fixo

Considerando os parâmetros cinéticos obtidos anteriormente, a evolução cinética do processo contínuo de hidrólise enzimática da sacarose foi avaliada aplicando-se um modelo cinético que considera os efeitos de transferência de massa, buscando-se quantificá-los.

A aplicação de um balanço de massa em um biorreator contínuo heterogêneo forneceu a seguinte proposta de modelo cinético segundo Michaelis-Menten:

$$-\frac{1}{\rho_{\text{sol}}} \frac{d[S]}{d\tau} = \frac{[S]}{M' + \frac{[S]}{V_{\text{max}}}} \quad (2.23)$$

Nesta equação,  $M'$  é dado por:

$$M' = \left( \frac{1}{a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \right) \quad (2.24)$$

Trata-se de um modelo pseudo-homogêneo convectivo com efeitos de transferência de massa externa ao *pellet* do biocatalisador. Estes efeitos estão inseridos na taxa de consumo aparente, e estão representados pelo coeficiente volumétrico de transferência de massa líquido-sólido, ( $a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}}$ ).

A forma integrada linear deste modelo fornece o perfil de consumo de substrato em função do tempo de residência no biorreator contínuo de leito fluidizado (Equação 2.28).

$$\ln \frac{[S_0]}{[S]} = \frac{\rho_{\text{sol}}}{M'} \left[ \frac{1}{V_{\text{max}}} ([S] - [S_0]) + \tau \right] \quad (2.28)$$

Tendo-se quantificado os parâmetros cinéticos da reação catalisada, foi possível determinar a ordem de grandeza de  $k_{\text{LS}}$  pelo ajuste linear dos valores de  $[S]$  em regime estacionário, obtidos experimentalmente na operação do processo contínuo de hidrólise (Figura 5.21).

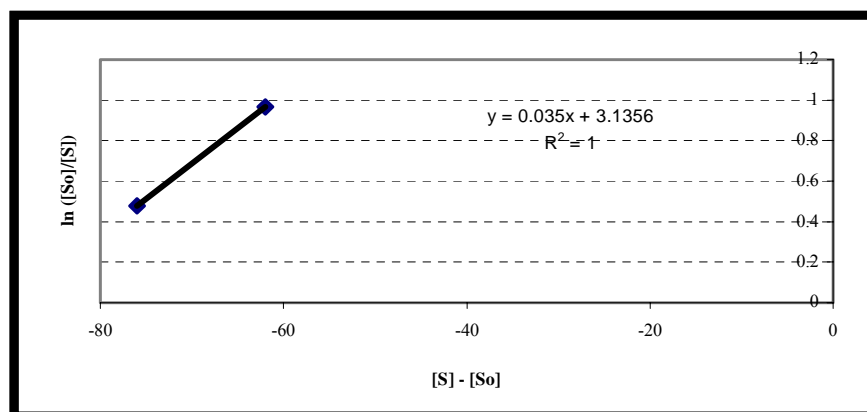


Figura 5.21 – Ajuste linear dos resultados experimentais do processo contínuo de hidrólise enzimática. (dados operacionais:  $Q = 2,8 \text{ cm}^3\text{min}^{-1}$  e  $\tau = 31,6 \text{ min}$ )

A partir do ajuste linear dos valores experimentais e comparando-se com a Equação 2.18, é obtido o valor de  $M'$ , assim calculado:

$$\frac{\rho_{\text{sol}}}{M'} \frac{1}{V_{\text{max}}} = 0,035 \quad \Rightarrow \quad M' = 31,72 \text{ min}$$

$$\text{Sendo } M' = \left( \frac{1}{a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \right) \quad (2.24)$$

$$\text{e } a_{\text{LS}} = \frac{6\omega}{\rho_{\text{Sol}} \cdot dp} \quad (2.14)$$

Após a obtenção do valor de  $M'$  e de  $a_{\text{LS}}$ , determina-se o valor de  $k'_{\text{LS}}$ . Na Tabela 5.6 estão apresentados os resultados obtidos.

O valor encontrado para  $k'_{\text{LS}}$  indica que os efeitos de transferência de massa externa devem ser considerados no modelo cinético, uma vez que o termo  $1/(a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}})$  não é desprezível na expressão de  $M'$ . Comparando-se os valores dos coeficientes volumétricos de transferência de massa obtidos nos processos descontínuo e contínuo, observa-se que, para os dois casos eles são baixos, indicando que a resistência à transferência de massa é elevada nestes processos. Verifica-se, ainda, que estes efeitos estão presentes com maior intensidade no biorreator de leito fixo ( $k'_{\text{LS}} < k_{\text{LS}}$ ), uma vez que a vazão de alimentação de substrato é muito baixa, quando comparada à velocidade aplicada ao sistema descontínuo.

Como, tanto para o processo contínuo como para o descontínuo, foram utilizados *pellets* com as mesmas dimensões, a avaliação feita para quantificar os efeitos difusivos no interior da estrutura porosa do biocatalisador para o processo descontínuo pode também ser aplicada para o contínuo.

Tabela 5.6 – Valores dos parâmetros necessários à avaliação dos efeitos de transferência de massa para o processo contínuo de leito fixo.

$a_{\text{LS}} \text{ (cm}^2\text{cm}^{-3}\text{)}$	$k'_{\text{LS}} \text{ (cm min}^{-1}\text{)}$	$a_{\text{LS}} k'_{\text{LS}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$D_{\text{LS}} \text{ (cm}^2\text{s}^{-1}\text{)}$	$\phi^2 \text{ (adimensional)}$
4,24	$1,85 \times 10^{-3}$	$7,84 \times 10^{-3}$	$3,62 \times 10^{-2}$	$8,12 \times 10^{-4}$



## 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 6.1. Conclusões

Prevendo-se a utilização da invertase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides* no estudo da hidrólise da sacarose, foram empreendidos experimentos nos quais foram avaliadas as condições de atividade máxima da enzima auto-imobilizada, bem como a empregabilidade desta em sistemas descontínuos e contínuos para hidrólise de xaropes concentrados de sacarose, sob condições controladas.

