

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

AGNES CRISTINA OLIVEIRA MAFRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO E XAROPE DE FRUTOSE A
PARTIR DE SACAROSE CATALISADA POR ENZIMAS EM REATOR
AIRLIFT**

SÃO CARLOS/SP

2013

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO E XAROPE DE FRUTOSE A
PARTIR DE SACAROSE CATALISADA POR ENZIMAS EM REATOR
AIRLIFT**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

AGNES CRISTINA OLIVEIRA MAFRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO E XAROPE DE FRUTOSE A
PARTIR DE SACAROSE CATALISADA POR ENZIMAS EM REATOR
AIRLIFT**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr

SÃO CARLOS/SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M187pa

Mafra, Agnes Cristina Oliveira.

Produção de ácido glucônico e xarope de frutose a partir de sacarose catalisada por enzimas em reator airlift / Agnes Cristina Oliveira Mafra. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
118 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia química. 2. Sacarose. 3. Frutose. 4. Ácido glucônico. 5. Invertase. 6. Catalase. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
AGNES CRISTINA OLIVEIRA MAFRA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 21 DE MARÇO DE 2013.

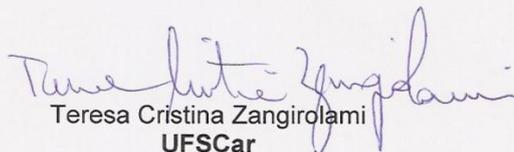
BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



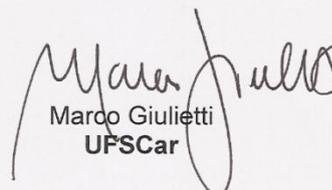
Alberto Colli Badino Júnior
Co-orientador, UFSCar



Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UFSJ



Marco Giuliotti
UFSCar

Dedico este trabalho,
aos meus pais Josélia e Aginaldo,
ao nosso ano de bodas de prata.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus pelo cuidado incondicional durante a minha vida.

Ao Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli, pela paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr, pela oportunidade de trabalhar em um projeto tão promissor e pela confiança.

À todos os professores do Departamento de Engenharia Química, pessoas importantes na minha formação científica e acadêmica.

Aos funcionários pela pronta ajuda e paciência: Thaís, Tiago, Aline e Amadeus.

Aos amigos da UFSCar Patrícia, Guilherme, Lionete, Claudinha, Willian, Vinícius, Cadu, Galeano, Cíntia, Carol, Cleiton, Cris, Felipe, Justi, Deriggi, Inti, Mateus, Fernanda, Vanessa, Cecília, Maritza, Lili, Mayer, Renata, Samirys, Sandra, Adilson, Ana María, Anabel, Edson, Adriano pela amizade e suporte durante o período de trabalho.

Aos amigos da PUCPR Tamires, Kelly, Lorena pela amizade e desculpas pela ausência.

Aos professores da PUCPR Emerson Martim, Emerson Luis Pires, Nei Hansen de Almeida, Dalton Kozak e Mônica Beatriz Kolicheski, pelo incentivo e por me mostrarem o quão linda é a Engenharia Química.

Aos amigos de vida marista Keila, Eduardo, Caio e Roberto.

Aos amigos de vida missionária Renato e Bárbara.

Aos todos os meus familiares pelo carinho e estímulo que me tornaram capaz de suportar todos os desafios até a conclusão deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram para que este trabalho se realizasse.

“Não pretendemos que as coisas mudem se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência. Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um.”

Baseado no livro “The World as I See It” de Albert Einstein (1949)

Missão dada, missão cumprida!

RESUMO

O açúcar de cana (sacarose) é uma matéria-prima produzida em abundância no Brasil, sendo atrativa a produção de derivados com maior valor agregado. O ácido glucônico (AG) pode ser obtido através da conversão multienzimática da sacarose, utilizando como biocatalisadores as enzimas invertase, glicose oxidase (GOD) e catalase (CAT), responsáveis respectivamente pela inversão da sacarose, oxidação da glicose e decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No processo multienzimático obtém-se como subproduto a frutose, também de grande interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica e química. No presente trabalho foi avaliada a produção de AG a partir de sacarose em reator airlift. As enzimas invertase, GOD e CAT solúveis foram caracterizadas quanto à temperatura e ao pH de máxima atividade, bem como quanto à estabilidade térmica na ausência de substrato. A atividade enzimática da invertase foi quantificada pela ação da invertase sobre uma solução de sacarose 200 mM a 30°C, pH 4,8, acompanhando-se a formação de açúcares redutores totais. As atividades enzimáticas da GOD e da CAT foram determinadas monitorando respectivamente a formação de H_2O_2 a partir de uma solução de glicose 1 g/l, 25°C, pH 5,0 e a decomposição de H_2O_2 a partir de uma solução de H_2O_2 35 mM, 25°C, pH 7,5. Invertase apresentou máxima atividade a 45°C e pH 5,0; GOD a 55°C e pH 6,0 e CAT a 25°C e pH 8,0, respectivamente. A partir dos perfis de atividade em função da temperatura e do pH, as condições operacionais de 50, 45 e 40°C em pHs 5,0 e 6,0 foram pré-selecionadas para a bioconversão multienzimática de sacarose a AG. Verificou-se que os melhores tempos de meias-vidas das enzimas invertase, GOD e CAT solúveis ocorreram na condição de 40°C e pH 6,0, respectivamente 137, 105 e 98 h. Um estudo cinético foi realizado a 40°C e pH 6,0. A cinética da enzima invertase apresentou comportamento previsto pelo modelo de inibição pelo substrato. O modelo de Michaelis-Menten (MM) foi ajustado aos dados experimentais da GOD e o modelo de inibição pelo substrato foi o que melhor se ajustou à cinética da CAT. Os modelos cinéticos propostos serviram para a estimativa das relações enzima/substrato ($m \cdot m^{-1}$) empregadas na produção de ácido glucônico em biorreatores agitado e aerado e airlift. Os ensaios em batelada em biorreator airlift apresentaram eficiências real e global em AG de respectivamente $80,40 \pm 5,70$ % e $103,20 \pm 13,96$ % e conversão de sacarose de $98,86 \pm 0,97$ %; obtidas após 5 h. Um novo ajuste dos parâmetros cinéticos incluindo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) foi realizado com base nos dados experimentais dos ensaios em biorreator airlift. Este mostrou que os modelos Bi-Bi Ping-Pong com ou sem inibição pelo produto responderam de forma satisfatória à tendência dos dados experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: Sacarose, frutose, ácido glucônico, invertase, glicose oxidase, catalase, airlift.

ABSTRACT

The sugarcane sugar (sucrose) is a raw material produced in abundance in Brazil, being attractive to produce high added-value by-products. The gluconic acid (GA) can be obtained by multienzymatic conversion of sucrose, using three enzymes. Invertase, responsible for the inversion of sucrose to glucose and fructose, glucose oxidase (GOD) responsible for the glucose oxidation and catalase (CAT) responsible for decomposition of hydrogen peroxide. In multienzymatic process fructose is obtained as a byproduct, also of great interest to the food, pharmaceutical and chemical industries. In this study, the production of GA from sucrose in airlift reactor is evaluated. Temperature and pH of maximum activity were determined for the enzymes invertase, GOD and CAT, as well as the thermal stability in the absence of substrate. Invertase enzymatic activity was quantified by formation of reducing sugars on a 200 mM sucrose solution at 30 ° C, and pH 4.8. The enzymatic activity of GOD and the CAT were determined by monitoring respectively the formation of H₂O₂ from a solution of glucose 1 g/L, 25°C, pH 5.0 and the decomposition of H₂O₂ from a solution of H₂O₂ 35 mM, 25°C, pH 7.5. Invertase showed maximum activity at 45 °C and pH 5.0; GOD at 55°C and pH 6.0 and CAT at 25 ° C and pH 8.0, respectively. From the activity profiles as a function of temperature and pH, the operational conditions of 50, 45 and 40°C at pH 5.0 and 6.0 were pre-selected for the multienzymatic process. It was found that the best half-lives times of the soluble enzymes, invertase, GOD and CAT, occurred in the condition of 40°C and pH 6.0, respectively 137, 105 and 98 h. A kinetic study was carried out at 40°C and pH 6.0. The kinetics of the enzyme invertase showed a behavior best predicted by the model of substrate inhibition. Michaelis-Menten model (MM) was fitted to experimental data of GOD and substrate inhibition model best predicted the kinetics behavior of CAT. The proposed kinetic models were used to estimate enzyme/substrate ratio (w/w) used in the production of GA in agitated and aerated and airlift bioreactors. On the other hand, in the batch assays conducted in airlift bioreactor were obtained AG real yields of 80.38 ± 5.69% and global yields of 103.20 ± 13.96% and conversion of sucrose of 98.86 ± 0.97%; obtained after 5 h. A new set of kinetic parameters including volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) was based on the experimental data from tests in airlift bioreactor. These showed that Bi-Bi Ping-Pong model both with or without product inhibition correspond satisfactorily to the tendency of the experimental data.

KEYWORDS: Sucrose, fructose, gluconic acid, invertase, glucose oxidase, catalase, airlift.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Representação da interação tripontual do substrato com o sítio ativo da enzima.	29
Figura 1.2 – Esquema das estruturas (A) primária, (B) secundária α -hélice e β -pregueada e (C) terciária e (D) quaternária.	32
Figura 1.3 – Representação do caminho da reação catalisada por enzima e não catalisada em função do nível de energia.....	34
Figura 1.4 – Representação da curva de Michaelis-Menten.....	35
Figura 1.5 – Curva de temperatura em função da atividade enzimática.	37
Figura 1.6 – Curva de pH versus atividade enzimática.	38
Figura 1.7 – Mecanismo cinético Bi-Bi sequencial.....	39
Figura 1.8 – Mecanismo cinético Bi-Bi aleatório.	40
Figura 1.9 – Mecanismo cinético Bi-Bi Ping-Pong.....	40
Figura 1.10 – Mecanismo de inibição reversível competitiva (A), não competitiva (B) e incompetitiva (C).....	41
Figura 1.11 – Gráfico comparativo de Michaelis-Menten clássico sem e com inibição (A) competitiva, (B) não competitiva e (C) incompetitiva.	42
Figura 1.12 – Mecanismo de inibição reversível competitiva.....	43
Figura 1.13 – Mecanismo de inibição reversível não competitiva.	44
Figura 1.14 – Mecanismo de inibição reversível incompetitivo.	46
Figura 1.15 – Mecanismo de inibição pelo substrato.	47
Figura 1.16 – Desenho esquemático dos biorreatores enzimáticos: (a) tanque agitado com enzimas livres, (b) tanque agitado com enzimas livres acoplado com membranas de ultrafiltração, (c) leito fixo com enzimas imobilizadas, (d) leito fluidizado, (e) tanque agitado com membrana, (f) leito fixo com reciclo de alimentação, (g) tanque de membranas com reciclo de alimentação, (h) tanque agitado e aerado com enzimas livres, (i) pneumático com enzimas livres,(j) tanque agitado e aerado com enzimas imobilizadas e (k) pneumático com enzimas imobilizadas.....	51
Figura 1.17 – (A) Reação de oxidação do colesterol pela enzima colesterol oxidase. (B) Reação de oxidação da D-galactose pela ação da enzima galactose oxidase. (C) Reação de oxidação da glicose em ácido glucônico pela ação da enzima glicose oxidase.	52

Figura 1.18 – Desenho esquemático de biorreatores pneumáticos : (A) coluna de bolhas, (B) airlift tipo split, (C) airlift de cilindros concêntricos, (D) airlift de circulação externa.	54
Figura 1.19 – Resistências associadas à dissolução e consumo de oxigênio por uma enzima (E).....	55
Figura 2.1 – Representação da conversão multienzimática sequencial de (A) sacarose em glicose e frutose, (B) glicose em ácido glucônico e (C) decomposição de peróxido de hidrogênio.	62
Figura 2.2 – Representação da influência do pH sob o sítio ativo da invertase e mecanismo da enzima invertase.....	63
Figura 2.3 – Representação do grupo heme prostético.	65
Figura 2.4 – Decomposição do peróxido de hidrogênio em dois estágios.....	65
Figura 2.5 – Perfil eletroforético em condições desnaturantes das enzimas comerciais invertase (I), glicose oxidase (GOD) e catalase (CAT).	70
Figura 2.6 – Estudo do efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade da enzima comercial invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.	71
Figura 2.7 – Estudo do efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade da enzima comercial glicose oxidase de <i>Aspergillus niger</i> . Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.	72
Figura 2.8 – Estudo do efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da CAT comercial de fígado bovino.....	72
Figura 2.9 – Estabilidade da (○) invertase, (■) GOD e (▲) CAT nas condições de (A) 50°C, pH 5,0; (B) 45°C, pH 5,0; (C) 40°C, pH 5,0; (D) 45°C, pH 6,0; (E) 40°C, pH 6,0, na ausência de substrato.	74
Figura 2.10 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (inibição pelo substrato) aos dados experimentais de atividade da invertase em função da concentração de sacarose, a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.	76
Figura 2.11 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (clássico) aos dados experimentais de atividade da GOD em função da concentração de glicose, a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.....	77

Figura 2.12 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (inibição pelo substrato) aos dados experimentais de atividade da CAT em função da concentração de H ₂ O ₂ , a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.	78
Figura 3.1 – Principais derivados do ácido glucônico: (A) gluconato de cálcio, (B) gluconato de ferro, (C) gluconato de cobre, (D) gluconato de zinco, (E) gluconato de manganês e (F) gluconato de sódio.	87
Figura 3.2 – Processo multienzimático de sacarose a AG.	93
Figura 3.3 – Esquema representativo do processo de hidrólise da sacarose em batelada em reator agitado e aerado.	95
Figura 3.4 – Esquema representativo do processo de oxidação da glicose em batelada em reator agitado e aerado com controle de pH.	96
Figura 3.5 – Esquema representativo do sistema experimental utilizado para a produção de ácido glucônico em reator airlift.	98
Figura 3.6 – (A) Geração de glicose a partir de sacarose pela invertase solúvel e (B) consumo de glicose pelo sistema multienzimático GOD/CAT, em ensaios em batelada em reator agitado magneticamente e aerado, a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas.	102
Figura 3.7 – Perfis de concentração de AG (□), ART (●) e sacarose (▲) durante a conversão multienzimática de sacarose em AG durante ensaio em reator batelada em reator agitado magneticamente e aerado, a 40°C e pH 6,0 controlado por pHstato. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas.	104
Figura 3.8 – Perfis de concentração de sacarose (▲), ART (●), AG (□) e concentração de OD (■) do processo multienzimático em reator airlift com alimentação de ar (25 L/min), a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas.	105
Figura 3.9 – Perfis de concentração experimentais de AG (□), ART (●) e sacarose (▲) experimentais obtidos em ensaio em biorreator airlift e simulados pela função “optmin_ga”(—) obtidos no processo de produção de AG, catalisado pelas enzimas invertase, GOD e CAT em reator airlift com alimentação de ar (25 L/min), a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas e as linhas pontilhadas ligam os pontos experimentais.	108
Figura 3.10 – Estudo comparativo entre os ajustes do modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição de substrato para a invertase e CAT, e Bi-Bi Ping-Pong para a GOD (A e B) e	

do modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição de substrato para a invertase e CAT, Bi-Bi Ping-Pong com inibição por produtos para a GOD (C e D) para a conversão multienzimática de sacarose a AG em reator airlift com alimentação de ar (25 L/min), a 40°C e pH 6,0. Valores experimentais: concentrações de AG (□), ART (●), sacarose (▲) e oxigênio (■)..... 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Abreviações e estruturas dos resíduos de 20 (L) aminoácidos.	28
Tabela 1.2 – Classificação das enzimas.....	30
Tabela 1.3 – Biocatalisadores e biorreatores aplicados na indústria.	50
Tabela 2.1 – Tempos de meias-vidas das enzimas Invertase, GOD e CAT.	74
Tabela 2.2 – Parâmetros cinéticos e modelos de MM estimados para invertase, GOD e CAT a 40°C e pH 6,0.....	75
Tabela 3.1 – Propriedades do AG e seus principais derivados.....	88
Tabela 3.2 – Principais patentes de produção de ácido glucônico.	89
Tabela 3.3 – Valores utilizados para os parâmetros da função “optmin_ga”.....	94
Tabela 3.4 – Procedimento experimental da quantificação de glicose pelo Kit enzimático GOD-PAP.....	99
Tabela 3.5 – Procedimento experimental da quantificação de ART.	100
Tabela 3.6 – Produtividade em ácido glucônico (AG).	107
Tabela 3.7 – Parâmetros cinéticos ajustados para os modelos de Michaelis-Menten com inibição por substrato para a invertase e CAT e Bi-Bi Ping-Pong para GOD.....	111
Tabela 3.8 – Parâmetros cinéticos ajustados para os modelos de Michaelis-Menten com inibição de substrato para a invertase e CAT e Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produtos para GOD.	111

SUMÁRIO

<u>INTRODUÇÃO</u>	23
--------------------------------	-----------

<u>CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	27
--	-----------

1 ENZIMAS	27
1.1 PROPRIEDADES FUNDAMENTAIS DAS ENZIMAS	27
1.1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS	30
1.1.2 GRUPOS PROSTÉTICOS	31
1.1.3 ESTRUTURA DAS ENZIMAS.....	31
1.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA	33
1.3 REAÇÕES DE MULTI-SUBSTRATO	38
1.3.1 MECANISMO BI-BI SEQUENCIAL	39
1.3.2 MECANISMO BI-BI ALEATÓRIO	39
1.3.2 MECANISMO BI-BI PING-PONG	40
1.4 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	41
1.4.1 INIBIÇÃO REVERSÍVEL COMPETITIVA	43
1.4.2 INIBIÇÃO REVERSÍVEL NÃO COMPETITIVA	44
1.4.3 INIBIÇÃO REVERSÍVEL INCOMPETITIVA	45
1.4.4 INIBIÇÃO REVERSÍVEL INCOMPETITIVA PELO SUBSTRATO	47
2 CONFIGURAÇÕES DE BIORREADORES	48
2.1 PROCESSOS DE OXIDAÇÃO CATALISADOS POR ENZIMAS.....	52
2.2 BIORREADORES PNEUMÁTICOS	53
2.2.1 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO	54
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

<u>CAPÍTULO 2 – ESTUDO CINÉTICO DAS ENZIMAS INVERTASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, GLICOSE OXIDASE DE <i>Aspergillus niger</i> E CATALASE DE FÍGADO BOVINO</u>	61
--	-----------

1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.1 MATERIAIS	66
2.2 MÉTODOS	66
2.2.1 MEDIDA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM VELOCIDADES INICIAIS	66
2.2.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA	67

2.2.3 PERFIL ELETROFORÉTICO.....	68
2.2.4 EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA	68
2.2.5 ESTABILIDADE	69
2.2.6 ESTUDO CINÉTICO	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1 PERFIL ELETROFORÉTICO	70
3.2 EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA NAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA INVERTASE, GOD E CAT	71
3.3 ESTABILIDADE	73
3.4 CINÉTICA	75
4 CONCLUSÕES	78
5 AGRADECIMENTOS	80
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO..... 87

1 INTRODUÇÃO.....	87
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
2.1 MATERIAIS	91
2.2 MÉTODOS.....	91
2.2.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO.....	91
2.2.2 HIDRÓLISE DA SACAROSE EM REATOR OPERADO EM BATELADA	94
2.2.3 OXIDAÇÃO DA GLICOSE EM REATOR OPERADO EM BATELADA	95
2.2.4 CONVERSÃO DE SACAROSE EM AG EM REATOR OPERADO EM BATELADA.....	96
2.2.5 CONVERSÃO DE SACAROSE EM AG EM REATOR AIRLIFT OPERADO EM BATELADA	97
2.2.6 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	98
2.2.7 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO	99
2.2.8 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)	99
2.2.9 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE.....	100
2.2.10 AJUSTE DE NOVAS EQUAÇÕES CINÉTICAS AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE PRODUÇÃO DE AG EM AIRLIFT.....	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
3.1 ENSAIOS DE HIDRÓLISE DE SACAROSE E OXIDAÇÃO DE GLICOSE EM BATELADA EM REATOR AGITADO E AERADO.....	102
3.3 ENSAIO EM BATELADA PARA A PRODUÇÃO DE AG EM BATELADA EM REATOR AGITADO E AERADO.....	104

3.4 BIOCONVERSÃO DE SACAROSE EM ÁCIDO GLUCÔNICO EM BIORREATOR AIRLIFT OPERADO EM BATELADA	105
3.5 SIMULAÇÃO DA CINÉTICA MULTIENZIMÁTICA E AJUSTE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	108
4 CONCLUSÕES.....	112
5 AGRADECIMENTOS.....	113
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTAS FUTURAS</u>	<u>117</u>

INTRODUÇÃO

O ácido glucônico (AG) é um ácido orgânico resultante da oxidação da glicose. Possui baixa capacidade corrosiva e a boa complexação com íons metálicos, que permite sua aplicação na indústria alimentar, farmacêutica e têxtil (PURANE *et al.*, 2011; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006). O AG pode ser produzido por métodos químicos, eletroquímicos e bioquímicos (rota enzimática ou fermentativa). Os métodos químicos e eletroquímicos apresentam desvantagens do ponto de vista comercial e ambiental, pois exigem altas temperaturas e/ou altas pressões de operação e, muitas vezes, apresentam baixos rendimentos por formação de subprodutos. A via fermentativa se apresenta como uma técnica atraente para a produção de AG, reduzindo a produção de interferentes (SINGH & KUMAR, 2007). Contudo, a biotransformação da glicose em AG por fermentação apresenta uma alta demanda de oxigenação do meio e baixo índice de produtividade, além disso, é necessária a purificação para a separação do AG do mostro, encarecendo o custo de processo.