O estudo desenvolvido permitiu chegar às seguintes conclusões:

1. As concentrações de enzima auto-imobilizada que otimizam o processo de hidrólise estão compreendidas entre  $40\text{gL}^{-1}$  e  $100\text{gL}^{-1}$ .
2. Através da Técnica de Planejamento Fatorial mostrou-se que o pH, a temperatura e a agitação, bem como a interação entre o pH e a temperatura, têm efeitos significativos sobre o percentual de hidrólise da sacarose, sendo os valores ótimos dessas variáveis: pH 5,0, temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  e agitação de 170rpm.
3. O fungo *Cladosporium cladosporioides* utiliza, preferencialmente, a glicose em seu metabolismo, porém, este consumo é insignificante, principalmente, em elevadas concentrações desse substrato e em reduzidos tempos de contato líquido-sólido.
4. Para concentrações de sacarose inferiores a  $100\text{gL}^{-1}$ , a invertase auto-imobilizada seguiu a cinética de Michaelis-Menten, com um  $K_M$  de  $145,6\text{gL}^{-1}$  e  $V_{\max}$  de  $0,915\text{min}^{-1}$ . Para valores de concentração de substrato superiores a  $100\text{gL}^{-1}$ , foi observada uma inibição enzimática pelo excesso de substrato, a qual está, provavelmente, associada ao aumento da pressão osmótica exercida pela elevada concentração de açúcar no interior da célula.
5. O processo descontínuo de hidrólise da sacarose, utilizando-se a invertase auto-imobilizada nas condições ótimas de hidrólise, forneceu uma produtividade volumétrica em açúcares redutores de  $20\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  para uma concentração inicial de sacarose de  $100\text{gL}^{-1}$ .
6. Os testes hidrodinâmicos realizados na tentativa de se determinar a velocidade mínima de fluidização do leito, constituído pela invertase auto-imobilizada, revelaram a impossibilidade de se desenvolver um processo contínuo de leito fluidizado para a produção de açúcar invertido a partir do biorreator disponível, uma

vez que, nas condições de estudo, a velocidade mínima de fluidização não foi alcançada.

7. A operação em sistema contínuo de leito fixo, utilizando uma concentração inicial de substrato de  $100\text{gL}^{-1}$ , forneceu um rendimento em açúcar invertido de 62% para um tempo de residência de 31,6 minutos. O perfil de concentração obtido experimentalmente indicou o estabelecimento de estado estacionário a partir da 1ª hora do processo, o que sugere a possibilidade de se poder utilizar outro reator de leito fixo em série para converter a sacarose residual.
8. O modelo proposto para o processo contínuo de leito fixo para a hidrólise enzimática da sacarose, no qual considerou-se os efeitos heterogêneos de acesso do substrato à enzima auto-imobilizada, ajustou-se bem aos dados experimentais para um coeficiente volumétrico de transferência de massa de  $7,84 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ .
9. Finalmente, pode-se concluir que a imobilização da invertase na massa celular do fungo *Cladosporium cladosporioides* e sua utilização em sistema contínuo de leito fixo para a produção de açúcar invertido mostrou-se eficiente e promissora para uma possível utilização industrial.

## 6.2. Sugestões

Para trabalhos posteriores, visando complementar/implementar o estudo realizado, são apresentadas as seguintes sugestões:

1. Avaliar o efeito da agitação na produção de *pellets* de biomassa em dimensões que otimizem o processo.
2. Analisar um sistema constituído de vários leitos fixos funcionando em série.
3. Abordar novas configurações de leitos fluidizados, utilizando-se reatores de maiores dimensões e injetando-se um gás inerte para promover a fluidização e a hidrólise.
4. Estudar a obtenção de xaropes concentrados de frutose, utilizando-se a enzima glicose isomerase com xaropes concentrados de açúcar invertido.
5. Utilizar os resíduos da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de edulcorantes por via enzimática.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. N. - Purificação de Enzimas. *Biochemical Engineering Journal*, 1, 377 – 387, 2001.
- ANDRADE, A.V.M. – Efeitos de fontes de carbono na produção da atividade inulase por *Cladosporium cladosporioides* e sua utilização para produção de xarope rico em D-frutose por hidrólise do extrato de alcachofra de Jerusalem (*Heliantus tuberosus* L.). Recife, 1991. (Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE).
- AKGÖL, S.; KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M.Y. – Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres, *Food Chemistry*, 74, 281-288, 2001.
- ARICA, M. Y.; Hasirci, V.; ALAEDDINONOGLU, N. G. - Covalent immobilization of  $\alpha$ -amilase onto phema microspheres: preparation and application to fixed bed reactor. *Biomaterials*, 15, 761-768, 1995.
- ARRUDA, L.M.O. – Caracterização cinética da invertase imobilizada por aprisionamento em gel de alginato de cálcio. São Paulo, 1996. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. - *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. Singapore, McGraw-Hill Book Company, 1986.
- BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. - Production of high fructose syrup from Jerusalem artichoke tubers using *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized in agar gel. *Journal of General and Applied Microbiology*, 31, 305–311, 1985.
- BALMONTE, E.; OLAZAR, L. – Depósito Dirección Nacional del Derecho de Autor n°. 976770, 2002. [www.cnba.uba.ar/acad/quimica/isomeria\\_optica.pdf](http://www.cnba.uba.ar/acad/quimica/isomeria_optica.pdf).
- BASSETTI, F.J.; MORAES, F.F., ZANIN, G.M. – Hidrólise enzimática da sacarose em reator de leito fixo e fluidizado. XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS (ENEMP), Anais, 705-710, 1997.
- BASSETTI, F.J.; BERGAMASCO, R.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. – Thermal Stability and Deactivation energy of free and immobilized invertase. *Biochemical Engineering Journal*, 20, 1123-1129, 2000.