A aplicação biotecnológica de enzimas proporciona vantagens expressivas em relação aos processos que fazem uso de reações químicas tradicionais. As reações enzimáticas ocorrem em condições amenas, são altamente específicas e apresentam altas taxas de conversão. As enzimas também contribuem para o desenvolvimento sustentável por serem isoladas a partir de microrganismos, recursos renováveis e biodegradáveis. A oxidação da glicose usando como biocatalisadores as enzimas glicose oxidase e catalase tem se mostrado um método muito viável (GODJEVARGOVA, DAYAL & MARINOV, 2003; BANKAR *et al.*, 2011). Como comprovaram Silva, Tomotani e Vitolo (2011), a hidrólise enzimática da sacarose, produzindo glicose e frutose, com sequencial oxidação enzimática da glicose à AG, pode apresentar conversões de 100%. O processo multienzimático oferece a possibilidade da obtenção de maiores produtividades comparado ao processo de produção de AG via fermentação, com menor necessidade de aeração e de substrato, uma vez que não há respiração ou crescimento celular. Como se pode notar, a partir de sacarose é possível obter dois produtos de alto valor agregado, o AG e a frutose, insumos amplamente importados pelo país.

Segundo Ferreira, Rocha e Silva (2009), as principais fontes naturais da sacarose são a beterraba e a cana-de-açúcar, sendo esta última responsável por 70% da produção mundial. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e na avaliação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estima-se que na

safras de 2012/2013 será moído cerca de 595 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, um aumento próximo a 5% em relação à safra anterior (2011/2012). A previsão atual de produção de açúcar na safra 2012/13 é de 37,66 milhões de toneladas, 4,72% a mais que na safra anterior. A União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) afirma que o Brasil responde por um terço da produção mundial de açúcar. Isso se deve ao clima favorável do país, ao avanço das pesquisas nos âmbitos tecnológico, industrial e agrícola, além da prática de preços mais competitivos de mercado, motivos estes que justificam o interesse pela produção de derivados com maior valor agregado.

A frutose ou açúcar da fruta é um monossacarídeo que apresenta poder adoçante 70% maior que a sacarose (CRUZ *et al.*, 1998), atribuindo ao produto com frutose menor poder calórico. Além disso, o processo metabólico de absorção da frutose não requer o uso de insulina, hormônio restrito em diabéticos, que tem por função auxiliar no metabolismo da glicose (fonte de energia). Possui atributos físico-químicos funcionais e atrativos para as indústrias alimentícia e farmacêutica, como o poder umectante, o baixo ponto de solidificação e estabilidade osmótica, atribuindo ao produto industrializado baixa atividade de água, evitando possíveis contaminações microbiológicas (HANOVER & WHITE, 1993; SUGUNAN & SANJAY, 2005). A maior parte de frutose consumida pelo Brasil é importada, sendo obtida a partir da extração da batata da “alcachofra de Jerusalém” (CRESTANI, 2012).

Neste contexto, o presente trabalho visa estudar a bioconversão multienzimática da sacarose para a produção de compostos de maior valor agregado, no caso ácido glucônico e xarope de frutose, em biorreator airlift operado em batelada.

Na realização deste trabalho foi proposta uma organização em capítulos.

No capítulo 1, “REVISÃO BIBLIOGRÁFICA”, conceituou-se as enzimas, descrevendo a cinética enzimática e fatores que a afetam, assim como os mecanismos de catálise enzimática. Em seguida, definiram-se fatores de importância para a escolha do biorreator adequado a cada processo, e conceituaram-se os biorreatores pneumáticos e a transferência de oxigênio que ocorre em meios aerados.

Nos capítulos 2 e 3 que relatam os experimentos e discussão dos mesmos propôs-se a estrutura de um artigo, sendo este dividido em *introdução, materiais e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos e referências bibliográficas*.

No capítulo 2, “ESTUDO CINÉTICO DAS ENZIMAS INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae*, GLICOSE OXIDASE DE *Aspergillus niger* e CATALASE DE FÍGADO BOVINO”, conceituou-se o processo multienzimático de produção de ácido

glucônico e os mecanismos de catálise das enzimas invertase, glicose oxidase e catalase. Na sequência as enzimas envolvidas na multiconversão (invertase, glicose oxidase e catalase) foram caracterizadas em relação às condições de temperatura e pH, que definem máxima atividade, bem como avaliadas suas estabilidades térmicas. A influência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação também foi investigada, possibilitando o ajuste de modelos cinéticos aos dados experimentais.

No capítulo 3, “PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO”, abordaram-se as principais características físico-químicas do ácido glucônico, assim como os relatos da literatura acerca de diferentes vias de produção do ácido glucônico. Em seguida, propôs-se a otimização das concentrações mínimas de biocatalisadores no processo multienzimático utilizando software Scilab[®]. Posteriormente às produções de AG em airlift foi realizado um novo ajuste dos parâmetros cinéticos, incluindo no modelo a etapa de transferência de oxigênio, em software EMSO[®].

Na última parte do texto, “CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTAS FUTURAS”, concluíram-se os principais resultados obtidos por este trabalho e descreveram-se algumas sugestões para continuidade da pesquisa acerca da produção de ácido glucônico.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A primeira parte deste capítulo é uma revisão da literatura acerca das propriedades fundamentais das enzimas como: classificação, estrutura, cinética e inibição. A segunda parte deste capítulo é uma revisão da literatura sobre biorreatores em geral, biorreatores pneumáticos e aspectos gerais da transferência de oxigênio em meios aerados.

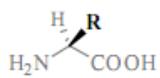
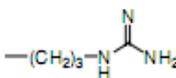
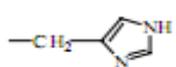
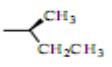
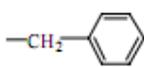
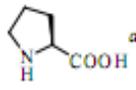
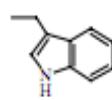
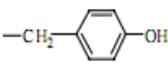
1 ENZIMAS

1.1 PROPRIEDADES FUNDAMENTAIS DAS ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, geralmente de estrutura proteica, que participam de diversas reações químicas. Possuem aplicações em indústrias de alimentos, produtos de limpeza, cosméticos (VILLELA, BACILA & TASTALDI, 1976). O grande interesse no uso das enzimas pode ser explicado por fatores como a variedade de substratos sob os quais atuam, e as reações complexas que as enzimas são capazes de catalisar, em rotas onde a geração de resíduos e subprodutos é reduzida. As enzimas também têm a capacidade de atuar como catalisadoras a altas velocidades em condições de baixa necessidade energética (AEHLE, 2004).

Segundo Tischer e Wedekind (1999), as enzimas são proteínas compostas por cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Os aminoácidos apresentam em sua fórmula química um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH₂) e um radical (R) ou cadeia lateral como também pode ser chamado, que por sua vez pode ter características diversas como ter cadeia polar, alifática, aromática, ácida ou básica, conforme mostra a Tabela 1.1 (ROTHENBERG, 2008). O sítio ativo é a região da enzima onde ocorre a catálise enzimática, formando o complexo enzima-substrato, liberando o produto e deixando a enzima pronta para uma nova catálise. A ligação do substrato ao sítio ativo se dá através de ligações não-covalentes (interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas). Os grupos que participam das ligações são a carboxila do ácido glutâmico ou do ácido aspártico, o grupo amino da lisina, o imidazol da histidina, a hidroxila da serina e assim sucessivamente.

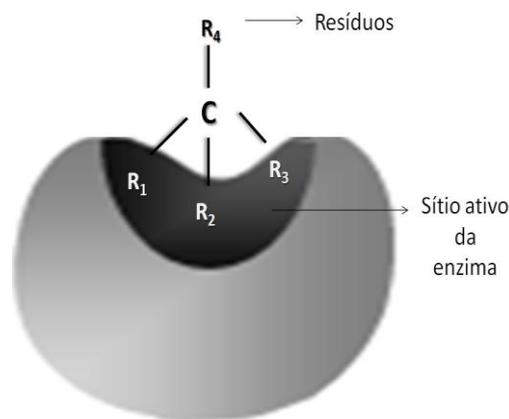
Tabela 1.1 – Abreviações e estruturas dos resíduos de 20 (L) aminoácidos.

Nome	Abreviação com três letras	Abreviação com uma letra		Classificação
Alanina	Ala	A	-CH ₃	Alifático
Arginina	Arg	R		Básico
Asparagina	Asn	N	-CH ₂ CONH ₂	Polar
Ácido aspártico	Asp	D	-CH ₂ COOH	Ácido
Cisteína	Cys	C	-CH ₂ SH	Polar
Glutamato	Glu	E	-CH ₂ CH ₂ COOH	Ácido
Glutamina	Gln	Q	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	Polar
Glicina	Gly	G	-H	Pequeno
Histidina	His	H		Básico
Isoleucina	Ile	I		Alifático
Leucina	Leu	L	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Alifático
Lisina	Lys	K	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	Básico
Metionina	Met	M	-CH ₂ CH ₂ SCH ₃	Alifático
Fenilalanina	Phe	F		Aromático
Prolina	Pro	P		Alifático
Serina	Ser	S	-CH ₂ OH	Polar
Treonina	Thr	T		Polar
Triptofano	Trp	W		Aromático
Tirosina	Tyr	Y		Aromático
Valina	Val	V	-CH(CH ₃) ₂	Alifático

Fonte: ROTHENBERG, 2008.

As estruturas tridimensionais das enzimas permitem um encaixe perfeito do substrato, caracterizando a alta especificidade. Alguns modelos são propostos para explicar a especificidade enzimática. Emil Fischer em 1894 propôs que as enzimas e seus substratos se ajustavam como o modelo “chave e fechadura”, enfatizando que o substrato se encaixava perfeitamente no centro ativo da enzima. Contudo, o modelo afirmava que a enzima possuía uma estrutura rígida, o que não permitia explicar a ação de certas enzimas sobre substratos de elevadas dimensões moleculares e em outros casos a não atuação enzimática sob substratos semelhantes e de menores dimensões moleculares, além de não explicar o porquê de certas enzimas catalisarem a conversão não só dos substratos naturais, como também de outros compostos (NELSON & COX, 2011).

Figura 1.1 – Representação da interação tripontual do substrato com o sítio ativo da enzima.



Fonte: Acervo próprio.

Outro modelo foi então desenvolvido por Koshland Jr. (1958), no qual afirma que há um ajuste induzido na conformação do sítio ativo (Induced-Fit). O modelo proposto considera que estruturas enzimáticas são relativamente flexíveis e que durante a formação do complexo enzima-substrato (ES) a conformação da enzima altera-se sob a influência da estrutura do substrato de modo a englobá-lo. Entretanto, este modelo não explica porque em muitos casos são necessárias certas características estruturais no substrato para que ocorra reação. Outra teoria fora pensada por Dewar (1986), a teoria da solvatação, segundo a qual propõe que o substrato ao entrar no sítio ativo desloca todas as moléculas de água de solvatação do mesmo. Entretanto, substratos menores não poderiam fazer esta remoção, e não poderiam ser catalisados. A teoria mais aceita é a regra da acoplagem tripontual (3-point attachment rule), proposta por Ogston (Figura 1.1). Esta teoria é usada para explicar a

enantioseletividade, ou seja, a capacidade que a enzima tem de diferenciar estereoisômeros (ROTHENBERG, 2008).

1.1.1 Classificação das enzimas

A classificação das enzimas foi organizada pela Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica (IUBMB), dividindo as enzimas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação química que as mesmas catalisam, como mostra a Tabela 1.2. A cada enzima foi atribuído dois nomes e um número de classificação de quatro dígitos que identificam as classes, as subclasses e as sub-subclasses (AEHLE, 2004). O primeiro número designa a qual das seis classes a enzima pertence; o segundo número indica em que tipo de ligação a enzima atua; o terceiro número é uma subclassificação do tipo de ligação; e o quarto número é apenas um número de série (NELSON & COX, 2011).

Tabela 1.2 – Classificação das enzimas.

Número de classe	Classe da enzima	Tipo de reação catalisada	Exemplos
1	Oxidoreduases	Catalisa reações de óxido-redução em que pode haver a transferência de átomos de H, O ou elétrons.	Desidrogenases e oxidases
2	Transferases	Catalisa a transferência de um grupo funcional para outra molécula, como: grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.	Quinases e transaminases
3	Hidrolases	Catalisa reações de hidrólise, a quebra de ligações por adição de água no meio.	Peptidases
4	Liasas	Catalisa a remoção de grupos funcionais a fim da formação de duplas ligações.	Dehidratases e descarboxilases
5	Isomerases	Catalisa rearranjos estruturais de moléculas.	Epimerases
6	Ligases	Catalisa a formação de novas ligações, com quebra de ATP.	Sintetases

Fonte: MOSIER & LADISCH, 2008; NELSON & COX, 2011.

1.1.2 Grupos prostéticos

Algumas enzimas exercem sua atividade catalítica somente em associação com moléculas orgânicas ou inorgânicas de menor conformidade, chamados grupos prostéticos. Estes atuam como transportadores de átomos ou grupos funcionais retirados do substrato em uma dada reação e podem ser coenzimas ou cofatores metálicos.

As coenzimas são moléculas orgânicas derivadas de vitaminas que, podem ser encontradas covalentemente ligadas à enzima (formando uma holoenzima) e em outros casos, a coenzima (livre) une-se à enzima apenas no momento da catálise (NELSON & COX, 2011).

Os metais são classificados em dois grupos: metais de transição (Fe^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+}) e metais alcalinos e alcalinos terrosos (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}). Os metais de transição estão frequentemente envolvidos na catálise devido à sua estrutura eletrônica e os íons metálicos por apresentarem um grande número de cargas positivas na ligação de pequenas moléculas (NELSON & COX, 2011). Os metais de transição atuam como ácido de Lewis, ou seja, são atraídos por pares de elétrons. Os íons metálicos possuem valências que permitem a interação com dois ou mais ligantes, estes cofatores metálicos participam na orientação do substrato ideal para a reação. A fração proteica de uma enzima, na ausência do seu cofator, é chamada de apoenzima, e a enzima ligada ao seu cofator é chamada holoenzima (ROTHENBERG, 2008).

1.1.3 Estrutura das enzimas

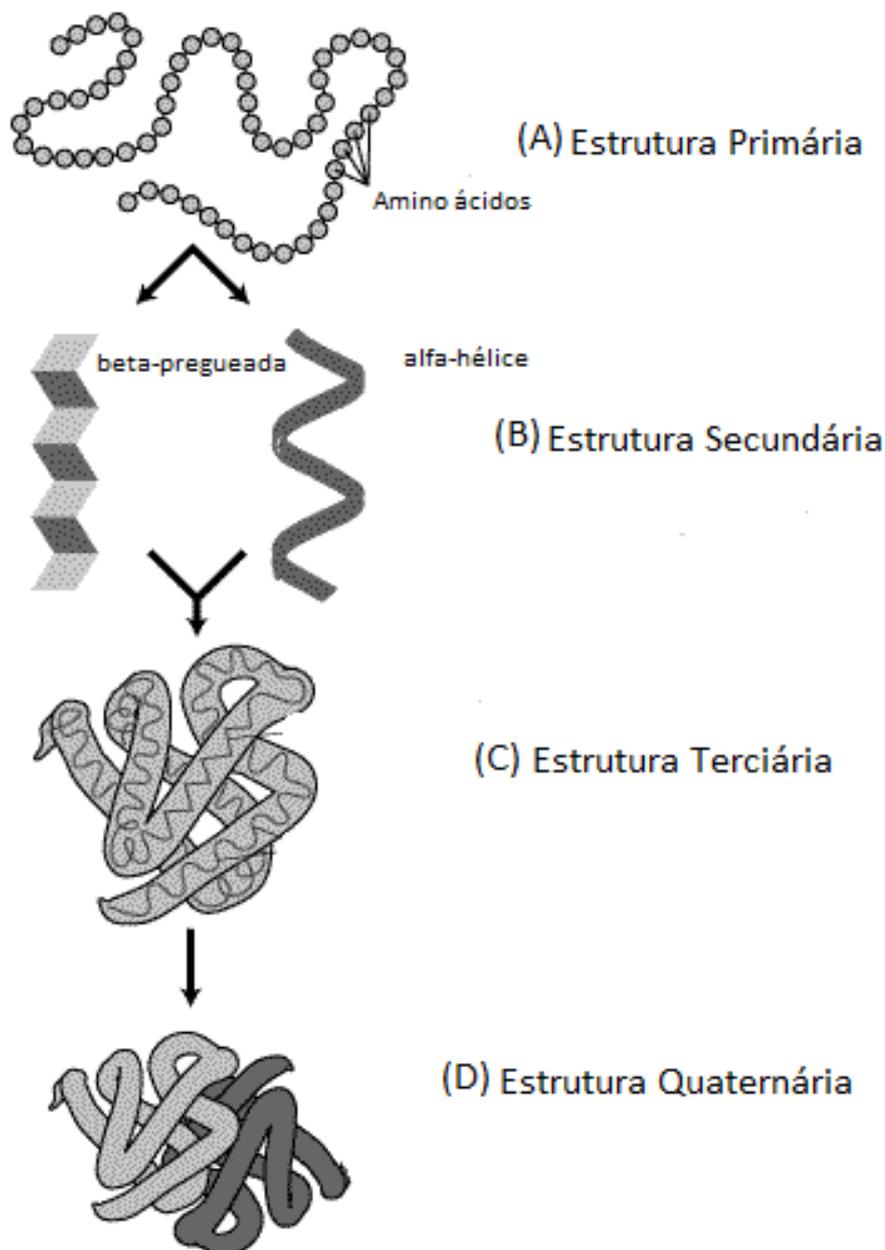
A atividade catalítica das enzimas depende da interação dos resíduos dos aminoácidos entre si e eventualmente entre os grupos prostéticos que podem existir ou não; permitindo a formação de uma cavidade ou fenda de ligação situada na superfície da enzima e denominada de sítio ativo (DIXON & WEBB, 1979; MANAHAN, 2003).

Os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo ficam em regiões distantes da sequência dos aminoácidos (estrutura primária), conferindo a característica do enovelamento da cadeia polipeptídica (estrutura terciária e quaternária) (AEHLE, 2004).

Denomina-se estrutura primária (Figura 1.2 - A) à sequência linear dos aminoácidos constituintes da cadeia ou das cadeias polipeptídicas de uma proteína, formada entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente, evidentemente para cada proteína tem-se uma sequência única de aminoácidos (MANAHAN, 2003; MOSIER & LADISCH, 2008).

Segundo Dixon e Webb (1979), algumas ligações peptídicas e ligações do grupo amina conjuntamente com a formação das ligações de hidrogênio na estrutura proteica tendem a se estabilizar segundo dois modelos estruturais: a α -hélice e a folha β -pregueada, chamados estrutura secundária (Figura 1.2 - B). A α -hélice é formada quando as rotações da estrutura proteica acontecem no mesmo sentido; a folha β -pregueada, quando as rotações têm, alternadamente, sinal contrário. Existem também regiões onde a conformação é irregular.

Figura 1.2 – Esquema das estruturas (A) primária, (B) secundária α -hélice e β -pregueada e (C) terciária e (D) quaternária.



A estrutura terciária é uma conformação tridimensional (Figura 1.2 - C), formada a partir de ligações que se estabelecem entre as cadeias laterais dos resíduos e da interação dessas cadeias com o meio aquoso (MANAHAN, 2003). Essas interações podem ser:

- Ligações de hidrogênio: caso as cadeias laterais possuam grupos amino ou hidroxil;
- Ligações iônicas: cadeias laterais ácidas ou básicas podem transferir prótons, fazendo o íon carboxilato, negativo, e o amônio quaternário, positivo;
- Interações hidrofóbicas: caso haja resíduos com grupos apolares;
- Ligações covalentes (bissulfureto): caso existam grupos de cadeias laterais com átomos de enxofre ligados entre si, como a cisteína.

A estrutura quaternária é composta de diversos blocos proteicos conglomerados (Figura 1.2 - D). As forças que mantêm os monômeros unidos são: interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (MANAHAN, 2003).