- BERGAMASCO, R.; BASSETTI, F.J.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. - Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Biochemical Engineering Journal*, 20, 1123-1129, 2000.
- BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. - *Biochemical Engineering*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1997.
- BLANCHARD, P.H.; GEIGER, E.O. - Production of high fructose corn syrup in the USA. *Sugar Technology Reviews*, 11, 1-94, 1984.
- BÓDALO, A.; GÓMEZ, J.L.; GÓMEZ, E.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M.F. - Fluidized bed reactors operating with enzyme systems: design model and its experimental verification. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 915-922, 1995.
- BOMMARIUS, A. - Biotransformations and Enzyme reactors. *Biotechnology: Bioprocessing*, 2.ed., 3, 427-466, 1993.
- BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. - *Biotecnología Industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos*, vol. 3, São Paulo, Edgard Blücher LTDA, 2001.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; Hunter, J. S. - *Statistics for Experimenters*. New York, John Wiley & Sons, 1978.
- CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*. Porto Alegre, Editora Artmed, 3 ed., 2000.
- CHÁVEZ, F.P.; RODRIGUEZ, L.; DÍAZ, J.; DELGADO, J.M.; CREMATA, J.A. - Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. *J. of Biotechnology*, 53, 67-74, 1997.
- CHOU, C.C.; JASOVSKY, G.A. - Advantages of Ecosorb™ precoats in liquid sugar production. *International Sugar Journal*, 95, 1138, 425-430, 1993.
- COSTAGLIOLI, P.; MEILHOC, F.; JANATOVA, I.; KLEIN, R.; MASSON, J. - Secretion of invertase from *Schwanniomyces occidentalis*. *Biotechnology Letters*, 19, 623-627, 1997.
- COUTINHO FILHO, U.; HORI, C.E.; RIBEIRO, E.J. - Influence of reaction products in inversion of sucrose by invertase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16 (2), 1999.
- DAVIDSON, J.F.; CLIFT, R.; HARRISON, D. - *Fluidization*. London, Academic Press, 2.a ed., 1985.

- DE QUEIROZ, A.A.A; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R.C.; HIGA, Z.O. – Invertase immobilization onto radiation-induced graft copolymerized polyethylene pellets. *Radiation Physics and Chemistry*, 1995.
- D'SOUZA, S. F.; MELO, J.S. - Immobilization of bakers yeast on jute fabric through adhesion using polyethylenimine: application in an annular column reactor for the inversion of sucrose. *Process Biochemistry*, 36, 677-681, 2001.
- ETTALIBI, M ; BARATTI, J.C.-. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 13-20, 1987.
- ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. – Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 596-601, 2001.
- FAN, L.T.; YANG, Y.C.; WEN, C.Y. – Mass transfer in semi-fluidized beds for solid-liquid systems. *AIChE J.*, 6, 482-487, 1960.
- FERREIRA, M.S.S.; ANDRADE, A V.M.; KENNEDY, J.F. - Properties of thermostable non-specific fructofuranosidase by *Cladosporium cladosporioides* for hydrolysis of Jerusalem artichoke extract, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31, n. 1. 1992.
- GARRET, R.H.; GRISHAM, C.M. – *Biochemistry*. Florida, Saunders College Publishing, 1995.
- GLAZER, N.; NIKAIDO, H.- *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. 2.ed., New York, W. H. Freeman and Company, 1995.
- GUILBAULT, G.G.; KAUFFMANN, J.M.; PATRIARCHE, G.J. – Immobilized enzyme electrodes as biosensors. *Bioprocess Technology*, 14, 209-262, 1991.
- HOWARD, J. R. – Fluidized Bed Technology: Principles e Applications, Adam Hilger, England, 1989,. In: SIQUEIRA, A , R., - Estudo do processo de remoção de chumbo (II) de efluentes sintéticos em leito fluidizado. Recife, 2001 (Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química da UFPE).
- ILLANES, A. – *Biotecnologia de Enzimas*. Valparaiso, Editora de la Universidad Catolica de Valparaiso, 1994.

- ILLANES A.; WILSON L.; TOMASELLO G. - Effect modulation of enzyme inactivation on temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 531-540, 2001.
- KRASTANOV, A. – Continuous sucrose hydrolysis by yeast cells immobilized to wool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 5:476-481, 1997.
- LACERDA FILHO, A.M. - Investigação da inulase de fonte microbiológica, Recife, 1987. (Tese de Mestrado da Universidade Federal de Pernambuco).
- LUCARINI, A.C.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. – Variabilidade na determinação da constante cinética de Michaelis-Menten da invertase presente em células de *Saccharomyces cerevisiae*. In: VIII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 8, Teresópolis, 2000.
- MILLER, G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 3: 426-428.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual review of Microbiology*. New York, 3, 371-394, 1949.
- MONSAN, P.; COMBRES, D. – Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 347-351, 1984.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. – *Bioreactors Description and Modelling*. Ed. Biotechnology: Bioprocessing, 2.ed., Weinheim, VCH., 3, 77-103, 1993.
- ODA, Y.; TONOMURA, K. – Purification and characterization of invertase from *Torulospira pretoriensis* YK-1. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 58, 1155-1157, 1994.
- ÖZDURAL, A.R.; TANYOLAÇ, D.; DEMIRCAN, Z.; BOYACI, I.H.; MUTLU, M.; WEBB, C. – A new method for determination of apparent kinetics parameters in recirculating packed-bed immobilized enzyme reactors. *Chemical Eng. Science*, 56, 3483-3490, 2001.
- RAIMUNDO, G.M. – Desenvolvimento do processo enzimático contínuo para produção de açúcar invertido. Recife, 2003. (Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química da UFPE).
- RIBEIRO, R.R. – Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex – 1X8-50. São Paulo-SP, 1997. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).