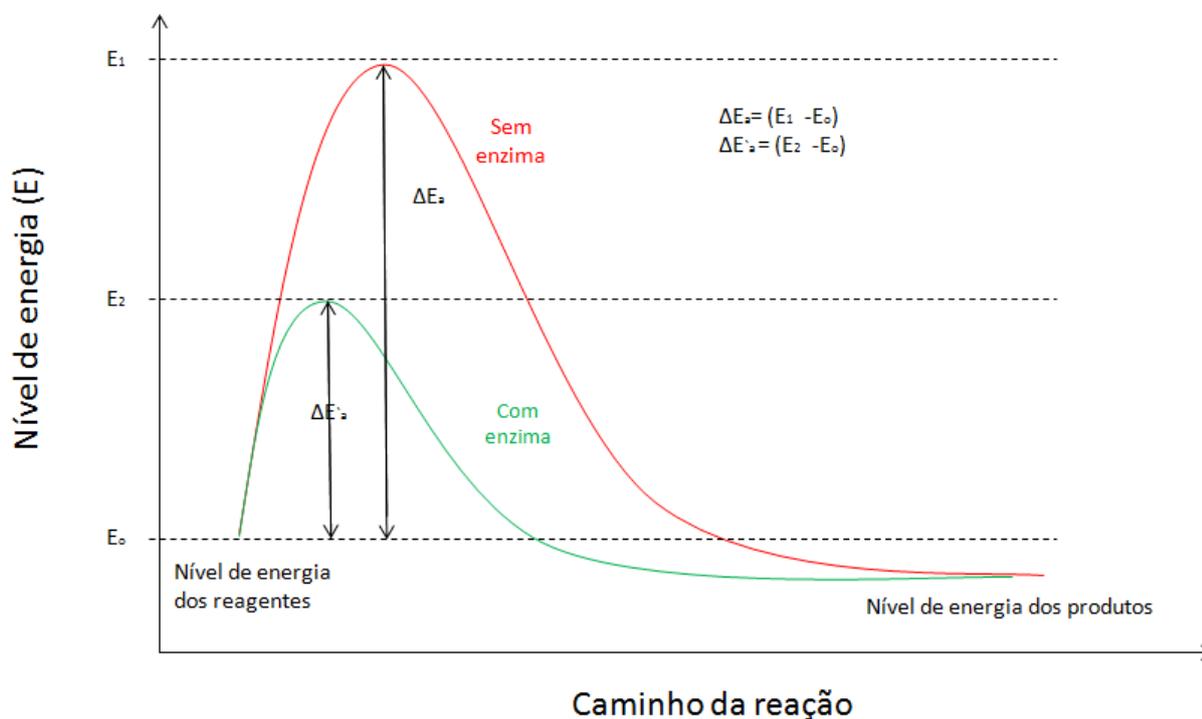
1.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para que uma reação ocorra é necessária certa quantidade de energia, denominada energia de ativação. As enzimas têm a capacidade de reduzir a energia de ativação (Figura 1.3), requerendo menos energia para converter cada substrato em produto. Portanto, a reação catalisada por uma enzima é mais rápida.

A cinética enzimática estuda como a velocidade da reação enzimática é afetada por condições físicas e químicas, fornecendo os parâmetros que caracterizam as enzimas como a velocidade máxima e a concentração de substrato ideal. As condições que podem influenciar a velocidade da catálise são: temperatura, pH, concentração da enzima, concentração de substrato e presença de quaisquer ativadores ou inibidores (DIXON & WEBB, 1979; MOSIER & LADISCH, 2009).

A atividade é uma medida relativa da capacidade de uma enzima catalisar uma reação sob um determinado conjunto de condições. Uma unidade de atividade (U) é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de produto por minuto. A atividade específica é expressa em atividade por miligrama de proteína (U/mg) (VILLELA, BACILA & TASTALDI, 1976).

Figura 1.3 – Representação do caminho da reação catalisada por enzima e não catalisada em função do nível de energia.



Fonte: Acervo próprio.

Em 1913, os bioquímicos Leonor Michaelis e Maud Leonola Menten, com base no trabalho do químico francês Victor Henri, propuseram um mecanismo para explicar a dependência da velocidade de reação catalisada por enzimas em relação à concentração de substrato (DIXON & WEBB, 1979). Este mecanismo preconiza que em uma primeira etapa o substrato (em excesso) e a enzima reagem reversivelmente para formar o complexo enzima-substrato (ES) e na segunda etapa ocorre o rompimento do complexo formando o produto (P) e a enzima livre (E), de acordo com a Equação 1.1:

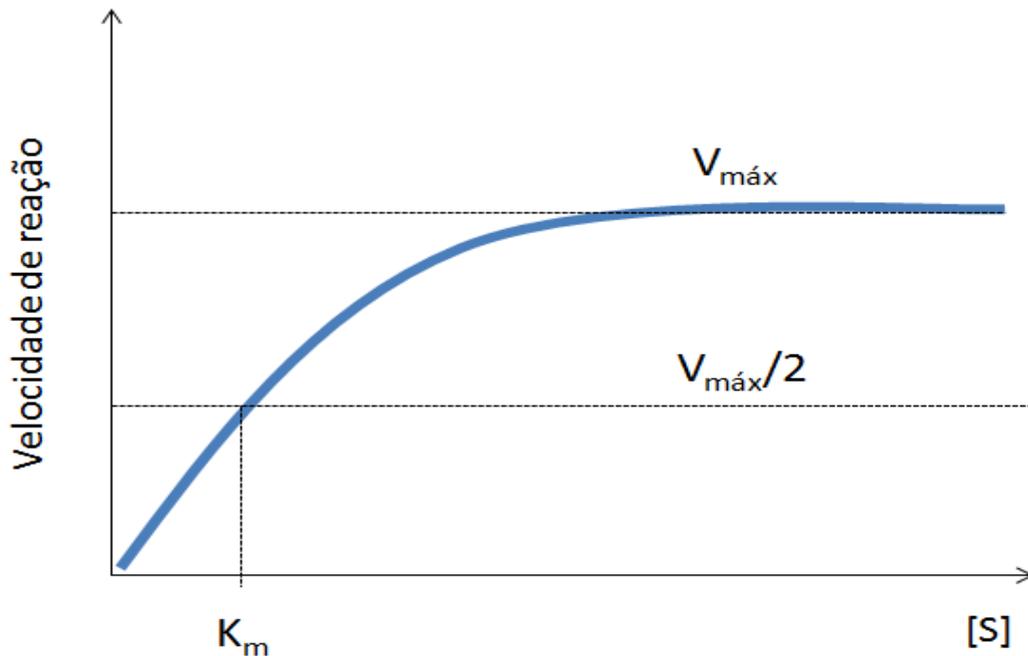


Onde: k_1 , k_{-1} e k_2 , representam as constantes de velocidades e a seta dupla na primeira etapa denota a reversibilidade da formação do complexo (ES). k_2 representa o número de turnover que determina o número máximo de moléculas de substrato convertido em produto por molécula de enzima por unidade de tempo (VILLELA, BACILA & TASTALDI, 1976; DIXON & WEBB, 1979).

Michaelis e Menten (1913) consideraram que a concentração de substrato é muito maior que a concentração de enzima, portanto, a constante (k_2) de dissociação do complexo (ES) é muito pequena em comparação à k_1 e à redissociação k_{-1} . Também

consideraram que a concentração total de enzima era constante durante a catálise e igual à soma da concentração do complexo enzima-substrato e da concentração de enzima livre.

Figura 1.4 – Representação da curva de Michaelis-Menten.



Fonte: Acervo próprio.

O trabalho de Michaelis e Menten foi ampliado por Bridgs e Haldane que propuseram a hipótese do equilíbrio (1925), afirmando que a velocidade mais baixa pode ser medida quando se toma o estado estacionário para a formação e decomposição do complexo (ES), tal como é demonstrado abaixo (DIXON & WEBB, 1979; DUTTA, 2008):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E][S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] = 0 \quad (1.2)$$

Assume-se que a concentração do complexo (ES) é relativamente pequena e constante, ou seja, que as velocidades de consumo e produção do complexo são iguais, logo:

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (1.3)$$

Sabe-se que a concentração total de enzima no meio é dada pelo balanço de massa:

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (1.4)$$

Substituindo a Equação 1.3 na Equação 1.4, temos as equações 1.5 e 1.6:

$$[E]_0 = [E] + \frac{k_1 \cdot [E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (1.5)$$

$$[E]_0 = [E] \cdot \left(\frac{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}{k_{-1} + k_2} \right) \quad (1.6)$$

então,

$$[E] = \frac{k_1 \cdot \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \right) \cdot [E]_0 \cdot [S]}{(k_1 + k_2)} \quad (1.7)$$

A velocidade de formação do produto é proporcional à k_2 e à concentração do complexo (ES), tal como é demonstrado a seguir:

$$v = k_2 \cdot [ES] \quad (1.8)$$

$$v = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]} \quad (1.9)$$

$$v = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) + [S]} \quad (1.10)$$

A constante de Michaelis-Menten (K_m) indica a concentração de substrato que define uma velocidade igual à metade da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e é dada pela Equação 1.11, quando $k_{-1} \gg k_2$:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (1.11)$$

Assim a Equação de Michaelis-Menten é dada por:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.12)$$

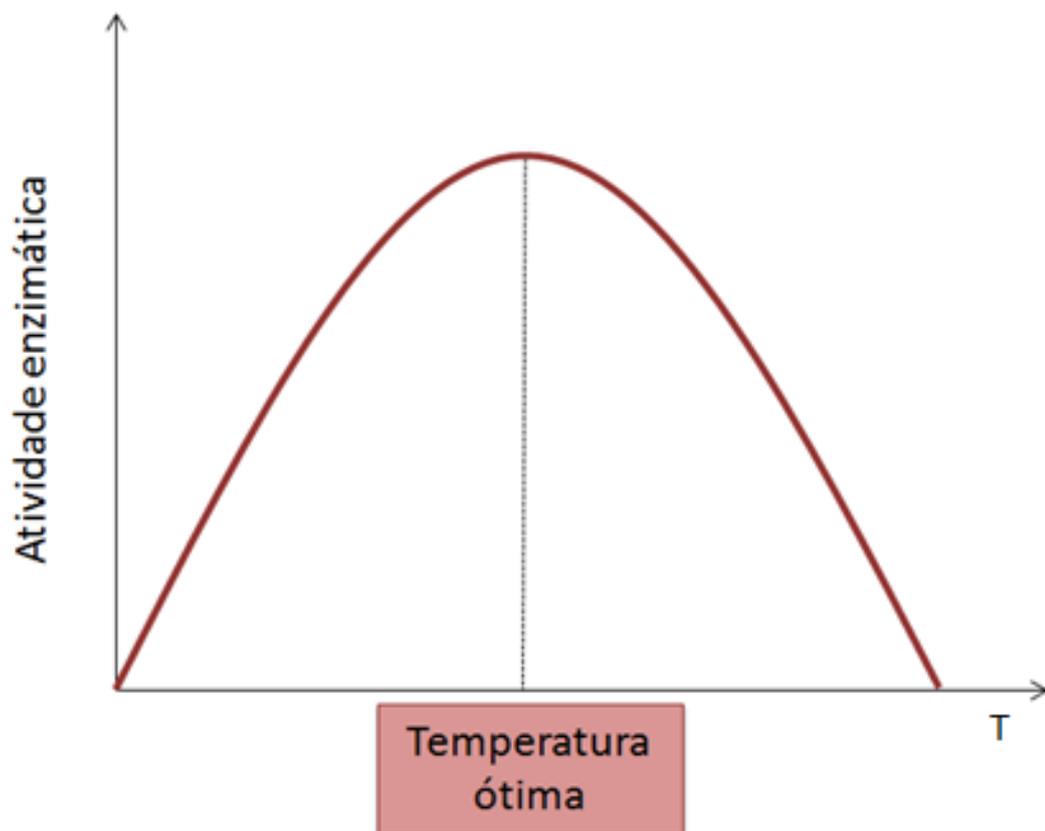
Uma enzima tem por principal finalidade aumentar a velocidade de reação e para isso os biocatalisadores diminuem a energia de ativação da mesma (DUTTA, 2008). No entanto, com o aumento da energia interna (temperatura) a reação está mais suscetível a alcançar o estado energético necessário para que a reação prossiga, favorecendo as reações endotérmicas (AEHLE, 2004). Com isso, a relação de atividade enzimática e aumento de temperatura seria parecida como em qualquer outra reação, obedecendo à relação de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (1.13)$$

Contudo, sabe-se que é limitada a capacidade da enzima de aumentar sua atividade em função do gradiente de temperatura, por causa de um processo conhecido como

inativação térmica. Este processo pode ser reversível, com a enzima voltando à atividade catalítica nas condições ideais de operação, ou irreversível (DUTTA, 2008). Normalmente a inativação reversível é resultado da desnaturação parcial da enzima, enquanto a inativação irreversível acontece em decorrência da agregação ou precipitação da mesma. Constata-se que tanto há um incremento da velocidade de reação com o aumento da temperatura quanto a perda de atividade devido à inativação térmica (Figura 1.5), existindo assim, a necessidade de equilibrar estas condições para o uso do biocatalisador (AEHLE, 2004).

Figura 1.5 – Curva de temperatura em função da atividade enzimática.

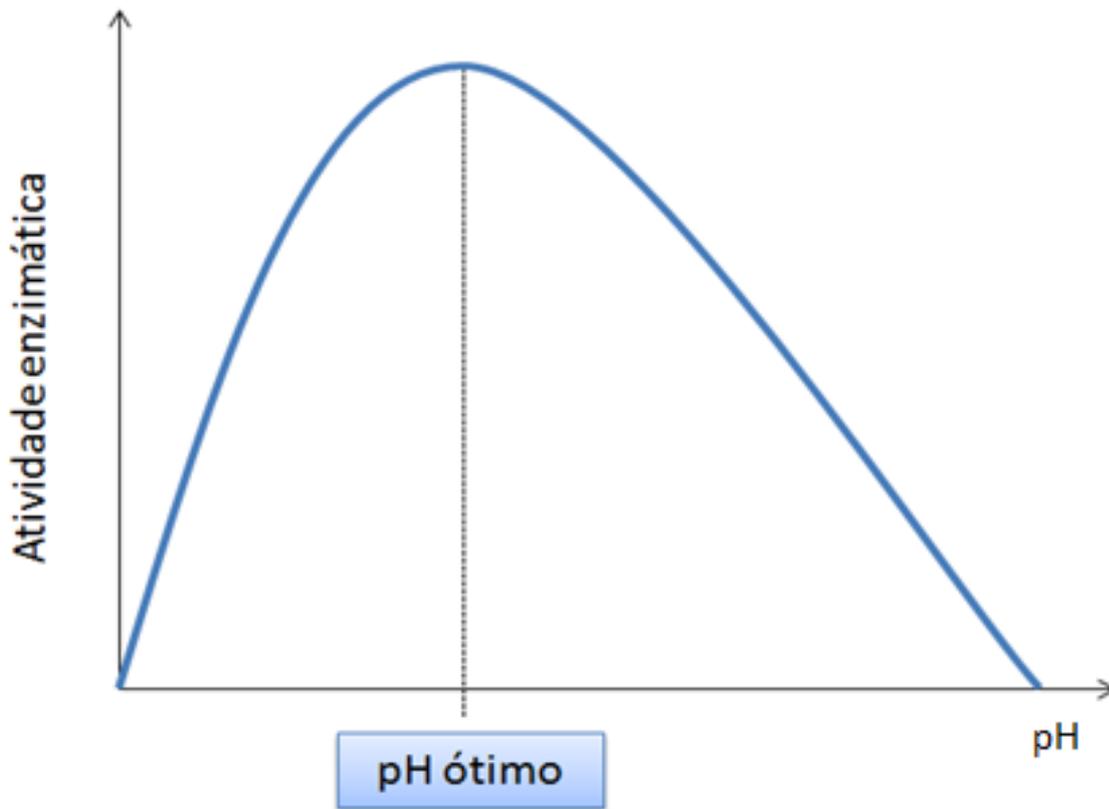


Fonte: Acervo próprio.

As enzimas geralmente possuem uma temperatura ótima bastante similar à temperatura de seu ambiente natural. Assim, enzimas provenientes de mamíferos tendem a ter uma temperatura ótima de aproximadamente 37°C , isto é, a temperatura corporal (AEHLE, 2004). Contudo, todas as enzimas têm um tempo de meia-vida, tempo em que sua atividade decai pela metade da inicial, mesmo em sua condição ótima. Logo, é importante conhecer as condições ótimas do biocatalisador a ser utilizado, assim como seu tempo de meia-vida, para

garantir que a atividade enzimática está se mantendo alta ao longo do tempo necessário para a conversão.

Figura 1.6 – Curva de pH versus atividade enzimática.



Fonte: Acervo próprio.

Outra condição que pode afetar a velocidade de uma reação enzimática é o estado de ionização do meio reacional. As interações iônicas ajudam a estabelecer a conformação da enzima, assim como de seu sítio ativo. Portanto, o estado de ionização dos grupos laterais será afetado em diferentes condições de pHs, podendo levar à interrupção dessas forças e modificando e/ou desnaturando a estrutura proteica. Em outros casos, a força iônica do meio afeta a ligação entre apoenzima e coenzima, assim como pode modificar o estado de ionização do substrato (AEHLE, 2004). Como resultado, todas as enzimas têm um pH em que operam com máxima atividade, chamado pH ótimo (Figura 1.6).

1.3 REAÇÕES DE MULTI-SUBSTRATO

A maioria das reações bioquímicas não envolve um único substrato e sim dois ou três substratos que normalmente geram múltiplos produtos. A Equação de Michaelis-Menten continua válida para reações múltiplas, porém a complexidade aumenta. Quando a

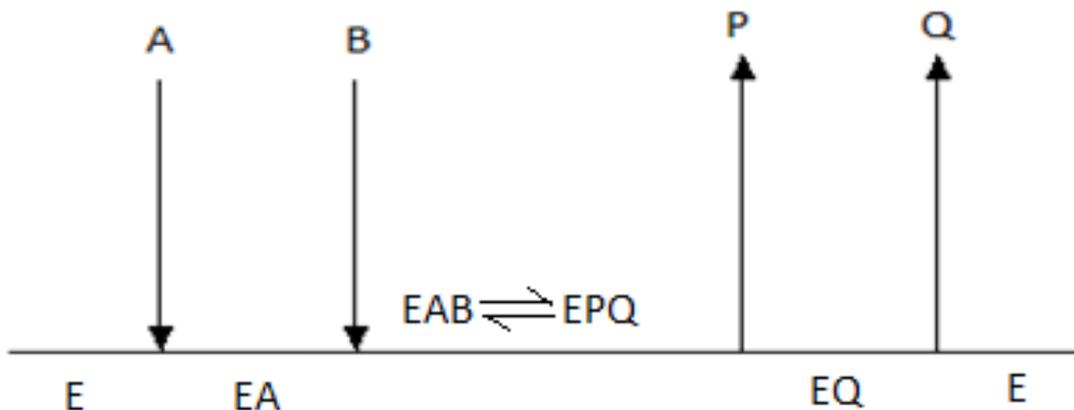
enzima se liga a dois ou mais substratos, a ordem em que isso se realiza determina o mecanismo da reação (DIXON & WEBB, 1979; MOSIER & LADISCH, 2009).

Segundo Mosier e Ladisch (2009), quando a liberação do(s) produto(s) ocorre somente após ambos os substratos estarem ligados ao sítio ativo da enzima, o mecanismo é dito Bi-Bi sequencial. Existem casos em que a formação do(s) produto(s) acontece indeterminadamente e em qualquer ordem de substratos; esse mecanismo reacional é chamado Bi-Bi aleatório (ILLANES, 2008). Em outros casos quando a enzima carrega parte do substrato após a catálise o mecanismo é conhecido como Bi-Bi Ping-Pong.

1.3.1 Mecanismo Bi-Bi sequencial

Neste mecanismo, um substrato (A) deve se ligar primeiro à enzima e só depois um segundo substrato (B) se liga (ILLANES, 2008).

Figura 1.7 – Mecanismo cinético Bi-Bi sequencial.



Fonte: Acervo próprio.

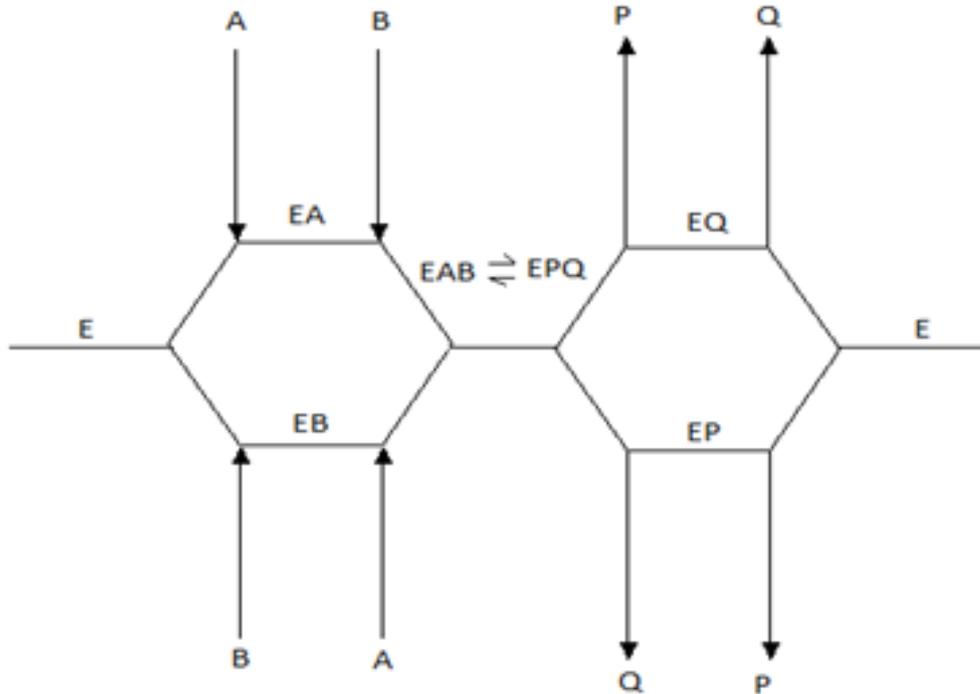
Na Figura 1.7 está representado o mecanismo Bi-Bi sequencial, onde complexo enzima-substrato e enzima livre estão mostrados pelas linhas horizontais e adições sucessivas de substratos e de liberação dos produtos são indicados por verticais. Este mecanismo é frequentemente observado em reações desidrogenase, catalisada pela enzima lactato desidrogenase, quando o NAD^+ age como o segundo substrato (DIXON & WEBB, 1979).