- RIBEIRO, R.R.; VITOLO, M. – Kinetic characterization of invertase on strongly basic anion exchange resin. In: Third Biomass Conference of the Americas, 3, Montreal, Pergamon Press, 2, 1155-1162, 1997.
- RICHARDSON, J. F.; PEACOCK, D.G. – Chemical & Biochemical Reactors & Process Control, 3, 3.ed., Pergamon Press, Oxford, 1994.
- ROCHA-FILHO, J.A.; VITOLO, M. – *Enzimas no contexto da síntese orgânica*. Edição dos Autores, São Paulo-SP, 1998.
- RODRIGUES, M.L.; KALIL, S.J.; MAUGERI, F. - Planejamento Fatorial e “Screening Design” como ferramenta para Otimização de Processos Bioquímicos. In: XII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Uberlândia, Brasil, 1998.
- RODRIGUES, M.V.N.; RODRIGUES, R.A.F.; SERRA, G.E.; ANDRIETTA, S.R.; FRANCO, T.T. – Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea através de planejamento experimental. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 20, 1, 2000.
- RODRIGUEZ, J.; PEREZ, J.A.; RUIZ, T.; RODRIGUEZ, L. – Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. *Biochemical Journal*, 306, 235-239, 1995.
- RUBIO, M.C.; MALDONADO, M.; NAVARRO, A.R. – Effect of culture conditions on invertase production in strain of *Aspergillus niger*. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 15, 17-22, 1997.
- RUBIO, M.C.; RUNCO, R.; NAVARRO, A.R. – Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 61, 605-609, 2002.
- SCRIBAN, R. -. Biotecnologia. Editora Manole Ltda., 220-238, 1985.
- SIMIONESCU, C.; POPA, M.; DUMITRIU, S. - Immobilization of invertase on the Diazonium Salt of 4-Amino Benzoylcellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 361-365, 1987.
- SIQUEIRA, R.A.- Estudo do processo de remoção de chumbo (II) de efluentes sintéticos de leite fluidizado. Recife, 2001. (Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química da UFPE).
- SVAROVSKY, L. - *Liquid Separation*. London, Butterworths, 2ª ed., 1-63, 1981.
- TANRISEVEN, A. – Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36, 11:1081-1083, 2001.



- TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; HGOULDING, K.; STAMBURG, Y.P. - *Biotechnologia: Princípios Bioquímicos*. Zaragoza, Ed. Agribia S. A., 1996.
- TREVISAN, H.C. – Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas. Campinas-SP, 1993. (Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP).
- UENG, P. P.; McCracken, L. D.; GONG, C. (in Antonio Vicente Marrocos de Andrade). Fructose production from sucrose and high fructose syrup: A mycelial fungal system. *Biotechnology Letters*, 4, 6: 353-358, 1982.
- ULBRICHT, M.; UHLICH, T.; TOMASCHEWSKI, G. - Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinylalcohol. *Enzymes and Microbial Technology*, 19, 124-131, 1999.
- VITOLLO, M. – Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*). São Paulo-SP, 1979. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- VITOLLO, M. – Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalysed by invertase obtained from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 811-813, 1984.
- VITOLLO, M.; Barros, D.P. – Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on chitin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 25, 3:240-243, 1992.
- VOET, D.; VOET, J.G. – *Biochemistry*, Londres, John Wiley & Sons, 2ed., 1995.
- WISEMAN, A.; WOODWARD, J. - Industrial Yeast Invertase Stabilization. *Process Biochemistry*, 10, 24-30, 1975.
- ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. – Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized amyloglucosidase in the saccharification of liquefied cassava starch, *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 70/72, 789-804, 1998.
- ZHANG, F.; KNAPP, J.S.; TAPLEY, K.N. – Development of bioreactor systems for decoloration of Orange II using white rot fungus. *Biotechnol. Bioeng.*, 82, 915-923, 2000.
- ZITTAN, L. – Enzymatic hydrolysis of inulin: an alternative way to fructose production. *Starch/Starke*, 33, 11: 373-377, 1981.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Resumo do Trabalho Apresentado no XLII Congresso Brasileiro de Química

#### **ESTUDO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA INVERTASE AUTO-IMOBILIZADA EM CÉLULAS INTACTAS DE *Cladosporium cladosporioides*.**

ALMEIDA, A.C.S., ARAÚJO, L.C., ABREU, C.A.M., PALHA, M.L.A.P.F.  
[aclaud2@ig.com.br](mailto:aclaud2@ig.com.br) [angeles@npd.ufpe.br](mailto:angeles@npd.ufpe.br)

**Universidade Federal de Pernambuco – UFPE**  
**Departamento de Engenharia Química**

A enzima Invertase (E.C.3.2.1.26) catalisa a hidrólise da sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose conhecida como açúcar invertido, que possui maior poder edulcorante, é mais facilmente incorporado em preparos industriais e possui maior valor agregado que a sacarose. O fungo *Cladosporium cladosporioides* possui invertase em sua constituição, sendo interessante o uso dessa biomassa como suporte de imobilização natural para tal enzima. O presente trabalho teve por objetivo determinar os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade hidrolítica da invertase auto-imobilizada, bem como comparar esta atividade com a da invertase purificada, em condições ótimas. Células do fungo foram colocadas em contato com uma solução 20g/L de sacarose P.A. durante 4 horas, a temperaturas que variaram de 10 a 100°C. Em seguida, variou-se o pH do meio reacional de 2 a 8. Durante a realização dos experimentos foram coletadas amostras a cada 20 minutos para quantificação de açúcares redutores pelo método DNSA. O maior rendimento de hidrólise foi obtido na temperatura de 60°C e pH 6, após 3 horas de reação. Para a invertase purificada e solúvel, rendimento semelhante foi obtido em 2 horas de reação. O maior tempo de hidrólise obtido com a invertase auto-imobilizada está relacionado às limitações difusivas impostas pela estrutura celular, o que não ocorre com a invertase solúvel. No entanto, a utilização da invertase auto-imobilizada apresenta-se como uma alternativa atraente para utilização em processos industriais, uma vez que a enzima purificada possui elevado custo, que está associado ao baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação da mesma. Além disso, a imobilização natural da

enzima melhora sua estabilidade operacional, tornando-a menos susceptível às variações do processo.

**Palavras-chave:** Açúcar invertido, invertase auto-imobilizada, invertase purificada *Cladosporium cladosporioides*.

## **8.2. Resumo do Trabalho Apresentado no IV Encontro de Catálise do Norte/Nordeste**

### **Planejamento Experimental para Otimização da Hidrólise da Sacarose Catalisada pela Invertase Auto-Imobilizada em Células Intactas de *Cladosporium cladosporioides*.**

*Ana Cláudia Santana de Almeida*<sup>1</sup>, *Luciares Costa de Araújo*<sup>1</sup>, *César Augusto Moraes de Abreu*<sup>1</sup>, *Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> UFPE – CTG – Departamento de Engenharia Química - E-mail: [sivonalmeida@yahoo.com.br](mailto:sivonalmeida@yahoo.com.br)

## **RESUMO**

A sacarose é o adoçante natural tradicionalmente usado para consumo humano. A hidrólise da sacarose gera uma mistura equimolar de frutose e glicose denominada açúcar invertido, que possui maior poder edulcorante, é mais facilmente incorporada em preparos industriais e possui maior valor agregado que a sacarose. A produção de açúcar invertido pode ser alcançada através de hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise enzimática, catalisada pela invertase (D-fructofuranosidase – E.C. 3.2.1.26), produz um alto grau de hidrólise, originando um produto de alta qualidade, com baixos teores de cinzas, cor e hidroximetil furfural (HMF). O fungo *Cladosporium cladosporioides* possui invertase em sua constituição, sendo interessante o uso dessa biomassa como suporte de imobilização natural para tal enzima (auto-imobilização). O objetivo deste trabalho foi determinar as condições operacionais ótimas da invertase auto-imobilizada, de modo a obter o maior rendimento de hidrólise. Para isso foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  com um ponto central em triplicata, totalizando 11 ensaios realizados de forma aleatória. As variáveis estudadas foram a temperatura, o pH e a agitação, e, como resposta, foi monitorado o percentual de hidrólise através da quantificação dos Açúcares Redutores Totais pelo método DNSA. Em seguida, utilizou-

se a metodologia de superfície de resposta para verificar a influência de cada uma das variáveis, bem como otimizá-las. O *software* utilizado foi o *Statistic for Windows* versão 5.0. As condições estabelecidas para o processo de hidrólise de modo a obter um produto com elevado percentual de inversão, após 2 horas de reação, foram temperatura de 60°C, pH 6 e sob agitação.

### 8.3. Trabalho Completo Apresentado no XIV Simpósio Nacional de Fermentação

## Hidrólise da Sacarose Catalisada pela Invertase Auto-Imobilizada em Células Intactas de *Cladosporium cladosporioides*.

Ana Cláudia Santana de Almeida<sup>1</sup>, Luciares Costa de Araújo<sup>1</sup>, César Augusto Moraes de Abreu<sup>1</sup>, Maria Alice de Andrade Gomes Lima<sup>1</sup>, Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Engenharia Química  
Caixa Postal 50740 – 521 Campus Universitário Recife – PE – E-mail: [anacs@chsf.gov.br](mailto:anacs@chsf.gov.br)

### RESUMO

A enzima invertase (E.C. 3.2.1.26 - D-fructofuranosidase) catalisa a hidrólise da sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose denominada açúcar invertido. O fungo *Cladosporium cladosporioides* possui invertase em sua constituição, sendo interessante o uso dessa biomassa como suporte de imobilização natural para tal enzima. O presente trabalho teve por objetivo determinar as condições operacionais ótimas da invertase auto-imobilizada, bem como seus parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{máx}$ ). Para a avaliação dos parâmetros operacionais foi realizado um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>. As variáveis estudadas foram a temperatura, o pH e a agitação, e, como resposta, foi monitorado o percentual de hidrólise. Para a determinação dos parâmetros cinéticos foram realizados testes em batelada nas condições operacionais ótimas. As condições estabelecidas para o processo de hidrólise foram temperatura de 60°C, pH 6 e sob agitação de 170 rpm. A invertase auto-imobilizada apresentou um  $K_M$  de 145,63 g/L e  $V_{máx}$  de 0,915 g/L.min.

### INTRODUÇÃO

A sacarose é o adoçante natural tradicionalmente usado na alimentação humana por conta do seu sabor agradável, valor nutritivo e baixo custo de produção. Uma de suas

fontes naturais mais importantes é a cana-de-açúcar, contendo até 20% de sacarose em peso (GLAZER & NIKAIDO, 1995). A hidrólise da sacarose gera uma mistura equimolar de frutose e glicose denominada açúcar invertido, que possui maior poder edulcorante, é mais facilmente incorporado em preparos industriais e possui maior valor agregado que a sacarose. No Brasil, cuja capacidade produtora de sacarose é reconhecida internacionalmente, os estudos no sentido de viabilizar economicamente a produção de açúcar invertido têm sido insipientes. No entanto, torna-se interessante a pesquisa para a sua obtenção a partir da sacarose de cana devido ao baixo valor de mercado deste produto.

Hidrólises ácidas e enzimáticas têm sido identificadas como vias químicas e bioquímicas de conversão de sacarose (dissacarídeo) em glicose e frutose (monossacarídeos solúveis). A acidez gerada na hidrólise ácida pode ser devida à ação direta de um ácido (hidrólise homogênea) ou à liberação de  $H^+$  de uma resina catiônica (hidrólise heterogênea). A hidrólise ácida homogênea é um processo econômico, onde a escolha do ácido depende de sua compatibilidade com o produto final, porém os xaropes assim obtidos são altamente coloridos devido às condições drásticas de reação (pH e temperatura) (CHOU & JASOVSKY, 1993). Por outro lado, o meio ácido promovido pela resina catiônica pode causar perda de açúcar por degradação do mesmo, levando à formação do hidroximetil furfural (HMF) e por conseqüência, desenvolvimento de cor no xarope.

A hidrólise enzimática catalisada pela invertase produz um alto grau de hidrólise, originando um produto de alta qualidade com baixos teores de cinzas, cor e HMF (RODRIGUES *et al.*, 2000). O fator limitante para a utilização da hidrólise enzimática em escala industrial tem sido o elevado custo da invertase que está, sobretudo, associado ao baixo rendimento obtido nos processos de extração e purificação desta enzima.

Porém, de acordo com a literatura, a invertase produzida pelo microrganismo não é liberada para o meio, ficando retida no espaço periplásmico da célula (LUCARINI *et al.*, 2000). Neste contexto, a utilização de biomassa do fungo *Cladosporium cladosporioides* como suporte natural para invertase (auto-imobilização) apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo e com bons resultados, principalmente por oferecer grande estabilidade operacional à enzima, possibilitando contínuas reutilizações sem perda significativa de atividade.