1.3.2 Mecanismo Bi-Bi aleatório

Basicamente este mecanismo assume que os substratos se ligam à enzima aleatoriamente, podendo ser o substrato A ou B por primeiro, e a geração de produtos também

é independente (Figura 1.8). A fosforilação da glicose pelo ATP, catalisada pela hexoquinase, é um exemplo de um mecanismo aleatório (DIXON & WEBB, 1979).

Figura 1.8 – Mecanismo cinético Bi-Bi aleatório.

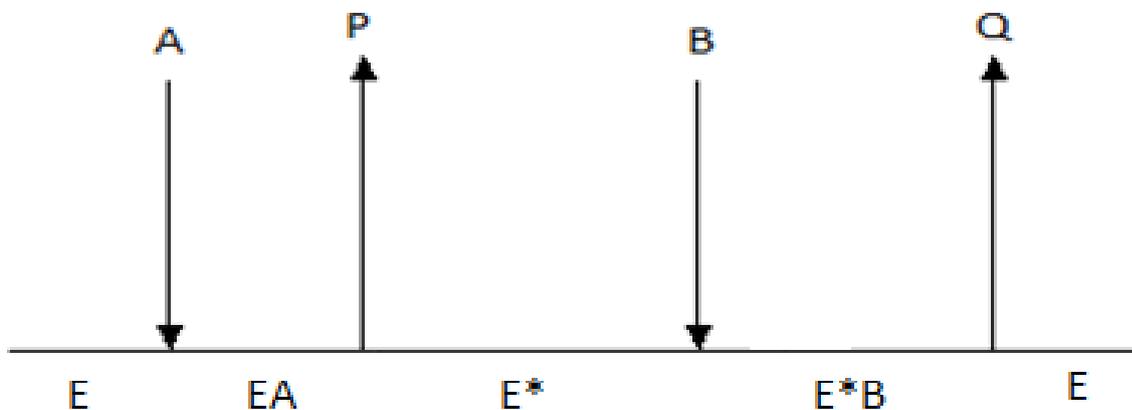


Fonte: Acervo próprio.

1.3.2 Mecanismo Bi-Bi Ping-Pong

Neste mecanismo a enzima (E) se liga ao substrato (A), liberando o produto (P) e formando um intermediário da enzima (E*), que transporta um fragmento de substrato (A). Para a regeneração da enzima é necessário que a enzima (E*) se ligue a um segundo substrato (B), liberando o produto (Q), conforme demonstra a Figura 1.9.

Figura 1.9 – Mecanismo cinético Bi-Bi Ping-Pong.



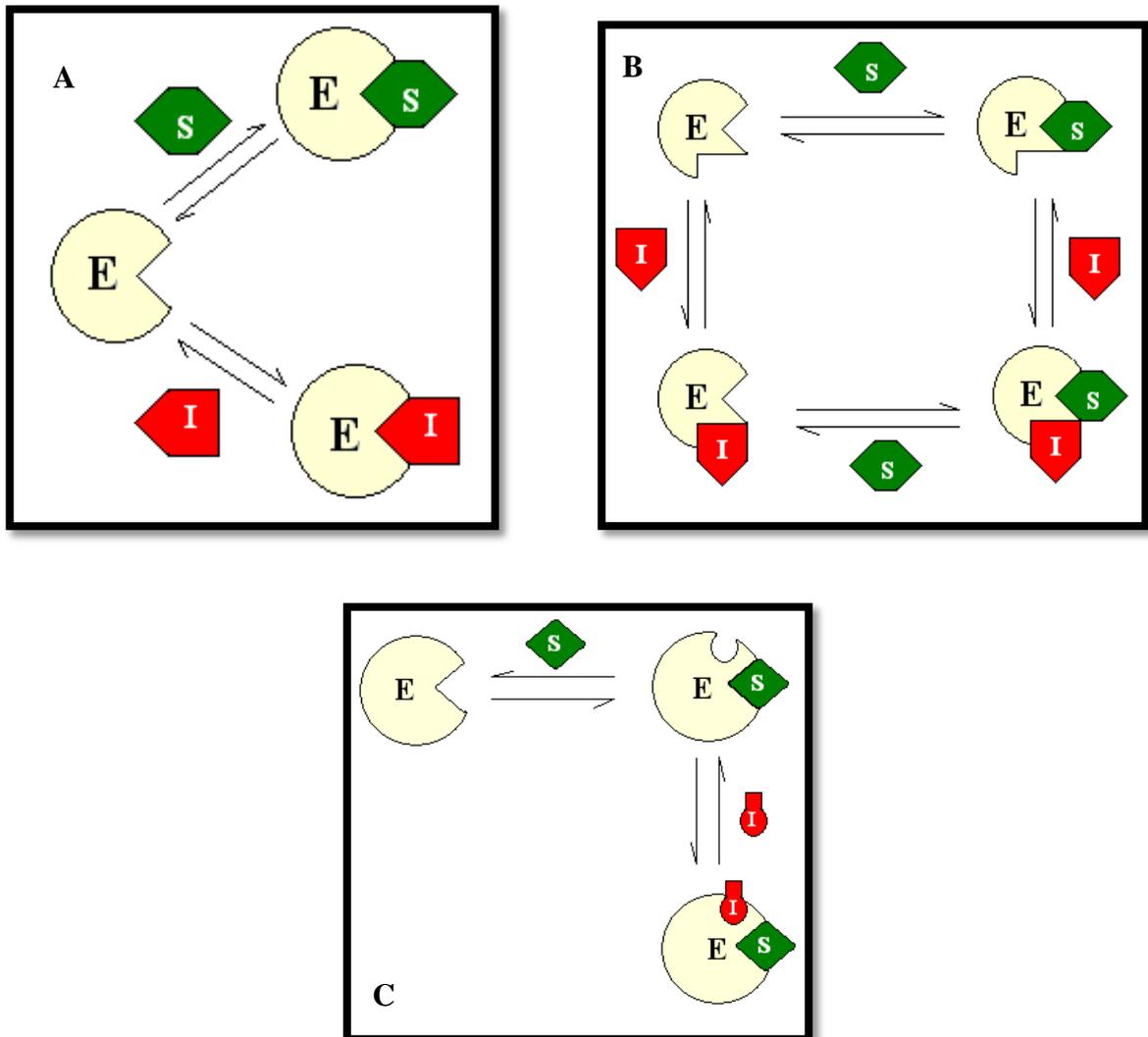
Fonte: Acervo próprio.

Aminotransferases usam este mecanismo. Por exemplo, a aspartato aminotransferase catalisa a transferência de um grupo amino do aspartato para 2-oxoglutarato para formar oxaloacetato e glutamato (DIXON & WEBB, 1979; ILLANES, 2008).

1.4 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Segundo Nelson & Cox (2011), a inibição enzimática é ação de interferentes (inibidores) na formação de produtos levando à diminuição ou interrupção da catálise enzimática. O inibidor (I) pode se ligar ao sítio catalítico da enzima (E) ou ao complexo enzima-substrato (ES). A inibição pode ser reversível ou irreversível.

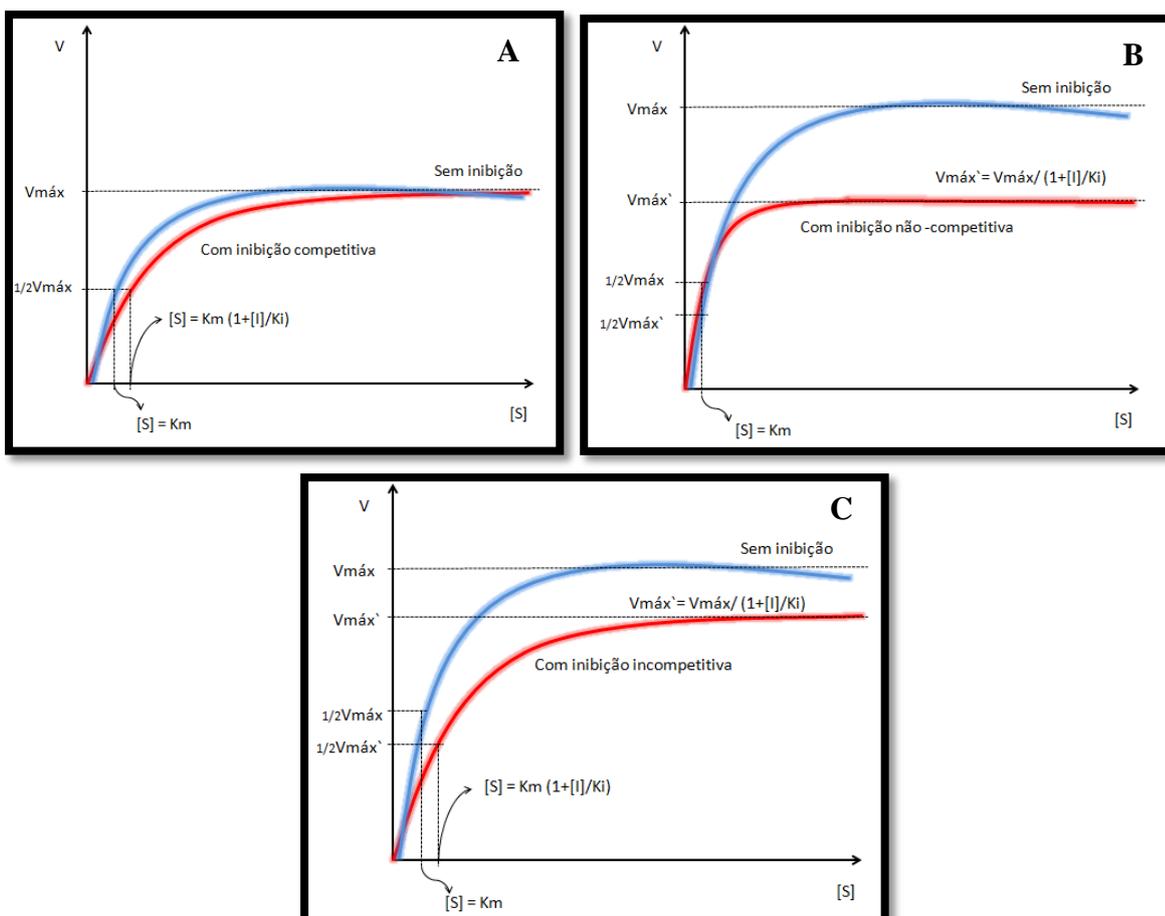
Figura 1.10 – Mecanismo de inibição reversível competitiva (A), não competitiva (B) e incompetitiva (C).



Inibição irreversível acontece quando o inibidor (substância tóxica) se liga covalentemente ao sítio ativo da enzima, bloqueando o local e inativando a enzima permanentemente. A cinética de Michaelis-Menten não pode ser aplicada à inibição irreversível, pois não há formação do produto (NELSON & COX, 2011). Em contraste, a inibição reversível envolve a ligação não-covalente do inibidor na enzima, reduzindo temporariamente a atividade enzimática (Figura 1.10). Existem três mecanismos pelos quais os inibidores diminuem a velocidade de formação do produto; competitivo, não competitivo e incompetitivo (DIXON & WEBB, 1979; DUTTA, 2008).

A Figura 1.11 resume os efeitos causados sobre K_m e $v_{máx}$ para cada tipo de inibição competitiva, não competitiva e incompetitiva.

Figura 1.11 – Gráfico comparativo de Michaelis-Menten clássico sem e com inibição (A) competitiva, (B) não competitiva e (C) incompetitiva.

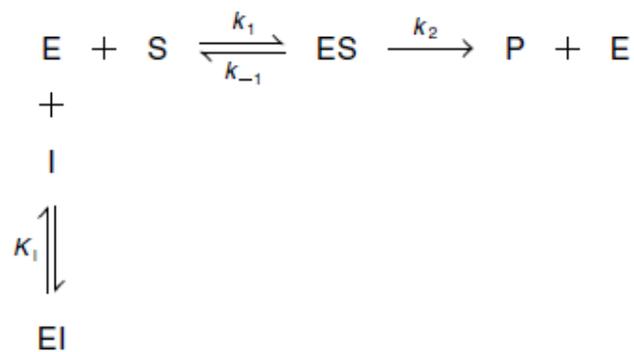


Fonte: Acervo próprio.

1.4.1 Inibição reversível competitiva

Para a inibição reversível competitiva, tanto o substrato (S) quanto o inibidor (I) competem pelo sítio catalítico. A molécula inibidora apresenta estrutura semelhante ao substrato da enzima, por isso, pode se ligar ao sítio ativo. No mecanismo competitivo (Figura 1.12) existe a formação do complexo enzima-inibidor (EI), contudo a catálise não é realizada com o inibidor (MOSIER & LADISCH, 2009).

Figura 1.12 – Mecanismo de inibição reversível competitiva.



Fonte: Acervo próprio.

Conforme demonstrado por Dutta (2008), o efeito da inibição modifica a constante de Michelis-Menten (K_m), como demonstra o gráfico da Figura 1.11- A, porém a velocidade máxima não é alterada, tal qual é demonstrado pelo equacionamento a seguir:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (1.14)$$

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (1.15)$$

Dividindo a Equação 1.15 pela Equação 1.14 tem-se a Equação 1.16:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_2 \cdot [ES]}{[E] + [ES] + [EI]} \quad (1.16)$$

Substituindo as equações 1.17, 1.18 e 1.19 na Equação 1.16:

$$K_m = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (1.17)$$

$$K_i^{comp} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \quad (1.18)$$

$$v_{m\acute{a}x} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (1.19)$$

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [ES]}{[E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][I]}{K_i^{comp}}} \quad (1.20)$$

Ajustando a Equação 1.20:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [ES]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i^{comp}}\right) + [S]} \quad (1.21)$$

Em que K_m^{app} é a constante de Michaelis-Menten aparente:

$$K_m^{app} = K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i^{comp}}\right) \quad (1.22)$$

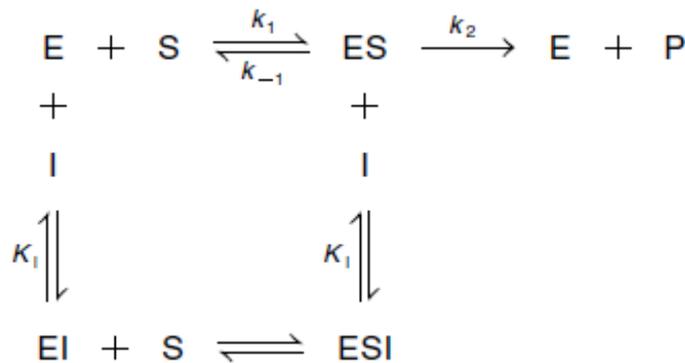
Ajustando a Equação 1.22:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [ES]}{K_m^{app} + [S]} \quad (1.23)$$

1.4.2 Inibição reversível não competitiva

Segundo Mosier & Ladisch (2009), um inibidor reversível não-competitivo pode se ligar ao sítio catalítico da enzima ou ao complexo enzima-substrato, formando respectivamente os complexos inativos enzima-inibidor e enzima-substrato-inibidor, o que torna o processo catalítico ineficiente (Figura 1.13).

Figura 1.13 – Mecanismo de inibição reversível não competitiva.



Fonte: Acervo próprio.

O inibidor não-competitivo inibe a formação do complexo (ES) devido à formação dos complexos EI e ESI. Este efeito modifica a velocidade máxima da reação e não a constante de Michaelis-Menten, como mostra o gráfico da Figura 1.11 – B e segue o equacionamento abaixo demonstrado por Dutta (2008):

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (1.24)$$

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (1.25)$$

Dividindo a Equação 1.25 pela Equação 1.24 tem-se a Equação 1.26:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_2 \cdot [ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]} \quad (1.26)$$

Substituindo as equações 1.27, 1.28, 1.29 e 1.30 na Equação 1.26:

$$K_m = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (1.27)$$

$$K_i^{n\grave{a}o-comp} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \quad (1.28)$$

$$K_i^{n\grave{a}o-comp'} = \frac{[ES] \cdot [I]}{[EIS]} \quad (1.29)$$

$$v_{m\acute{a}x} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (1.30)$$

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[I] \cdot [S]}{K_i^{n\grave{a}o-comp}} + \frac{K_m \cdot [I]}{K_i^{n\grave{a}o-comp}'}} \quad (1.31)$$

Supondo que haja a mesma afinidade do inibidor tanto para o complexo ES quanto para a E, ou seja, $K_i^{n\grave{a}o-comp}$ igual a $K_i^{n\grave{a}o-comp'}$, ajustando a Equação 1.31, temos:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [ES]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i^{n\grave{a}o-comp}}\right) (K_m + [S])} \quad (1.32)$$

Em que $v_{m\acute{a}x}^{app}$ é a velocidade máxima aparente é dada:

$$v_{m\acute{a}x}^{app} = \frac{v_{m\acute{a}x}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i^{n\grave{a}o-comp}}\right)} \quad (1.33)$$

Ajustando a Equação 1.32:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}^{app} \cdot [ES]}{k_m + [S]} \quad (1.34)$$

1.4.3 Inibição reversível incompetitiva

Segundo Dutta (2008), um inibidor incompetitivo não se liga à enzima livre, nem interfere na ligação entre enzima e substrato; o inibidor se liga exclusivamente ao complexo enzima-substrato (Figura 1.14).

Em que $v_{m\acute{a}x}^{app}$ é a velocidade máxima aparente é dada por:

$$v_{m\acute{a}x}^{app} = \frac{v_{m\acute{a}x}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i^{incomp}}\right)} \quad (1.43)$$

E a que K_m^{app} é a constante de Michaelis-Menten aparente:

$$K_m^{app} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i^{incomp}}\right)} \quad (1.44)$$

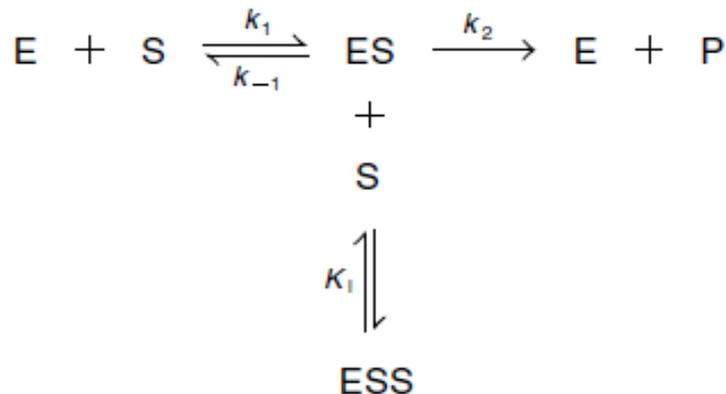
Ajustando a Equação 1.42:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}^{app} \cdot [S]}{K_m^{app} + [S]} \quad (1.45)$$

1.4.4 Inibição reversível incompetitiva pelo substrato

A atividade enzimática também pode ser regulada por seus substratos e/ou produtos. A inibição pelo substrato é conhecida como uma inibição por excesso de substrato, quando um segundo substrato se liga ao complexo (ES), formando o complexo (ESS); este mecanismo é o mesmo que para a inibição incompetitiva, porém o inibidor é a segunda molécula de substrato (Figura 1.15), conforme mostra o equacionamento a seguir (MOSIER & LADISCH, 2009).

Figura 1.15 – Mecanismo de inibição pelo substrato.



Fonte: Acervo próprio.