O bioprocessamento de produção de açúcar invertido, assim como qualquer processo biotecnológico, é muito complexo devido ao grande número de variáveis envolvidas. Portanto, um meio de cultura balanceado, juntamente com valores ótimos de temperatura, pH, agitação e aeração são necessários para se alcançar boa produtividade (BAILEY & OLLIS, 1986).

Um recurso utilizado em estudos que envolvem diferentes variáveis é a técnica de planejamento fatorial que permite correlacionar as variáveis independentes com as dependentes através de um número mínimo de ensaios. A metodologia do planejamento fatorial associada a análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, fornecendo informações confiáveis do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX *et al.*, 1978). Através dessa técnica de planejamento de experimentos é possível avaliar a influência das variáveis independentes nas variáveis de respostas, bem como as interações entre ambas. A partir da análise da variância pode-se obter um modelo probabilístico adequado que correlacione as respostas em função das variáveis independentes, o que permite determinar os valores destas, otimizando o desempenho do bioprocessamento (RODRIGUES *et al.*, 1998).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo empregar a metodologia do planejamento fatorial de experimentos de modo a determinar as condições ótimas para a hidrólise enzimática da sacarose, utilizando-se a enzima invertase auto-imobilizada na massa celular do fungo *Cladosporium cladosporioides*, e a partir deste, determinar os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{Máx}$ .

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microorganismos e condições de cultura

Foi utilizada a linhagem *Cladosporium cladosporioides* URM 4331, pertencente à coleção do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas foram conservadas sob refrigeração, em meio sintético BDA (Batata Dextrose Ágar) contendo (g/L) glicose, 20,0 e ágar, 15,0, e repicadas a cada 30 dias, podendo ser visualizadas em sua forma fungiforme na Figura 1A.

Para o crescimento do fungo, foram inoculados cerca de  $10^6$  esporos em frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio semi-sintético Czapeck, cuja composição é (g/L):  $\text{NaNO}_3$ , 3,0; KCl, 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0; Sacarose, 30,0. O fungo cresceu sob agitação constante de 300 rpm, à temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C), durante 20 (vinte) dias. O processo de crescimento foi acompanhado por medidas de pH e testes de pureza quanto a contaminantes microbianos, através de observações microscópicas. A agitação aplicada permitiu a formação de *pellets* com diâmetro médio de 0,132 mm, que podem ser visualizados na Figura 1B. Tais *pellets* foram utilizados como suportes da enzima usada como biocatalisador no processo de hidrólise.



Figura 1A - *Cladosporium cladosporioides* em sua forma fungiforme

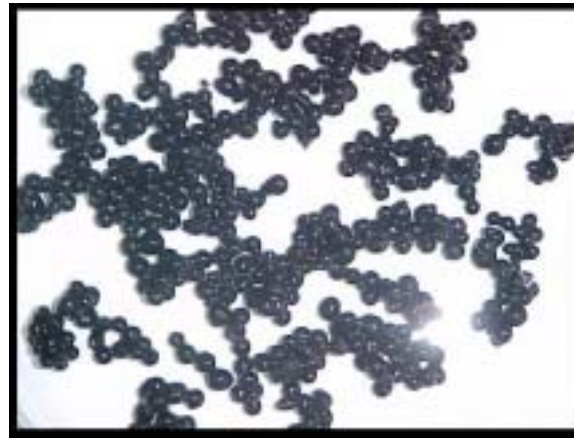


Figura 1B - *Cladosporium cladosporioides* em sua forma "pelletizada"

### Otimização do Processo de Hidrólise

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em sistema descontínuo, com e sem agitação, utilizando-se como substrato soluções de sacarose (concentração de 50 g/L) preparadas em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4 e 6. Para os testes de hidrólise, 3g de células na forma de *pellets* foram incubadas em frascos de Erlenmeyer de 50mL contendo 30mL das soluções de sacarose e submetidas aos ensaios do planejamento fatorial por 180 minutos.

Para a otimização do processo de hidrólise da sacarose foi utilizado um planejamento fatorial completo em três níveis ( $2^3$ ), totalizando 8 ensaios, em duplicata, realizados de

forma aleatória. As variáveis estudadas foram a temperatura, o pH e a agitação, cujos níveis estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial  $2^3$  aplicado à hidrólise enzimática da sacarose.

Variáveis	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
<b>Agitação (A), rpm</b>	0	170
<b>pH</b>	4	6
<b>Temperatura (T), °C</b>	50	70

Os experimentos foram monitorados através da porcentagem de hidrólise, calculada por meio da Equação 1, onde [ART] é a concentração de Açúcares Redutores Totais (glucose + frutose) e  $S_0$  é a concentração inicial de sacarose, ambas em g/L.

$$\% \text{ de Hidrólise} = \frac{[\text{ART}]}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

A dosagem dos açúcares redutores (glucose e frutose) foi realizada pelo método do DNS (Ácido Dinitrossalicílico). O procedimento utilizado é uma variação do método original (MILLER, 1959). De acordo com esse método, os açúcares redutores reduzem o DNS, gerando complexos de coloração alaranjada, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria a 540nm. A construção de uma curva-padrão contendo glicose permite associar a absorbância à concentração dos produtos da reação de hidrólise (RIBEIRO, 1997).

### Estudos Cinéticos

A cinética da invertase auto-imobilizada foi analisada segundo o método das velocidades iniciais de reação, de acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten, a partir do qual foram determinados os parâmetros cinéticos  $V_{\text{Máx}}$  e  $K_M$ , nas condições ótimas do experimento.

Como a invertase apresenta-se auto-imobilizada no fungo, foi necessário determinar a concentração de massa fúngica que otimiza o processo de hidrólise. Em estudos prévios, constatou-se que a melhor concentração de trabalho é de 100 g/L.