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESS] \quad (1.46)$$

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (1.47)$$

Dividindo a Equação 1.47 pela Equação 1.46 tem-se a Equação 1.48:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_2 \cdot [ES]}{[E] + [ES] + [ESS]} \quad (1.48)$$

$$K_m = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (1.49)$$

$$K_i^{subst} = \frac{[ES] \cdot [S]}{[ESS]} \quad (1.50)$$

$$v_{m\acute{a}x} = k_2 \cdot [E]_0 \quad (1.51)$$

Substituindo as equações 1.49, 1.50 e 1.51 na Equação 1.48, temos a Equação 1.52:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S] \cdot [S]}{K_i^{subst}}} \quad (1.52)$$

Ajustando a Equação 1.52:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i^{subst}}} \quad (1.53)$$

2 CONFIGURAÇÕES DE BIORREATORES

Biorreatores ou reatores bioquímicos são equipamentos nos quais ocorrem reações químicas intermediadas por biocatalisadores: enzimas ou células (CHISTI & MOO-YOUNG, 1989). A escolha do biorreator pode ter um impacto significativo no desempenho global do processo, por isso alguns objetivos devem ser definidos previamente (OKAFOR, 2007). A seleção do tipo do biorreator enzimático depende de uma análise criteriosa de fatores como (NAJAFPOUR, 2007):

- (a) Forma da enzima – solúvel ou imobilizada;
- (b) Natureza do substrato – solução, sólidos em suspensão ou coloidal;
- (c) Requisitos operacionais da reação – controle de pH ou temperatura;
- (d) Cinética da reação – inibição por substrato, produto ou ambos;
- (e) Superfície catalítica por unidade de volume de reator, no caso de catalisador insolubilizado;
- (f) Características de transferência de massa;
- (g) Necessidade de aeração e/ou agitação;
- (h) Facilidade e necessidade de substituição e regeneração do biocatalisador;
- (i) Facilidade de construção;
- (j) Custo de fabricação.

Os reatores enzimáticos podem operar nos modos descontínuo, contínuo ou semicontínuo (bateladas alimentadas) (OKAFOR, 2007). Os processos descontínuos com enzimas solúveis possuem desvantagens, já que as enzimas solúveis são instáveis e de difícil recuperação, conduzindo a uma baixa produtividade. Dentre as muitas estratégias para a estabilização de enzimas, a imobilização é a mais relevante (NAJAFPOUR, 2007). Com o uso de enzimas imobilizadas, o biocatalisador pode ser recuperado e reutilizado até a inativação. Apesar das vantagens de processos contínuos com enzimas imobilizadas, a indústria tem relutado para adotá-los, pois a imobilização de enzimas pode acarretar em redução da atividade enzimática e problemas com a limitação difusional (transferência de massa). Além disso, o custo com o procedimento de imobilização e com controle do processo deve ser repassado ao produto final (GUISÁN, 2006). A Tabela 1.3 apresenta importantes biorreações industriais e os tipos de biorreatores empregados nesses processos.

Várias configurações de reatores foram propostas para processos enzimáticos (Figura 1.16). Operações com enzimas solúveis na maioria dos casos são realizadas em batelada em reatores tipo tanque agitado em que se permite o controle de pH, temperatura, homogeneização e aeração (OKAFOR, 2007).

Para reações com enzimas imobilizadas em reatores de tanques agitados é necessário incluir um dispositivo para a retenção do biocatalisador. Normalmente é utilizada uma tela de aço inoxidável no fundo do reator ou sistemas de ultrafiltração (UF) *in-situ* ou *ex-situ* (REHM & REED, 1993).

Existem também os reatores de recirculação, em que a enzima é empacotada num leito no biorreator e o meio reacional é recirculado passando por um tanque anexo até o ponto de máxima conversão. Este tipo de reator é aplicado para reações em que se exige o controle do pH, como na produção de ácidos orgânicos, uma vez que a mudança de pH é controlável na câmara de recirculação, a enzima não entra em contato direto com o ácido ou com a base (utilizados no controle do pH), contudo para produções de baixo tempo de residência.

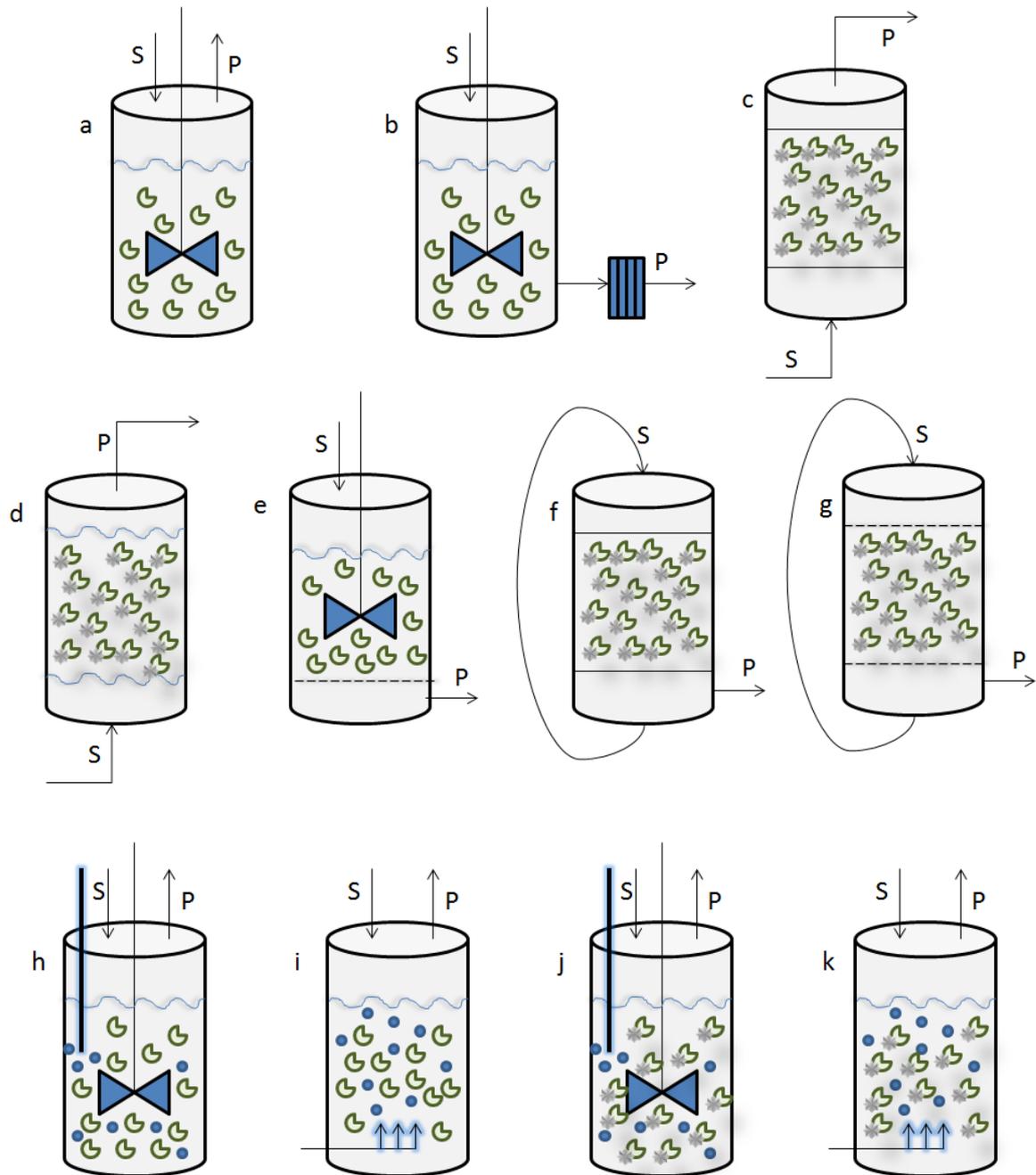
Para operações contínuas com enzimas imobilizadas os reatores mais utilizados são os de leito fixo, em que a enzima imobilizada é fixada no interior do reator, enquanto a corrente contendo o substrato passa através do reator (OKAFOR, 2007; NAJAFPOUR, 2007). Outra opção é o reator de leito fluidizado, em que as partículas de enzimas são retiradas do equilíbrio dinâmico entre a força da gravidade e as forças de arraste promovidas pelo fluxo ascendente do substrato (OKAFOR, 2007; NAJAFPOUR, 2007).

Tabela 1.3 – Biocatalisadores e biorreatores aplicados na indústria.

Reação/biocatalisador	Biorreator	Finalidade
Hidrólise da lactose em glicose e β -galactose (β -galactosidase)	Reator de fluxo axial-anular	Retirada da lactose do leite ou do soro do leite para consumo humano.
Hidrólise de proteínas de alta massa molecular no leite (tripsina e quimotripsina)	Fibras ocas assimétricas com enzimas gelificadas	Produção de alimento para crianças.
Hidrólise da rafinose (α -galactosidase e invertase)	Reator de fibra oca com enzimas segregadas	Produção de açúcares monoméricos.
Hidrólise do amido em maltose (α -amilase, β -amilase, pullulanases)	Batelada com UF	Produção de xaropes.
Fermentação de açúcares (leveduras)	Batelada com UF	Indústria cervejeira.
Fermentação anaeróbica (leveduras)	Batelada com UF	Produção de álcool.
Hidrólise de pectinas (pectinases)	Batelada com UF	Produção e clarificação de sucos de frutas e vinho.
Fermentação de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Batelada com UF	Produção de ácidos carboxílicos.
Remoção de limoneno e naringina (β -ciclodextrina)	Batelada com UF	Produção e clarificação de sucos de frutas.
Hidrólise da K-caseína (endopeptidase)	Batelada com UF	Coagulação do leite para produtos lácteos.
Hidrólises de colágenos e proteínas musculares (proteases e papaína)	Batelada com UF	Amaciar carnes.
Conversão de glicose em ácido glucônico (glicose oxidase e catalase)	Reator de leito fixo	Prevenção da descoloração; odor desagradável em produtos derivados do ovo durante estocagem.
Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol (lipase)	Reator com membrana capilar UF	Produção de alimentos, cosméticos e emulsificantes.
Hidrólise de celulose em celobiose e glicose (celulase e β -glucosidase)	Reator de fibra oca assimétrico	Produção de etanol e proteína.
Hidrólise do ácido málico em ácido láctico (<i>Lactobacillus oenos</i>)	Membrana capilar de UF com células encapsuladas	Aperfeiçoamento de teste em vinhos brancos.
Hidrólise do ácido fumárico em ácido L-málico (fumerase)	Reator com membrana capilar UF	Produção de aditivos alimentícios.
Hidrólise de triglicerídeos do azeite de oliva (lipase)	Reator membrana com placa hidrofóbica	Tratamento de óleos.
Hidrólise do óleo de soja (lipase)	Reator membrana com fibras ocas hidrofílicas	Tratamento de óleos.
Hidrólise de glicerídeos do óleo de manteiga	Reator membrana com placa plana hidrofílica	Tratamento de óleos e produtos para indústria alimentícia.
Hidrólise da gordura do leite (lipase)	Reator membrana de polipropileno em espiral	Tratamento de óleos e gorduras.

Fonte: KLEFENZ, 2002. Nota: UF (unidade de ultrafiltração).

Figura 1.16 – Desenho esquemático dos biorreatores enzimáticos: (a) tanque agitado com enzimas livres, (b) tanque agitado com enzimas livres acoplado com membranas de ultrafiltração, (c) leito fixo com enzimas imobilizadas, (d) leito fluidizado, (e) tanque agitado com membrana, (f) leito fixo com reciclo de alimentação, (g) tanque de membranas com reciclo de alimentação, (h) tanque agitado e aerado com enzimas livres, (i) pneumático com enzimas livres, (j) tanque agitado e aerado com enzimas imobilizadas e (k) pneumático com enzimas imobilizadas.



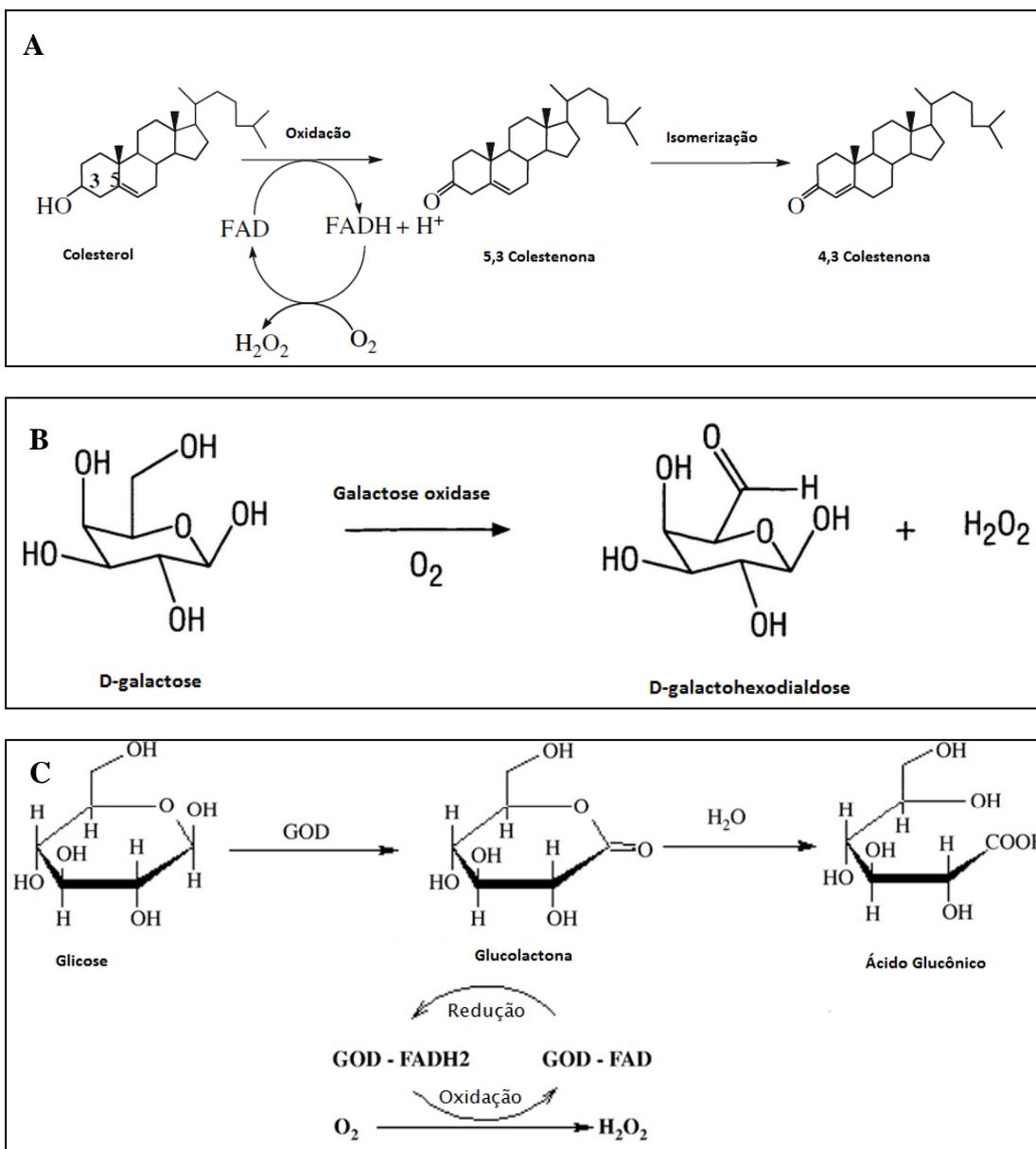
Fonte: Acervo próprio.

Nota: Produto (P), substrato (S) e enzima (E).

2.1 PROCESSOS DE OXIDAÇÃO CATALISADOS POR ENZIMAS

Para alguns processos bioquímicos o fornecimento de oxigênio está intrinsecamente ligado à geração do produto desejado, participando do metabolismo da célula ou diretamente na reação enzimática. Como exemplifica as reações da Figura 1.17, para algumas reações enzimáticas o oxigênio é o segundo substrato da reação.

Figura 1.17 – (A) Reação de oxidação do colesterol pela enzima colesterol oxidase. (B) Reação de oxidação da D-galactose pela ação da enzima galactose oxidase. (C) Reação de oxidação da glicose em ácido glucônico pela ação da enzima glicose oxidase.



Fonte: (A, B) POLAINA & MAC CABE, 2007. (C) WITT *et al.*, 2000.

Nota: Adaptado.

A enzima colesterol oxidase (COX, EC 1.1.3.6) tem ampla aplicação para análises clínicas no diagnóstico de colesterol no sangue e de doenças como tuberculose (bacteriana), HIV e Alzheimer, e na produção de esteroides (KUMARI & KANWAR, 2012). A enzima galactose oxidase (GAO, EC 1.1.3.9) é usada em biossensores desenvolvidos para a determinação da galactose ou di-hidroxicetona em processos fermentativos e para a dosagem de lactose em amostras de alimentos (POLAINA & MAC CABE, 2007). A enzima glicose oxidase (GOD, EC 1.1.3.4) é usada para análises clínicas no diagnóstico de glicose no sangue; quando associada a outras enzimas como a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) ou a peroxidase (EC 1.11.1.7) pode ser usada na fabricação de biossensores de glicose e na produção de ácido glucônico, insumo muito importante para as indústrias de alimentos e fármacos (WITT *et al.*, 2000). Esta reação de oxidação da glicose será melhor explicada nos próximos capítulos.

Os processos aerados são aqueles realizados com a absorção de oxigênio livre na fase líquida, podendo ser de aeração natural ou forçada (quando o ar atmosférico é borbulhado no meio reacional). Embora existam muitos modelos de biorreatores, para estes processos em que a oxigenação é fator limitante, os mais frequentemente utilizados são os biorreatores tipo tanque agitado e aerado e os pneumáticos coluna de bolhas e airlift (CHISTI, 1998).

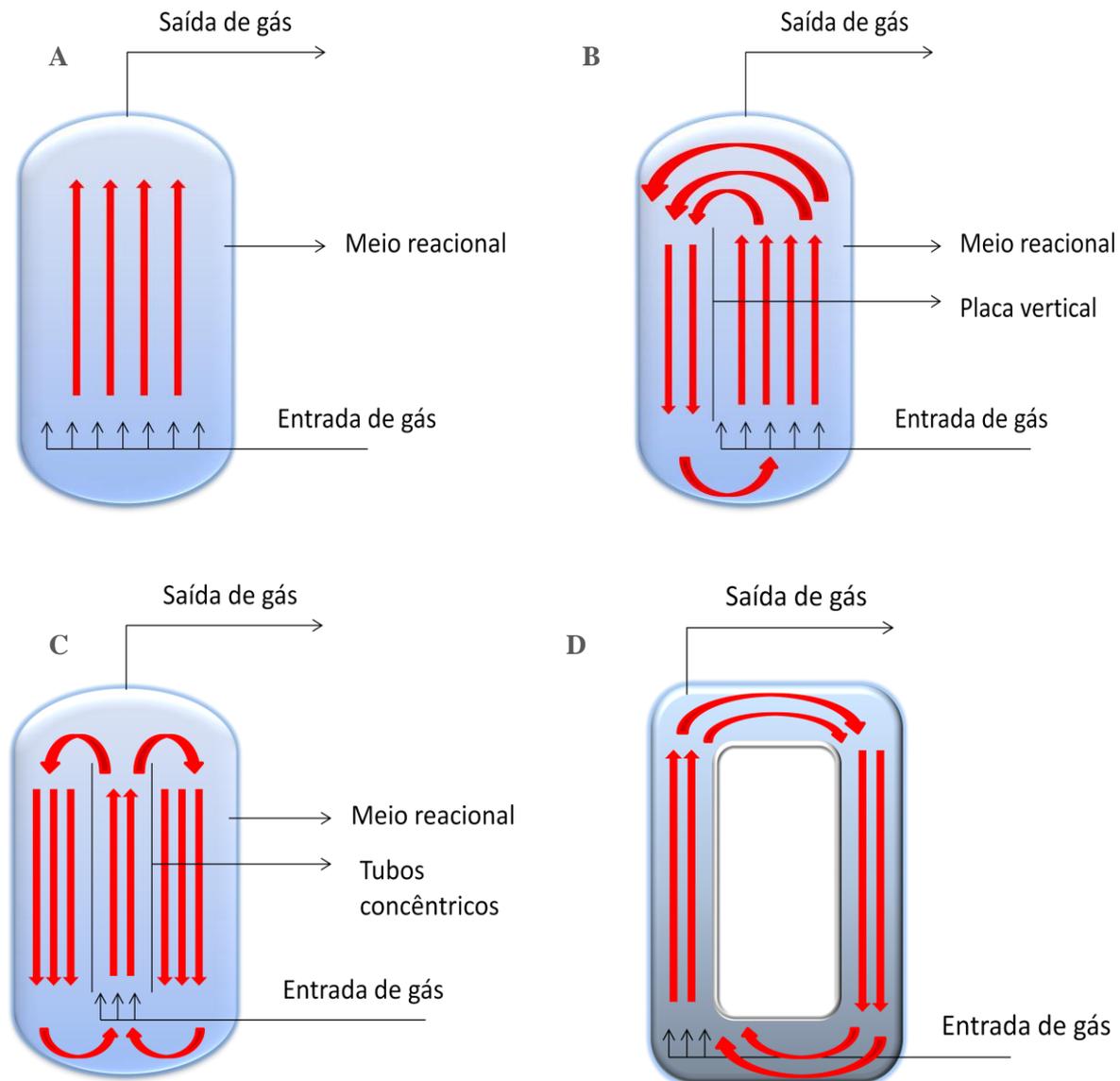
2.2 BIORREATORES PNEUMÁTICOS

Os biorreatores pneumáticos são considerados de simples concepção (Figura 1.18), sendo a injeção de gás comprimido a única fonte de energia de entrada no reator. A circulação do líquido deve-se, exclusivamente, pela aspersão e dispersão do gás. A única variável controlada em um biorreator pneumático é a vazão de gás, que afeta a mistura do meio reacional e a transferência de massa gás-líquido (MORAVEJI *et al.*, 2012; YUGUO, ZHAO & XIAOLONG, 2000). Como não existem partes mecânicas móveis para a agitação, há redução do risco de contaminação, sendo que a limpeza e a esterilização são facilitadas. Uma vez que a injeção do ar tem o intuito de agitar e aerar, um biorreator pneumático opera com baixo consumo de energia e com alta transferência de massa e energia (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

Os reatores airlift são reatores pneumáticos ditos de circulação, apresentando uma região de subida do meio reacional (*riser*) onde ocorre a injeção de gás e outra região de descida da dispersão (*downcomer*), interligada no topo e na base do reator, sendo que as diferenças entre as densidades das regiões, devido às diferentes retenções gasosas, resultam na

circulação do meio reacional (CHISTI & MOO-YOUNG, 1989). Com base no tipo de circulação, interna ou externa, tem-se uma subdivisão dos modelos de reatores airlift (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

Figura 1.18 – Desenho esquemático de biorreatores pneumáticos : (A) coluna de bolhas, (B) airlift tipo split, (C) airlift de cilindros concêntricos, (D) airlift de circulação externa.



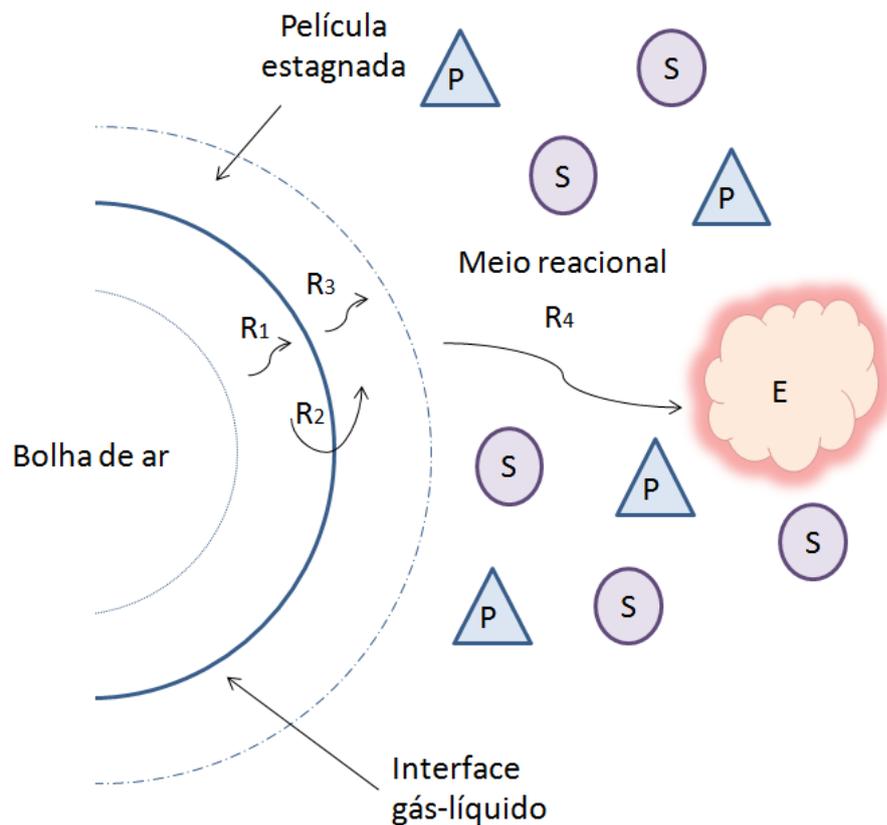
Fonte: Acervo próprio.

2.2.1 Transferência de oxigênio

Devido à baixa solubilidade do oxigênio em relação a outros compostos encontrados no meio reacional, é importante assegurar que o seu fornecimento esteja adequado para a bioconversão. Por isso, faz-se necessário quantificar a transferência de

oxigênio da bolha de gás para o meio (BAILEY & OLLIS, 1986). A Figura 1.19 ilustra as resistências associadas ao processo de transferência de oxigênio do seio da bolha de gás até ser consumido numa reação catalisada por uma enzima.

Figura 1.19 – Resistências associadas à dissolução e consumo de oxigênio por uma enzima (E).



Fonte: Acervo próprio.

Nota: Produto (P), substrato (S) e enzima (E).

Para quantificação do transporte de oxigênio da fase gasosa até o seu consumo final, observa-se que o oxigênio na bolha de gás enfrenta várias resistências até reagir com a enzima, livre no caso. Bailey e Ollis (1986) descreveram um caminho típico para a transferência de oxigênio da bolha de gás até uma célula num processo fermentativo. Simplificando este modelo para uma enzima livre, temos apenas quatro resistências principais associadas à transferência de oxigênio; (R_1) difusão através da película estagnada de gás; (R_2) difusão pela interface gás-líquido; (R_3) difusão através da película estagnada de líquido; (R_4) transporte de oxigênio através do meio reacional até a enzima livre, conforme demonstrado na Figura 1.19.

A soma das resistências individuais e suas respectivas magnitudes é a resistência global da transferência de oxigênio, que depende da hidrodinâmica da bolha de gás e da composição do meio reacional, que define suas propriedades reológicas. A resistência (R_4) relativa à difusão do oxigênio através do meio reacional pode ser desprezada, uma vez que as condições de agitação e/ou aeração são adequadas.

Whitman (1923) propôs uma teoria baseada na hipótese das duas películas estagnadas. As resistências devido às difusões pelas películas estagnadas de gás e de líquido são inversamente proporcionais aos coeficientes convectivos de transferência de oxigênio da fase gasosa (k_g) e da fase líquida (k_L), que dependem das difusividades do oxigênio e das espessuras das películas. Para a fase gasosa, a transferência se dá através do gradiente entre as pressões parciais de oxigênio no interior da bolha (p_g) e na interface (p_i), associadas à constante de Henry (H) que é válida uma vez que as concentrações e as pressões parciais são baixas. Para a fase líquida a transferência está associada ao coeficiente convectivo (k_L) e ao gradiente entre as concentrações de oxigênio na interface (C_i) e no meio líquido (C). Admitindo um perfil no estado estacionário, podemos descrever o fluxo de oxigênio (n_{O_2}) da bolha de ar até o seio do meio do líquido da seguinte forma:

$$n_{O_2} = k_L \cdot (C_i - C) = k_g \cdot H \cdot (p_g - p_i) \quad (1.54)$$

Onde:

n_{O_2} = fluxo de oxigênio ($g O_2/m^2 \cdot h$);

k_g = coeficiente de transferência de massa da película gasosa (m/h);

k_L = coeficiente de transferência de massa da película líquida (m/h);

p_g = pressão parcial de O_2 no seio gasoso (Pa);

p_i = pressão parcial de O_2 na interfase (Pa);

H = constante de Henry ($g O_2 \cdot m^{-3} \cdot Pa^{-1}$);

C_i = concentração de O_2 dissolvido em equilíbrio com p_i ($g O_2/m^3$);

C = concentração de O_2 no seio líquido ($g O_2/m^3$).

A velocidade de transferência de oxigênio para o meio, em termos dos coeficientes globais de transferência de massa é dada por:

$$N_{O_2} = n_{O_2} \cdot a = k_L \cdot a \cdot (C_S - C) = k_g \cdot a \cdot H \cdot (p_g - p_l) \quad (1.55)$$

Onde:

N_{O_2} = velocidade de transferência de oxigênio ($g O_2/m^3 \cdot h$);

a = área interfacial de troca de massa por volume total de líquido (m^{-1});

$k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1});

p_1 = pressão parcial de O_2 em um gás que estaria em equilíbrio com a concentração de oxigênio (C) no líquido, segundo a lei de Henry (Pa);

C_s = concentração de O_2 dissolvido no líquido em equilíbrio com p_g , segundo a lei de Henry ($g\ O_2/m^3$).

Na avaliação da transferência de oxigênio em biorreatores é preciso determinar o valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) em função das condições operacionais, do tipo de fluido e da geometria do sistema. Portanto, o $k_L a$ depende de certas variáveis do sistema que podem ser diferenciadas em três categorias; (1) propriedades físicas do líquido (densidade, difusividade e tensão superficial); (2) propriedades dinâmicas do líquido que compreendem os parâmetros reológicos; (3) intensidade de agitação e vazão de alimentação de gás (BAILEY & OLLIS, 1986).

Existem três metodologias principais para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) em biorreatores na ausência dos biocatalisadores. O método da oxidação do sulfito de sódio resultando no sulfato de sódio, no qual calculando-se a massa de sulfito reagido e o tempo reacional pode-se calcular a quantidade de oxigênio transferido e, por consequência, o $k_L a$. Existe também o método dinâmico em que todo o oxigênio do meio reacional é desorvido, através do borbulhamento de nitrogênio no meio, quando o zero na concentração de oxigênio é atingido. Então, o fluxo de nitrogênio é cessado e o fluxo de oxigênio é iniciado. Conhecendo a curva de concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo é possível obter o $k_L a$. Outro método conhecido é o método do degrau de pressão, onde a mudança na concentração de oxigênio é induzida pela mudança de pressão no biorreator e de modo similar ao método dinâmico para se obter o $k_L a$ (BAILEY & OLLIS, 1986).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A engenharia bioquímica envolve o planejamento e desenvolvimento de bioprocessos, que requer o uso de biocatalisadores, quer seja uma célula ou uma enzima. Esta última, por sua vez, pode estar suspensa em meio aquoso na forma livre ou insolubilizada. De forma mais restritiva, uma reação catalisada enzimaticamente converte um único substrato num único produto, sem desperdício de energia.

No projeto ou análise de um bioprocesso enzimático, um estudo aprofundado sobre as enzimas a serem envolvidas se faz necessário, visando o conhecimento das propriedades dos biocatalisadores, tais como substrato ideal, temperatura e pHs ótimos, ativadores e inibidores, assim como para seleção de condições operacionais para emprego em biorreatores. No desenvolvimento da metodologia ideal para a operação de biorreator pneumático faz-se também necessária uma avaliação nas condições ótimas de transferência de oxigênio para o meio reacional.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEHLE, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley V., 2000.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, n.37, p.331-338, 2001.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Inc., New York, 1986.

CARIOCA, J. O. B. *Brazilian Network on Green Chemistry: Awareness, Responsibility and Action*, Editora UFC, 2008.

CERRI, M. O. Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes. 157 f. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Tese de doutorado, 2009.

CHISTI, Y. Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena. *Appl. Mech.* v. 51, p. 33-112, 1998.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M., Communication to the Editor, On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* v. 34, p. 1391-1392, 1989.

CRESTANI, C. E. Integração do Processo de Cristalização de Frutose por Adição de Antissolvente. 109 f. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, dissertação de mestrado, 2012.

DIXON, M.; WEBB, E. C. *Enzymes*. Ed. Academic press. New York, 1979.

- DUTTA, R. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Springer, India, 2008.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Quím. Nova.*, v.32, n.3, p. 623-638. ISSN 0100-4042, 2009.
- GUISÁN, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Ed. Humana Press Inc, 2006.
- ILLANES, A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Ed. Springer, 2008.
- KLEFENZ, H. *Industrial Pharmaceutical Biotechnology*. Wiley-VCH, 2002.
- KUMARI, L.; KANWAR, S. S. Cholesterol Oxidase and Its Applications. *Advances in Microbiology*. v.2, p.49-65, 2012.
- LICHTENTHALER, F. W. *Methods and Reagents for Green Chemistry: An Introduction*; Ed. John Wiley & Sons. Inc., 2007.
- MANAHAN, S. E. *Toxicological chemistry and biochemistry*. Ed.3, 2003.
- MORAVEJI, M. K.; PASAND M. M.; DAVARNEJAD R.; CHISTI Y. Effects of surfactants on hydrodynamics and mass transfer in a split-cylinder airlift reactor. *The Canadian journal of chemical engineering*. v. 90, 2012.
- MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. *Modern biotechnology: connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering fundamentals*, 2009.
- NAKAO, K. *et al.* Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. *Chem.Eng.Science*, p. 4127-4133, 1997.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Ed. 5, 2011.
- OKAFOR, N. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. Ed. Science Publishers, 2007.
- POLAINA, J.; MAC CABE, A. P. *Industrial Enzymes: structure, function and applications*, 2007.
- PURANE, N. K. *et al.* To study the various parameters for bioconversion of glucose to gluconic acid by *Penicillium chrysogenum* in submerged culture. *International Journal of Biotechnology*, Vol. 4 (6), p 589-593, 2011.

RAMACHANDRAN, S. *et al.* Gluconic Acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44, n.2, p. 185-195, 2006.

REHM, H.; REED, G. *Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*. Ed. VCH (2), 1993.

ROTHENBERG, G. *Catalysis: Concepts and Green Applications*. Ed. WILEY-VCH, ISBN: 978-3-527-31824-7, 2008.

SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. *Chemical Engineering Science*, v. 47, N° 13/14, p. 3387-3394, 1992.

SINGH, O. V.; KAPUR, N.; SINGH R. P. Evaluation of agrofood by-products for gluconic acid production by *Aspergillus niger*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 519-524, 2005.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. *Immobilized Enzymes: Methods and Applications. Topics in Current Chemistry*, v.200, p.95-126, 1999.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. *Técnicas e Experimentos de Bioquímica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1973.

WITT, S. *et al.* Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D glucose. *J Biochem*, 2000.

WONG, C; WONH, K.; CHEN, X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biot.*, v.78, p. 927–938, 2008.

YU J *et al.* Glucose-free fructose production from jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Biotechnology* 150S. S1–S576, 2010.

YU, R. J.; SCOTT, E. V. Method of using gluconic acid or gluconolactone for treating wrinkles. US Patent 5,677,340, 1997.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. α - amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 5:115–121, 2000.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO CINÉTICO DAS ENZIMAS INVERTASE DE *Saccharomyces cerevisiae*, GLICOSE OXIDASE DE *Aspergillus niger* E CATALASE DE FÍGADO BOVINO

Neste capítulo são apresentados o estudo de revisão bibliográfica das enzimas invertase, glicose oxidase e catalase, e a investigação da cinética das enzimas envolvidas no processo multienzimático para a produção de ácido glucônico.

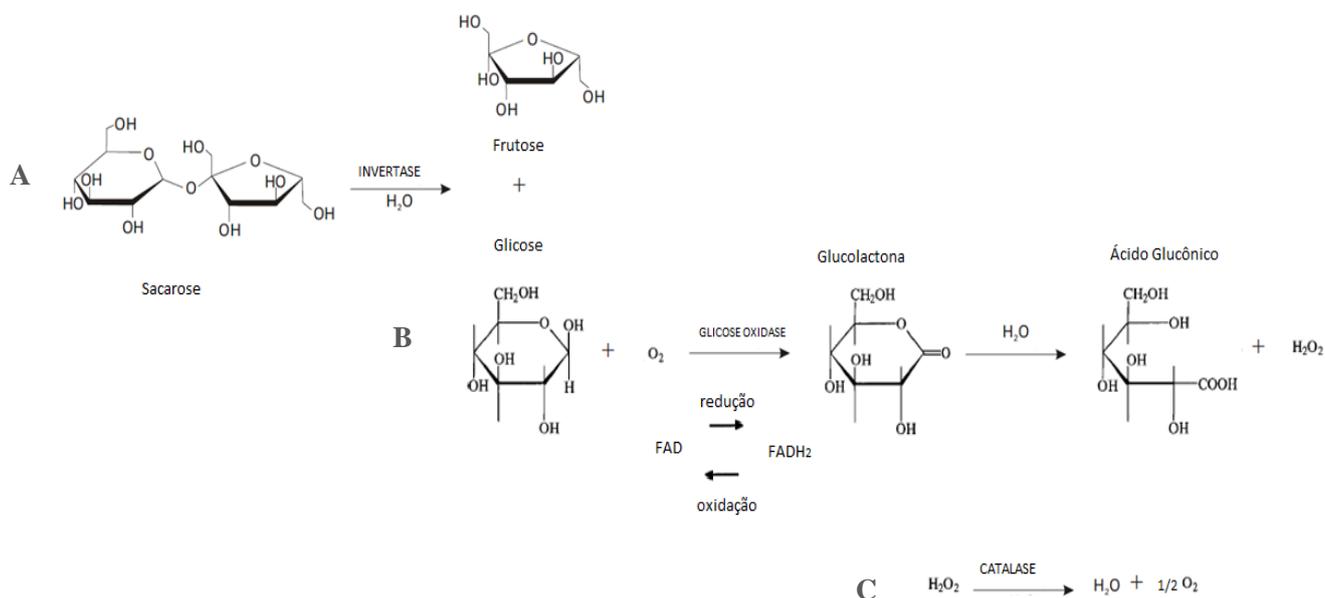
Agnes Cristina Oliveira Mafra, Alberto Colli Badino Jr e Paulo Waldir Tardioli.

1 INTRODUÇÃO

Ácido glucônico e xarope rico em frutose podem ser produzidos concomitantemente pela conversão multienzimática (Figura 2.1) de sacarose (dissacarídeo de α -D-glicose e β -D-frutose ligadas por uma ligação β -1,2) em reatores pneumáticos como coluna de bolhas e airlift. Numa primeira etapa sacarose é hidrolisada a glicose e frutose pela enzima invertase; sequencialmente, glicose é oxidada a β -D-glucolactona (espontaneamente hidrolisada a ácido glucônico) pela enzima glicose oxidase (GOD). Peróxido de hidrogênio, subproduto da reação, é decomposto pela enzima catalase (CAT) (SILVA, 2010).

Invertase (beta-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26) é uma hidrolase responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose (Figura 2.1 - A) em quantidades equimolares (ALEKSANYAN & MARKOSYAN, 1986), uma vez que a molécula de sacarose é composta de duas hexoses ligadas por uma ligação β -1,2 (BOBBIO & BOBBIO, 1985; ASHOKKUMAR, KAYALVIZHI & GUNASEKARAN, 2001). A hidrólise enzimática da sacarose é preferível à hidrólise ácida, uma vez que não resulta na formação de impurezas e de aromas indesejáveis (WISEMAN & WOODWARD, 1975).

Figura 2.1 – Representação da conversão multienzimática sequencial de (A) sacarose em glicose e frutose, (B) glicose em ácido glucônico e (C) decomposição de peróxido de hidrogênio.

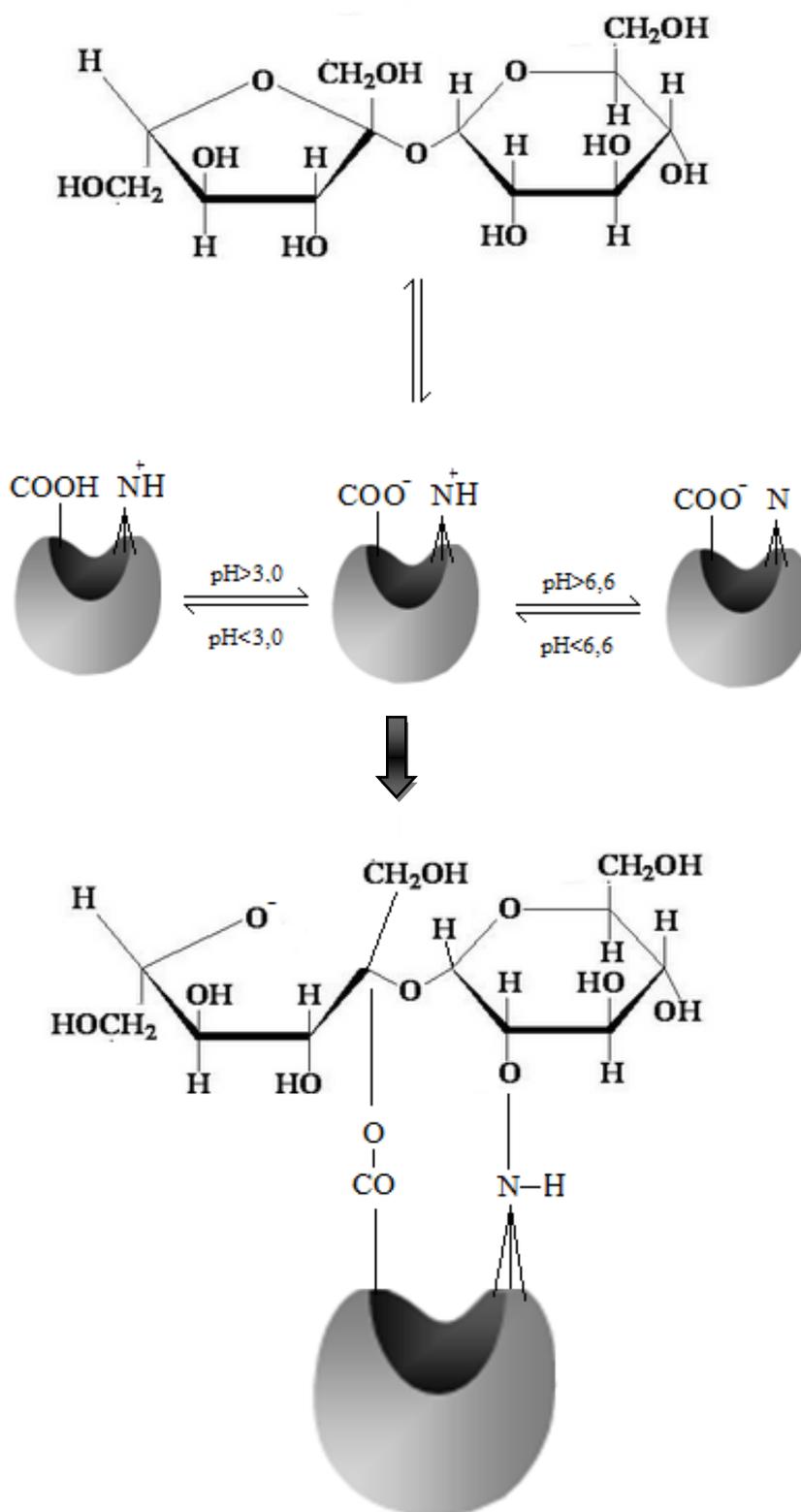


Fonte: Acervo próprio.