Os testes cinéticos foram realizados em sistema descontínuo, sob as condições ótimas obtidas no planejamento fatorial realizado. Para isso, a enzima auto-imobilizada foi incubada em diferentes concentrações de sacarose (20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 g/L) durante 3 (três) horas. A cada 20 minutos foram coletadas amostras para a dosagem de ART. A velocidade da reação para cada experimento foi calculada utilizando-se a Equação 2, na qual  $V$  é a velocidade da reação, em g/L.min; [ART] é a concentração de açúcares redutores formada durante a hidrólise da sacarose, em g/L e  $t$  é o tempo de reação, em minutos.

$$V = \frac{[\text{ART}]}{t} \quad (2)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização do Processo de Hidrólise

A Tabela 2 apresenta as condições dos ensaios de hidrólise para o planejamento fatorial  $2^3$ , bem como os resultados obtidos em termos da porcentagem de hidrólise. De acordo com essa tabela, para a realização do ensaio 1, por exemplo, utilizou-se as variáveis do processo (agitação, pH e temperatura) em seus níveis inferiores (conforme Tabela 1), obtendo-se, nestas condições, um percentual médio de hidrólise de 35,16. Da mesma forma, no ensaio 8, quando foram utilizados os níveis superiores das variáveis, obteve-se 94,17% de hidrólise.

Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  analisando-se o efeito da agitação, do pH e da temperatura

Ensaio	A	pH	T	Hidrólise(%)		Média (%)
1	-	-	-	33,52	36,80	35,16
2	+	-	-	43,35	47,73	45,54
3	-	+	-	65,21	71,77	68,49
4	+	+	-	77,23	81,60	79,42
5	-	-	+	42,26	38,98	40,62
6	+	-	+	45,54	47,73	46,63
7	-	+	+	91,44	87,07	89,26
8	+	+	+	95,81	93,53	94,17

Os efeitos principais de cada variável do processo e aqueles resultantes da interação entre elas foram calculados utilizando-se o *software Statistic for Windows* versão 5.0. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

De acordo com esta tabela, todas as variáveis são significativas e possuem efeitos positivos, ou seja, para as condições estudadas, os níveis superiores destas variáveis favorecem a hidrólise.

Tabela 3 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$

Efeitos	Estimativa $\pm$ erro padrão
<b>Média global</b>	62,41 $\pm$ 0,73*
<b>Efeitos principais</b>	
Agitação (A)	8,06 $\pm$ 1,46*
pH	40,84 $\pm$ 1,46*
Temperatura (T)	10,52 $\pm$ 1,46*
<b>Efeito de interação de dois fatores</b>	
Agitação x pH	- 0,14 $\pm$ 1,46
Agitação x Temperatura	- 2,59 $\pm$ 1,46
pH x Temperatura	7,24 $\pm$ 1,46*
<b>Efeito de interação de três fatores</b>	
Agitação x pH x Temperatura	- 0,41 $\pm$ 1,46

\*Valores significativos (95% de confiança)



Pela análise dos efeitos apresentados na Tabela 3, nota-se que aumentando-se o pH de 4 para 6, ocorre um aumento médio de 40,84% no percentual de hidrólise. Isto sugere que as enzimas microbiológicas são mais ativas no intervalo de pH que viabiliza a célula e, no caso da invertase auto-imobilizada em células de *Cladosporium cladosporioides*, a atividade máxima ocorre com pH em torno de 6, como pode ser observado na Figura 2A, onde se analisa o percentual de hidrólise em função do pH e da agitação.

Da mesma forma, quando a temperatura passa de 50°C para 70°C, há um aumento médio do percentual de hidrólise de 10,52%. No entanto, aumentando-se a temperatura acima deste valor, observa-se um decréscimo na atividade, o qual está associado à redução da estabilidade da enzima devida à desnaturação proteica. De acordo com a superfície de resposta da Figura 2B, nota-se que a temperatura ótima de hidrólise é de 70°C.

Quanto à agitação, observa-se que o sistema agitado aumenta a atividade em cerca de 8%, uma vez que ocorre um aumento na superfície de contato líquido-sólido, o que reduz as resistências à transferência de massa. No entanto, a agitação durante a reação de hidrólise apresenta menos influência que as demais variáveis estudadas.

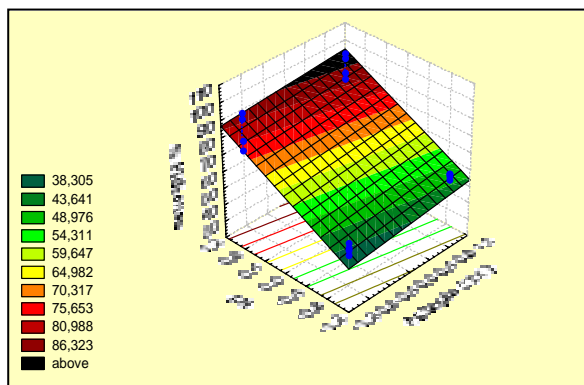


Figura 2A - Perfil da porcentagem de hidrólise em função do pH e da Agitação

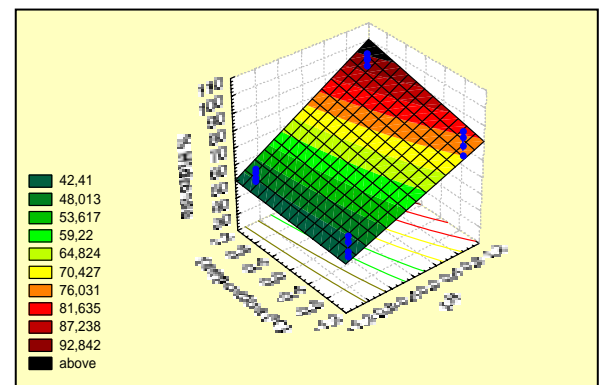


Figura 2B - Perfil da porcentagem de hidrólise em função do pH e da Temperatura

Para a invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi determinado o pH ótimo no intervalo de 3,5 a 6,0, dependendo da concentração de substrato e dos tampões utilizados (SIMIONESCU *et. al.*, 1987; WISEMAN & WOODWARD, 1975), já para a invertase do fungo *Aspergillus niger*, em pH 4,7, a temperatura ótima encontrada foi 55°C (MONSAN & COMBRES, 1984). Estes resultados demonstram que há diferentes pH para cada invertase, dos diferentes microrganismos que a produzem. A temperatura que otimiza o processo de hidrólise é função do tipo de enzima e das condições experimentais, tendo sido reportados valores no intervalo de 45 a 73°C (BERGAMASCO *et. al.*, 2000; WISEMAN & WOODWARD, 1975).