Esta enzima de grande interesse industrial está presente em invertebrados, vertebrados, algas verdes, bactérias, vegetais e fungos, mas principalmente é encontrada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MARQUEZ *et al.*, 2007). Identificam-se duas formas de invertase na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (KULP, 1975), a glicosilada (beta-fructosidase) ou invertase ácida que fica alojada no espaço periplasmático entre a parede celular e a membrana da levedura, com pH ótimo de atividade entre 4,5 e 5,5; e outra não glicosilada (alfa-glucosidase) ou invertase alcalina situada no citoplasma celular, com pH ótimo de 8,0 (SHANKAR & KOTWAL, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2009).

O mecanismo catalítico da invertase (Figura 2.2) foi proposto por Bowski *et al.* (1971) sugerindo um envolvimento de um ânion carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica da enzima, fazendo com que o mecanismo de ligação entre a enzima e o substrato (sacarose) seja altamente influenciada pelo pH do meio (BARBOSA, 2008).

Figura 2.2 – Representação da influência do pH sob o sítio ativo da invertase e mecanismo da enzima invertase.



Fonte: BOWSKI *et al.*, 1971.

A glicose oxidase (β -D-glicose:oxigênio-1-redutase, GOD, EC 1.1.3.4) é uma enzima classificada como uma oxidorreductase. Pode ser obtida a partir de diferentes fontes microbianas, destacando-se o fungo *Aspergillus niger* (BANKAR *et al.*, 2009; WITT *et al.*, 2000). A GOD é enzima dimérica glicosilada (dissacarídeos ligados covalentemente em sua estrutura peptídica), formada por subunidades idênticas de massa molecular em torno de 80 kDa, ligadas por pontes dissulfeto (WONG, WONH & CHEN, 2008; BANKAR *et al.*, 2009). Cada subunidade do homodímero está ligada não covalentemente à coenzima flavina adenina dinucleotídeo (FAD), entretanto, sua remoção não causa desnaturação da enzima (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006). O sítio ativo da GOD contém além da FAD, três aminoácidos envolvidos na catálise, a His516 (pKa=6,9), o Glu412 (pKa=3,4) e His559 (pKa>8). Cada resíduo de aminoácido tem forte influência sobre a cinética da enzima, fazendo com que o pH ideal para a catálise seja na faixa de 4 a 7, com ponto isoelétrico em 4,2 (LESKOVAC *et al.*, 2005; WONG, WONH & CHEN, 2008).

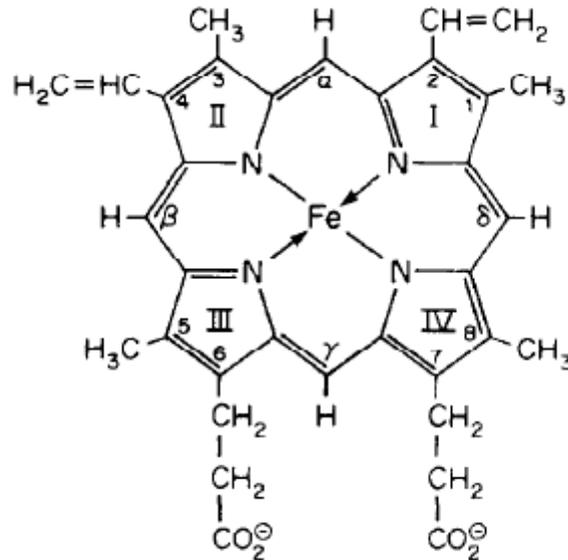
O mecanismo cinético Bi-Bi Ping-Pong da GOD foi descrito por Leskovac *et al.* (2005). A GOD catalisa a reação de oxidação de β -D-glicose à β -D-glucolactona, utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons e formação espontânea de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Hidrogênio é transferido para a coenzima FAD, formando $FADH_2$, que sequencialmente é regenerado para FAD. Em seguida, a glucolactona é espontaneamente hidrolisada em ácido glucônico (Figura 2.1 - B).

Peróxido de hidrogênio é um forte inibidor da GOD, portanto, faz-se necessária sua eliminação do meio reacional. A decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio pode ser catalisada pela enzima catalase (Figura 2.1 - C) (NAKAO *et al.*, 1997). A catalase (hidrogênio-peróxido: hidrogênio-peróxido oxidorreductase, CAT, EC 1.11.16) é uma oxidorreductase tetramérica. Pode ser encontrada em várias formas de vida, incluindo animais, plantas e microrganismos, sendo apenas ausente em organismos anaeróbios (YORUK *et al.*, 2005). Desempenha um papel importante na remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tóxico na célula, pois este é um poderoso agente oxidante, o que é potencialmente prejudicial para as células (ADÁNYI *et al.*, 2007).

A catalase (CAT) normalmente é obtida a partir de fígado bovino ou de fontes microbianas. A catalase de fígado bovino possui massa molecular de 250 kDa, com cada subunidade possuindo massa molecular em torno de 65 kDa (KISELER, SPITZBERG & VAINSTEIN, 1967). CAT é uma hemoproteína, contendo um anel de protoporfirina (Figura 2.3) com Fe^{3+} no centro como grupo prostético (FITA & ROSSMAN, 1985). Pode ser

inativada pela luz solar em condições aeróbias e pelo próprio substrato (peróxido de hidrogênio).

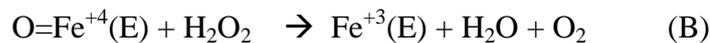
Figura 2.3 – Representação do grupo heme prostético.



Fonte: FITA & ROSSMAN, 1985.

O mecanismo de catálise da CAT (mecanismo Bi-Bi Ping-Pong) ocorre em duas etapas; na primeira etapa uma molécula de H_2O_2 oxida o íon Fe^{3+} do grupo prostético (Figura 2.4 - A), havendo a condensação de uma molécula de água. Na segunda etapa, uma segunda molécula de H_2O_2 reduz o grupo prostético oxidado (O-Fe^{4+}), regenerando Fe^{3+} e liberando H_2O e O_2 (Figura 2.4 - B) (SCANDALIOS, GUAN & POLIDOROS, 1997; SWITALA & LOEWEN, 2002; ADÁNYI *et al.*, 2007).

Figura 2.4 – Decomposição do peróxido de hidrogênio em dois estágios.



Fonte: POLAINA & MAC CABE, 2007.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as enzimas invertase, GOD e CAT solúveis quanto as suas temperaturas e seus pHs de máxima atividade catalítica, visando a seleção de condições operacionais para uma futura conversão de sacarose em ácido glucônico e frutose em reator airlift. A partir das curvas de atividade em função da temperatura e do pH, selecionaram-se condições de processo (temperatura e pH) e estudou-se

a estabilidade das enzimas solúveis nestas condições. Na sequência foram realizados estudos cinéticos das enzimas nas condições de maior estabilidade, com o intuito de estimar as relações enzimas/substrato para a batelada clássica em biorreator airlift.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas como enzimas invertase (EC 3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]), glicose oxidase (EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e catalase (EC 1.11.16) de fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]). Os demais reagentes empregados eram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Medida de atividade enzimática em velocidades iniciais

A atividade enzimática da invertase foi quantificada pela ação da invertase sobre uma solução de sacarose 200 mM a 30°C, pH 4,8 (tampão acetato de sódio 50 mM), acompanhando-se a formação de açúcares redutores totais (ART) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico – DNS (MILLER, 1959). Neste método, ao adicionar-se o reagente DNS à amostra, os grupos aldeído ou cetônico da hexose oxidam-se a grupos carboxílicos, enquanto o DNS reduz-se a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

O procedimento experimental consistia em adicionar-se em um tubo de ensaio 2,3 mL de solução de sacarose 200 mM (preparada em tampão acetato 50 mM, pH 4,8) e 0,2 mL de solução enzimática (para a amostra) ou água destilada (para o branco). As soluções eram mantidas a 30°C por 5 min. Após este período de tempo adicionava-se 1 mL de reagente de DNS e fervia-se a amostra por 5 min, levando-as em seguida a um banho de gelo por 10 min. Finalmente, adiciona-se 7,5 mL de água e fazia-se a leitura da absorbância da amostra em 540 nm. A concentração de ART é expressa como equivalentes de glicose a partir de uma curva padrão. Uma unidade de atividade da invertase foi definida como a quantidade produzida de ART (em μmol) por minuto nas condições do ensaio.

Preparo do Reagente de DNS: Dissolve-se 8g de hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada, a seguir 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 150 g de tartarato de sódio e potássio e 250 mL de água destilada são misturados à solução de hidróxido de sódio. Esta solução é aquecida em banho-maria (40°C) até completa dissolução, perfazendo-se o volume

para 500 mL.

As atividades enzimáticas da GOD (SILVA, 2010) e da CAT (NELSON & KIESOW, 1972) foram determinadas por espectrofotometria (SPG 1A, ThermoFischer) a 240 nm, monitorando respectivamente a formação de H₂O₂ a partir de uma solução de glicose 1 g/l, 25°C, pH 5,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM) e a decomposição de H₂O₂ a partir de uma solução de H₂O₂ 35 mM, 25°C, pH 7,5 (tampão fosfato de sódio 50mM. Uma unidade de GOD (ou CAT) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação (ou decomposição) de 1µmol de H₂O₂ por min nas condições do ensaio.

O procedimento experimental para medida de atividade enzimática da GOD consistia em adicionar-se a uma cubeta de quartzo 1,8 mL de solução de glicose 1 g/L (preparada em tampão fosfato 100 mM, pH 5,0) e 0,4 mL de solução enzimática. A absorvância da solução era monitorada por 5 min a 240 nm, a fim de se determinar o coeficiente angular do trecho linear da curva absorvância *versus* tempo. A atividade enzimática era calculada pela Equação 2.1, em que a conversão de absorvância para concentração foi realizada utilizando-se a absortividade molar do H₂O₂ (52,6 M⁻¹.cm⁻¹) e o volume reacional (2,2 mL).

O procedimento experimental para medida de atividade enzimática da CAT consistia em adicionar-se a uma cubeta de quartzo 2,9 mL de solução de H₂O₂ 35 mM (preparada em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5) e 0,2 mL de solução enzimática. A absorvância da solução era monitorada por 3 min a 240 nm, a fim de se determinar o coeficiente angular do trecho linear da curva absorvância *versus* tempo. A atividade enzimática era calculada pela Equação 2.1, em que a conversão de absorvância para concentração foi realizada utilizando-se a absortividade molar do H₂O₂ (52,6 M⁻¹.cm⁻¹) e o volume reacional (3,1 mL).

$$Atividade (U) = \frac{1000 \cdot \left(\frac{\Delta Abs}{\Delta t}\right) \cdot V_r}{52,6} \quad (2.1)$$

Onde: $\frac{\Delta Abs}{\Delta t}$ é o coeficiente angular obtido do gráfico “absorvância *versus* tempo” e V_r é o volume reacional.

2.2.2 Dosagem de proteína

As concentrações de proteínas das enzimas invertase, GOD e CAT comerciais

foram determinadas pelo método de Follin-Ciocalteu-Lowry (LOWRY, 1951; CECCHI, 2003; MIWA, 2008). O método consiste na adição de 2 ml da solução de Lowry à 200 µL da solução de proteína, ocorrendo a reação de Biureto entre o átomo de cobre e os resíduos de aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina). Após 10 min à temperatura ambiente, acrescenta-se o reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®), ácido fosfomolibdato fosfo-tungstico, que sofre redução quando reage com as proteínas na presença do cobre em solução alcalina. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente e na ausência de luz, forma-se um complexo de coloração azulada com absorção máxima em 750 nm, que será medida num espectrofotômetro (previamente calibrado com solução preparada nas mesmas condições descritas acima, exceto pela substituição da solução de proteína por água destilada) e comparada com uma curva padrão de proteína conhecida.

Preparo do Reagente de Lowry: 30 mL de hidróxido de sódio (100 mM) e carbonato de cálcio (2% m/v), 0,3 mL de sulfato de cobre (1% m/v) e 0,3mL tartarato de sódio (2% m/v).

2.2.3 Perfil eletroforético

Os perfis eletroforéticos das enzimas invertase, GOD e CAT comerciais foram determinados por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 14% (m/v), de acordo com metodologia de Laemmli (1970). Amostras das soluções de enzimas (20 µL) foram fervidas por 5 min em tampão de ruptura (Tris-HCl 75 mM, β-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (v/v), pH 6,8) e aplicadas em poços pré-formados no gel de eletroforese. No primeiro poço foram aplicados 4µL do marcador de massa molar BenchMark™ Protein Ladder 10-220 kDa (Life Technologies®). A corrida eletroforética foi realizada durante 1,5 h (110 V para os 20 min iniciais e 140 V para o tempo restante) em uma cuba de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN® 3), equipada com fonte de alimentação (Power PAC 1000 - BIORAD-USA) e contendo tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% (m/v), pH 8,3). A revelação dos géis eletroforéticos foi realizada com coomassie brilliant blue R-250 (coloração por 30min) e ácido acético 7% (v/v) (descoloração por 12h).

2.2.4 Efeitos do pH e da temperatura

A influência do pH na atividade enzimática foi avaliada a 30°C (para invertase) e 25°C (para GOD e CAT); o efeito da temperatura foi avaliado nos valores de pH de 5,0

(para invertase e GOD) e 7,5 (para CAT). As atividades enzimáticas foram expressas como porcentagens dos valores máximos obtidos e o procedimento foi realizado com as velocidades iniciais das enzimas.

2.2.5 Estabilidade

As estabilidades das enzimas invertase, GOD e CAT foram avaliadas a 40, 45 e 50°C em pH 5,0 e a 40 e 45°C em pH 6, ambas na ausência de substrato, acompanhando-se as atividades residuais ao longo do tempo, expressas como medidas relativas da atividade inicial.

O modelo de Sadana e Henley (1987) foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica com o auxílio do Software OriginPro 7. Este modelo considera que existe apenas uma etapa de inativação, admitindo um decaimento de 1ª ordem, conforme as equações abaixo:



$$a_R = (1 - \alpha_1) \cdot e^{-k_1 \cdot t} + \alpha_1 \quad (2.3)$$

Onde: A_0 é a atividade enzimática inicial; A é a atividade enzimática durante o período de desativação; α_R representa a atividade relativa (A/A_0); α_1 é a razão entre as atividades enzimáticas - final e inicial (A/A_0); k_1 é a constante da taxa de desativação de primeira ordem (tempo^{-1}) que representa o nível de desdobramento ou inativação da enzima e t é o tempo de ensaio.

2.2.6 Estudo cinético

As cinéticas das reações catalisadas pelas enzimas invertase, GOD e CAT foram avaliadas pelo método das velocidades iniciais a 40°C em pH 6,0, medindo-se as atividades enzimáticas sob diferentes concentrações dos respectivos substratos, sacarose (na faixa de 0 – 1,6 M), glicose (na faixa de 0 – 0,6 M) e peróxido de hidrogênio (na faixa de 0 – 0,3M), conforme descrito no item 2.1.1.

Na avaliação dos parâmetros cinéticos ajustou-se o modelo de inibição de substrato (Equação 2.3) para as cinéticas das enzimas invertase e CAT. Para a cinética da enzima GOD ajustou-se o modelo de Michaelis-Menten clássico (Equação 2.4). Em todos os casos foi utilizado o Software OriginPro 7[®] para ajuste das equações e estimativa dos parâmetros cinéticos.

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (2.4)$$

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.5)$$

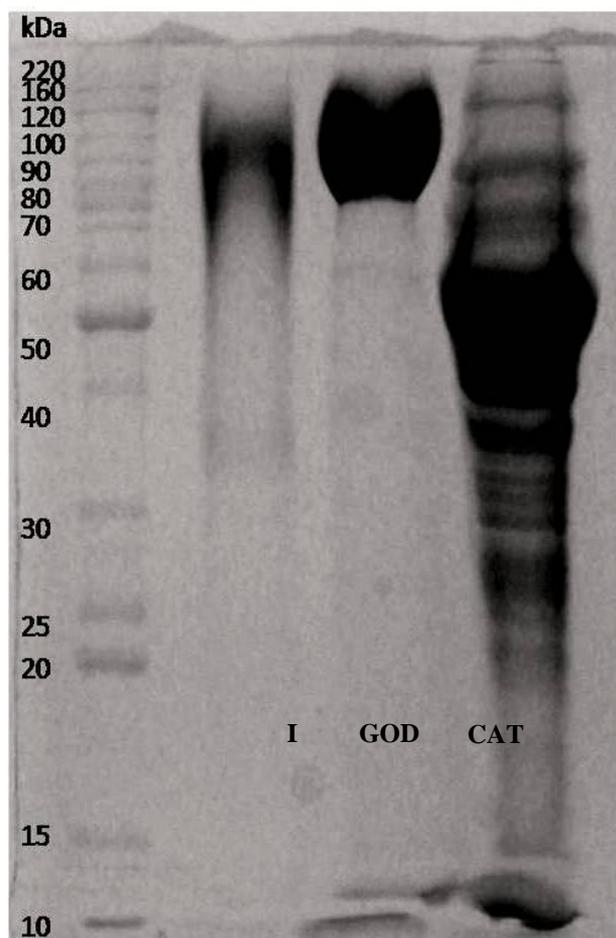
Onde: v é a velocidade de reação de consumo de substrato ou geração de produto ($\mu\text{M}/\text{min}$); V_m é a velocidade máxima de reação ($\mu\text{M}/\text{min}$); $[S]$ é a concentração de substrato (mM); K_I é a constante de inibição de substrato (mM) e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFIL ELETROFORÉTICO

Os perfis eletroforéticos das enzimas em condições desnaturantes estão ilustrados na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Perfil eletroforético em condições desnaturantes das enzimas comerciais invertase (I), glicose oxidase (GOD) e catalase (CAT).

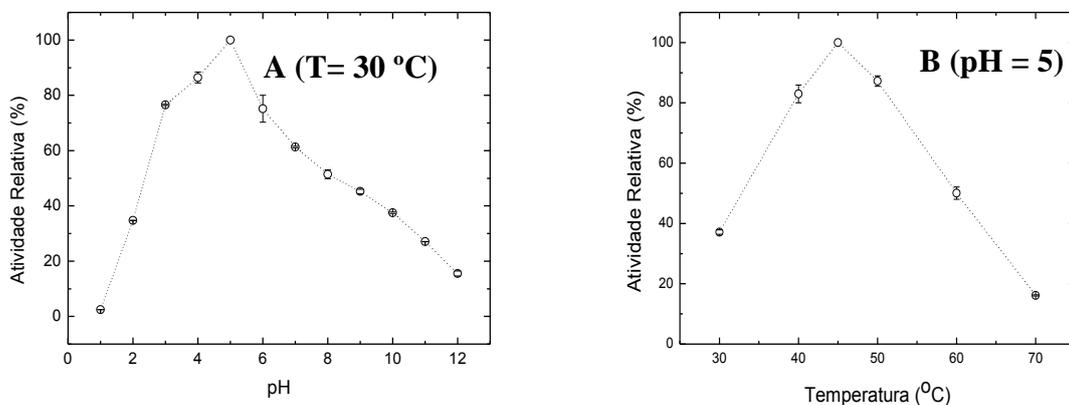


Observa-se que para as enzimas comerciais invertase, GOD e CAT as massas molares de 100, 110 e 55kDa, respectivamente, concordam com os valores relatados na literatura (WILLIAMS *et al.*, 1985; GUO *et al.*, 2010; KISELER, SPITZBERG & VAINSTEIN, 1967).

3.2 EFEITOS DO pH E DA TEMPERATURA NAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA INVERTASE, GOD E CAT

A influência do pH (Figura 2.6 - A) e da temperatura (Figura 2.6 - B) na atividade enzimática de invertase comercial foi estudada a 30°C e pH no intervalo de 1,0 a 12 (perfil atividade-pH) e na faixa de 30 a 70°C, pH 5,0 (perfil atividade-temperatura). Invertase comercial apresentou atividade máxima em torno de 45°C e pH 5,0. Entretanto, a enzima apresenta mais de 80% da atividade máxima nos intervalos de pH 4 a 6 e temperatura de 40 a 50°C. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com aqueles reportados por Arruda e Vitolo (1999), Hsieh, Liu e Liao (2000), Said e Pietro (2004) e Santos (2010).