### Determinação dos Parâmetros Cinéticos ( $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ )

Os parâmetros cinéticos da reação enzimática foram calculados pela linearização de Lineweaver-Burk para o modelo cinético de Michaelis-Menten. A partir dos valores estimados pela regressão linear da curva  $1/V$  em função de  $1/S$ , apresentada na Figura 3, obteve-se para a enzima auto-imobilizada, um  $K_M$  de 145,63 g/L (426mM) e um  $V_{M\acute{a}x}$  de 0,915 g/L.min. O valor de  $K_M$  encontrado foi maior que aqueles encontrados na

literatura para a invertase livre (24mM) AKGÖL *et. al.*, 2001; (46mM) TANRISEVEN, A., 2001; (227mM) RUBIO *et. al.*, 2002). Esta mudança na afinidade da enzima pelo substrato é provavelmente causada pela menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima auto-imobilizada. Quanto ao valor de  $V_{M\acute{a}x}$ , este é menor que aqueles encontrados nos trabalhos citados para a enzima livre. No entanto, os valores de  $K_M$  e  $V_{M\acute{a}x}$  para a invertase livre e auto-imobilizada estão na mesma ordem de grandeza, indicando que a função catalítica desta enzima não é prejudicada por este método de imobilização, além de poder ser utilizada inúmeras vezes, mantendo os padrões de qualidade e quantidade.

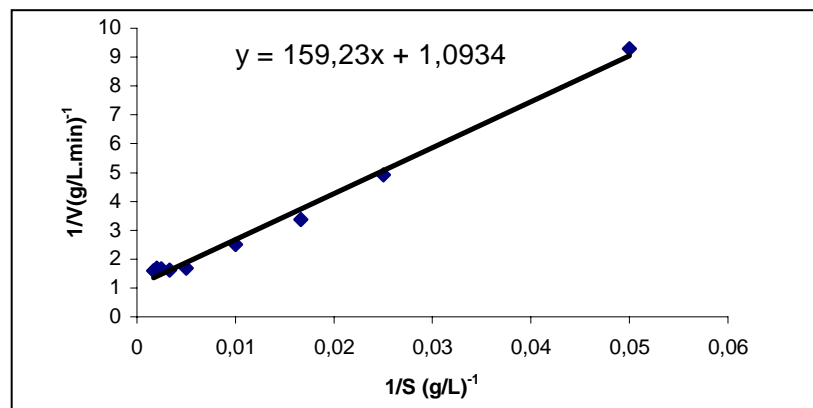


Figura 3 – Linearização de Lineweaver-Burk para a invertase auto-imobilizada

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o planejamento fatorial conduziu à identificação das variáveis de maior influência no processo de hidrólise da sacarose por via enzimática. A condição operacional estabelecida como ótima foi temperatura de 70°C, pH 6 e sob agitação moderada, condição concordante com os trabalhos citados na literatura, que utilizam agitação inferior a 300 rpm, pH de 4,5 a 6 e temperaturas em torno de 60°C.

Quanto à cinética aplicada à invertase auto-imobilizada no fungo *Cladosporium cladosporioides*, observa-se que o modelo cinético de Michaelis-Menten representa satisfatoriamente o comportamento apresentado por esta enzima. Quando comparado com os valores encontrados na literatura para a invertase solúvel, verifica-se que o valor de  $K_M$  obtido para a enzima auto-imobilizada é maior. Este fato pode estar relacionado com a resistência ao transporte de massa imposta pela estrutura celular, o que não ocorre com a invertase solúvel.

Apesar das limitações difusivas impostas pela estrutura celular, esta atua como um suporte de imobilização da enzima, que parece melhorar a estabilidade operacional da invertase, o que justifica o uso da célula no lugar da invertase solúvel em biorreatores industriais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akgöl, S.; Kaçar, Y.; Denizli, A.; Arica, M.Y. (2001), Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*, v.74, 281-288.
- Bailey, J.E.; Ollis, D.F. (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. Singapore, McGraw-Hill Book Company.
- Bergamasco, R.; Bassetti, F.J.; Moraes, F.F.; Zanin, G.M. (2000), Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, 1123-1129.
- Box, G. E. P.; Hunter, W. G. & Hunter, J. S. (1978), *Statistics for Experimenters*. New York, John Wiley & Sons.
- Chou, C.C. & Jasovsky, G.A. (1993), Advantages of Ecosorb™ precoats in liquid sugar production. *International Sugar Journal*, v. 95, n. 1138, p. 425-430.
- Glazer, N. e Nikaido, H. (1995), *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. 2 ed. New York, W.H. Freeman and Company.
- Lucarini, A.C.; Pessoa-Jr, A. e Vitolo, M. (2000), Variabilidade na determinação da constante cinética de Michaelis-Menten da invertase presente em células de *Saccharomyces cerevisiae*. In: *XIII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES*, 8, Teresópolis, Brasil.
- Miller, G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428.
- Monsan, P.; Combres, D. (1984), Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 24, 347-351.
- Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. (1995), *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 299p. (série manuais).
- Ribeiro, R.R. (1997), Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex – 1X8-50. *Dissertação de Mestrado*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, Brasil.
- Rodrigues, M. L.; Kalil, S. J.; Maugeri, F. (1998), Planejamento Fatorial e “Screening Design” como ferramenta para Otimização de Processos Bioquímicos. In: *XII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES*, Uberlândia, Brasil.
- Rodrigues, M.V.N.; Rodrigues, R.A.F.; Serra, G.E.; Andrietta, S.R.; Franco, T.T. (2000), Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea através de planejamento experimental. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.20, n. 1.
- Rubio, M.C.; Runco, R.;Navarro, A.R. (2002), Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, v. 61, 605-609.
- Simionescu, C.; Popa, M.; Dumitriu, S. (1987), Immobilization of invertase on the Diazonium Salt of 4-Amino Benzoylcellulose. *Biotechnology and Bioengineering*., v. 29, 361-365.
- Tanriseven, A. (2001), Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 11,1081-1083.e
- Wiseman, A.; Woodward, J. (1975), Industrial Yeast Invertase Stabilization. *Process Biochemistry*, v. 10, 24-30.