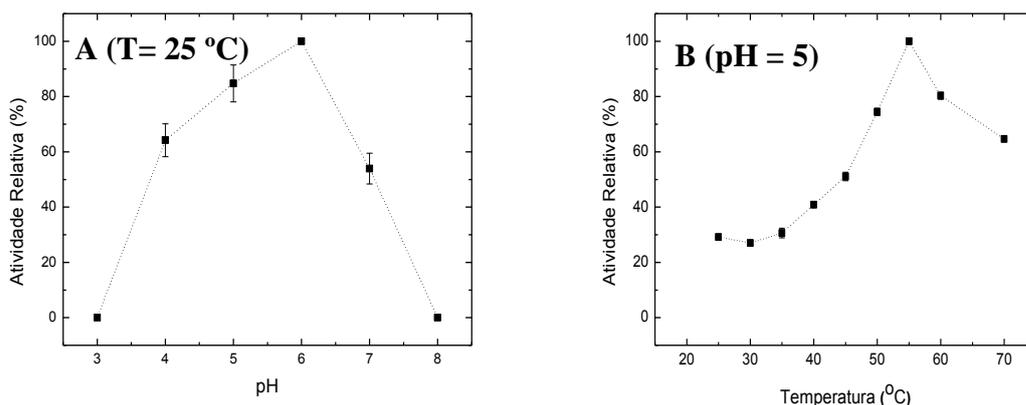
Figura 2.6 – Estudo do efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade da enzima comercial invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.



A influência do pH (Figura 2.7 - A) e da temperatura (Figura 2.7 - B) na atividade enzimática da GOD comercial foi estudada a 25°C e pH no intervalo de 3,0 a 8,0 (perfil atividade-pH) e na faixa de 25 a 70°C, pH 5,0 (perfil atividade-temperatura). Observa-se que o pH de máxima atividade da GOD comercial livre está em torno de 6,0 (Figura 2.7 - A). No intervalo de 4,0 a 7,0 a enzima apresenta mais de 50% da atividade máxima. Entretanto, perde totalmente sua atividade no pH 8,0. Bankar *et al.* (2009) e Ramachandran *et al.* (2006) verificaram que GOD apresentava atividade ótima nas faixas de pH de 3,5 a 6,5 e 4,0 a 6,0, respectivamente. A temperatura de máxima atividade da GOD, na faixa de ensaio,

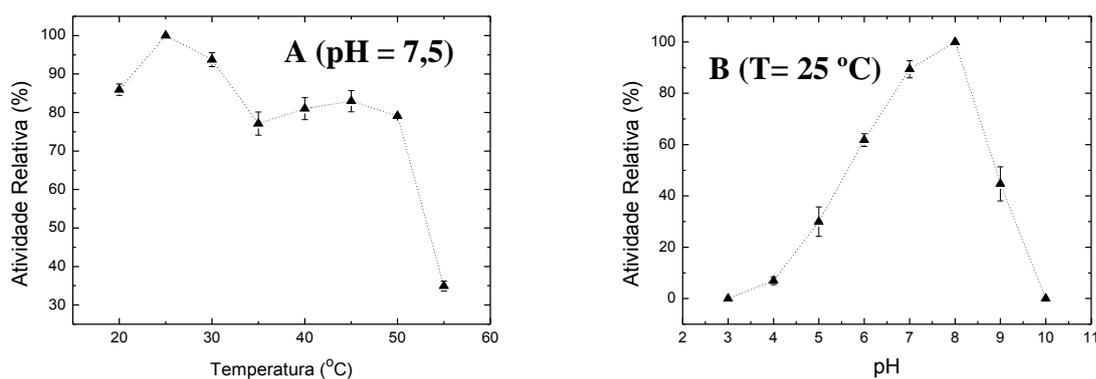
está em torno de 55°C (Figura 2.7 - B), resultado esse de acordo com o relatado por Wong, Wonh e Chen (2008). GOD apresentou mais de 50% da atividade máxima em todas as temperaturas acima de 40°C.

Figura 2.7 – Estudo do efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade da enzima comercial glicose oxidase de *Aspergillus niger*. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.



A influência da temperatura (Figura 2.8 - A) e do pH (Figura 2.8 - B) na atividade enzimática da CAT foi estudada a 25°C e pH no intervalo de 3,0 a 10,0 (perfil atividade-pH) e na faixa de 20 a 55°C, pH 7,5 (perfil atividade-temperatura).

Figura 2.8 – Estudo do efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade da CAT comercial de fígado bovino.



Observa-se no estudo do efeito do pH, que o pH de máxima atividade catalítica da CAT para a faixa do experimento, está em torno de 8,0, sendo que em pH 7,0 a enzima apresenta 92% de sua atividade máxima (Figura 2.8 - B). Estudos reportados na literatura (BARTOSZEK & SULKOWSKI, 2006; CHANCE, 1951) mostram que a dosagem de atividade de CAT é dificultada em pHs básicos e ácidos, devido à degradação espontânea do

H₂O₂. Esse comportamento poderia explicar a queda brusca de atividade da CAT nos pHs 9,0 e 10,0. A inativação da enzima e a redução da concentração de substrato podem ter contribuído para as baixas atividades medidas. Quanto à temperatura de máxima atividade (Figura 2.8 - A), CAT exibiu um valor máximo de atividade em torno de 25°C; entretanto, preserva em torno de 80% da atividade máxima no intervalo de 35 a 50°C.

3.3 ESTABILIDADE

A partir dos resultados de atividade em função do pH e da temperatura para as enzimas invertase, GOD e CAT selecionou-se como possíveis condições de operação do biorreator multienzimático: 50°C, 45°C e 40°C à pH 5,0 e a 45°C e 40°C à pH 6,0. Os perfis de inativação ao longo do tempo são mostrados na Figura 2.9 e as meias-vidas das enzimas na Tabela 2.1.

Buscaram-se nestas faixas de trabalho, condições em que invertase e GOD apresentassem atividades mais próximas possíveis de seus máximos. Embora em pH 5,0 a CAT exiba cerca de 30% de sua atividade máxima, contudo neste pH o H₂O₂ é espontaneamente degradado, contribuindo para a sua remoção do meio reacional. Mesmo a enzima GOD não estando na faixa de idealidade em temperaturas menores que 50 °C, nos pHs 5,0 e 6,0 a mesma apresenta mais de 80% da atividade máxima. Entretanto, a enzima invertase nas faixas de 50 a 40 °C e pH 5 a 6 possui mais de 70% da atividade máxima, sendo estas condições as mais próximas das ideais. Com o abaixamento da temperatura, fixando-se o pH em 5 (condições A, B e C), os tempos de meias-vidas da GOD foram em média 2 vezes maiores que as das outras enzimas, sugerindo que estas condições não são adequadas para a produção do ácido glucônico. Quando o pH do meio é alterado para 6, comparando a condição B (45°C, pH 5,0) com a condição D (45°C, pH 6,0) nota-se que a invertase é estabilizada em quase 17 vezes e a CAT tem sua meia-vida aumentada em 39 vezes. Objetivando a maior estabilidade da GOD, a temperatura foi reduzida da condição D (45°C, pH 6,0) para a condição E (40°C, pH 6,0); com isso, o tempo de meia-vida da GOD dobrou e quando compara-se a relação entre as meias-vidas das condições C (40°C, pH 5,0) e D (45°C, pH 6,0), observam-se valores muito parecidos. Por fim a invertase, GOD e CAT apresentaram maior estabilidade térmica a 40°C e pH 6,0, observando-se tempos de meias-vidas de 137, 105 e 98h, respectivamente.

Figura 2.9 – Estabilidade da (○) invertase, (■) GOD e (▲) CAT nas condições de (A) 50°C, pH 5,0; (B) 45°C, pH 5,0; (C) 40°C, pH 5,0; (D) 45°C, pH 6,0; (E) 40°C, pH 6,0, na ausência de substrato.

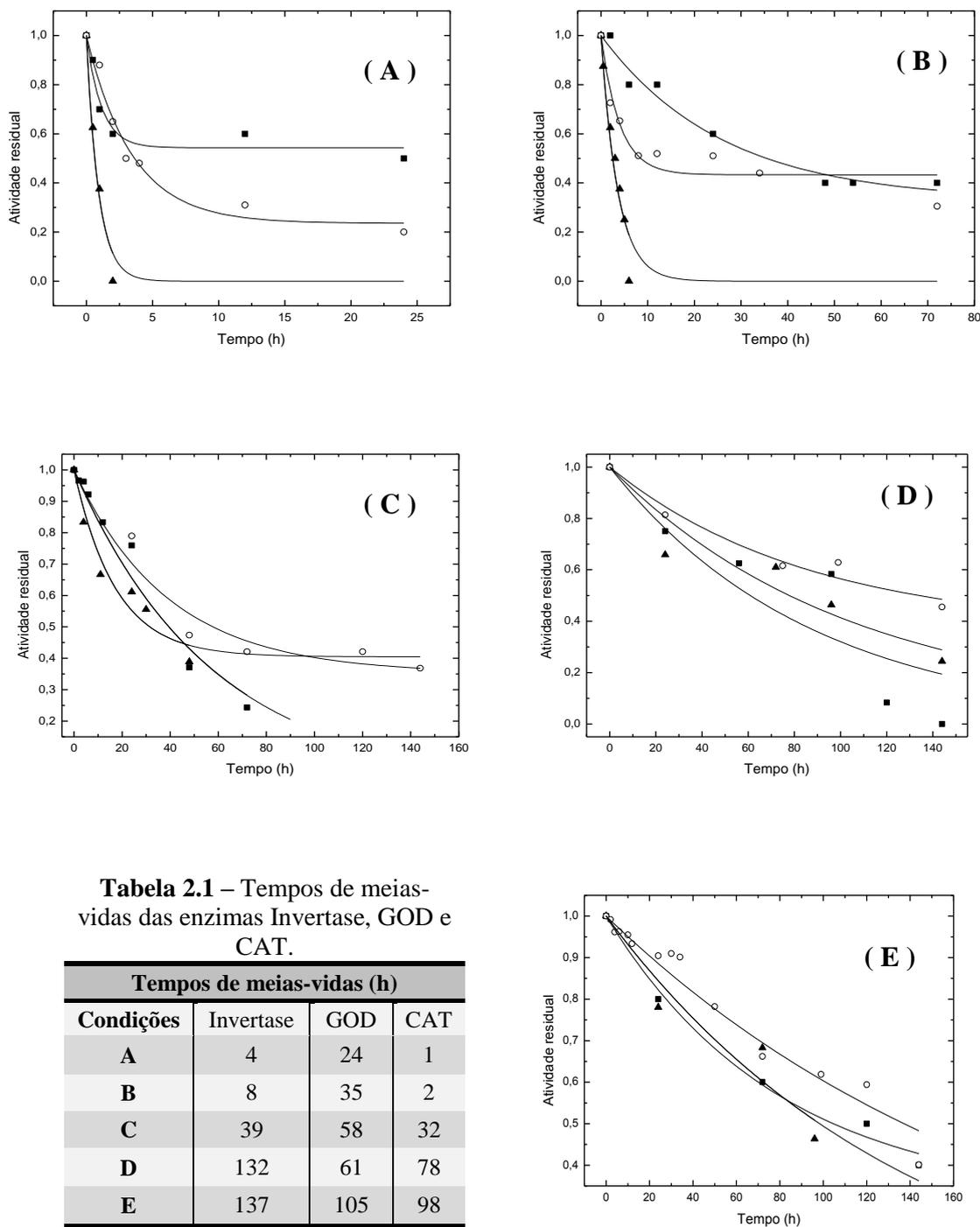


Tabela 2.1 – Tempos de meias-vidas das enzimas Invertase, GOD e CAT.

Tempos de meias-vidas (h)			
Condições	Invertase	GOD	CAT
A	4	24	1
B	8	35	2
C	39	58	32
D	132	61	78
E	137	105	98

Nota: O modelo de Sadana e Henley foi ajustado aos dados experimentais de atividade residual em função do tempo e usado para estimar as meias-vidas ($t_{1/2}$) das enzimas solúveis.

As ordens de grandeza das meias-vidas obtidas neste trabalho concordam com os relatados na literatura, embora em condições de pH e temperatura ligeiramente diferentes. Hsieh, Liu e Liao (2000) verificaram que a meia-vida da invertase a 60°C, pH 4,5 era de 2,3 h; Courjean e Mano (2011) verificaram que GOD a 50°C, pH 6,0 exibiu uma meia-vida de 20 h; Wang *et al.* (2008) obtiveram para CAT de *Bacillus sp* 43% de atividade residual quando incubada a 50°C por 40 min e Yamaguchi *et al.* (2011) obtiveram para CAT de *Gluconobacter oxydans*, 60% de atividade residual após 1 h de incubação a 40°C, pH 3,0.

3.4 CINÉTICA

O modelo cinético de Michaelis-Menten (MM), com e sem inibição pelo substrato, foi ajustado aos dados experimentais de velocidade inicial de reação *versus* concentração de substrato a 40°C e pH 6,0 para as três enzimas estudadas (Figura 2.10 – 2.12). A Tabela 2.2 lista os parâmetros cinéticos estimados e mostra que GOD seguiu o modelo clássico de Michaelis-Menten, enquanto invertase e CAT apresentaram inibição pelo substrato.

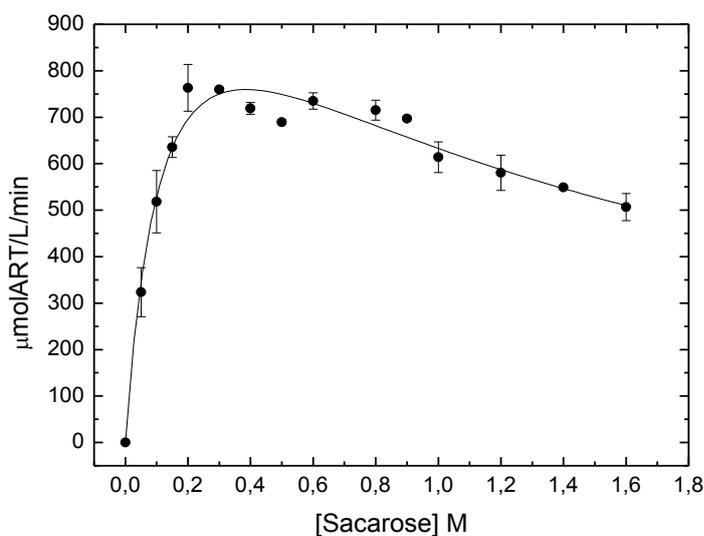
Tabela 2.2 – Parâmetros cinéticos e modelos de MM estimados para invertase, GOD e CAT a 40°C e pH 6,0.

Parâmetros	Invertase	GOD	CAT
K_m (mM)	133 ± 3	7,3 ± 0,2	124 ± 8
V_{max} (µM/min)	1.285 ± 12	80 ± 4	230 ± 11
K_I (mM)	1.114 ± 22	-	137 ± 10
Coefficiente de correlação (r^2)	0,99	0,95	0,97
Modelo ajustado	$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$	$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$	$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$

A enzima invertase apresentou inibição por seu substrato (Figura 2.10). Segundo Bowski *et al.* (1971) esse tipo de inibição é típico em altas concentrações de sacarose. Alguns trabalhos da literatura apontam alternativas para diminuir a inibição como a imobilização em variados suportes (VASILE, IOANA & DORIN, 2010; SANJAY & SUGUNAN, 2006). Hsieh, Liu e Liao (2000) e Isik *et al.* (2003), ajustando os parâmetros

cinéticos com o método de linearização Lineweaver–Burk, obtiveram respectivamente um K_m aparente de 80 mM de sacarose a 55°C e pH 3 e 59 mM de sacarose a 25°C e pH 5,1; entretanto os dados experimentais não compreendiam a faixa de alta concentração de sacarose.

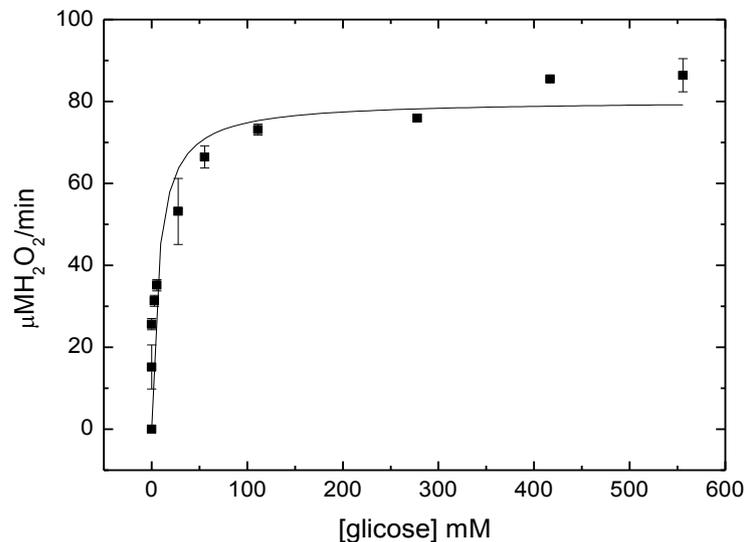
Figura 2.10 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (inibição pelo substrato) aos dados experimentais de atividade da invertase em função da concentração de sacarose, a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.



Santana *et al.* (2008) realizaram um estudo da invertase livre ajustando os dados experimentais ao modelo de inibição pelo substrato. Fazendo uma regressão não-linear obtiveram os parâmetros cinéticos de V_m , K_m e K_I ; em que K_m foi de 45,6 mM e K_I de 1,06 M, na temperatura de 30°C e pH 4,5. Santos (2010) encontrou para invertase comercial livre um K_m de 90,9 mM (pH 5,0 e 50°C), com faixas de concentração de sacarose abaixo da inibição enzimática.

Diante destes resultados relatados pela literatura, observa-se que os parâmetros cinéticos estão altamente ligados à variação de temperatura, pH e faixa de concentração de substrato, demonstrado nas curvas de temperatura e pHs de máxima atividade catalítica da invertase, que para temperaturas abaixo de 40°C (pH 5) tem-se menos de 80% da máxima atividade catalítica e a 30°C a atividade relativa é de aproximadamente 40% da máxima. Embora haja divergência nos valores dos parâmetros, em função de terem sido obtidos em diferentes condições experimentais, os parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho (Tabela 2.2) estão na mesma ordem de grandeza daqueles reportados na literatura.

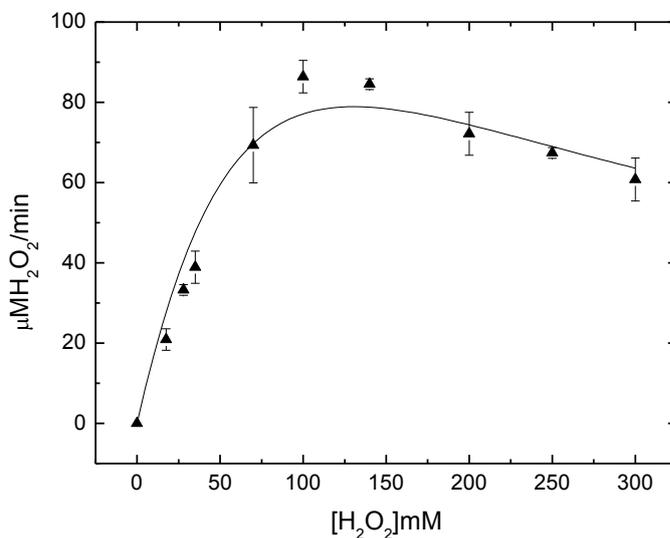
Figura 2.11 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (clássico) aos dados experimentais de atividade da GOD em função da concentração de glicose, a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.



Isik *et al.* (2003) tratando os dados experimentais de velocidades iniciais com o modelo de linearização de Lineweaver–Burk obteve à 25°C e pH 5,1, uma constante de Michaelis-Menten (MM) igual a 18,5 mM. Segundo Kim, Fravel e Papavizas (1990) K_m da glicose oxidase de *T. favus* é 10,9 mM, enquanto para a glicose oxidase de *P. amagasakiense* e *P. funiculosum* a constante de MM apresenta valores entre 3 e 6 mM (WITT, SINGH & KALISZ, 1998; BANKAR *et al.*, 2009). Blandino, Macías e Cantero (2001) utilizando a regressão não-linear em MM clássico, obtiveram um K_m de 18 (± 6) mM na temperatura de 35 °C e pH 5,1. Hsu *et al.* (2011) imobilizaram GOD em nanopartículas de prata para a construção de um biossensor e, no estudo cinético, obtiveram um K_m de 7,5 mM. Gao, Gorujean e Mano (2009) estudando a cinética da GOD (37°C e pH 7,4) obtiveram um K_m de 11,9 mM. A partir desses resultados da literatura podemos afirmar que o estudo cinético da GOD, ilustrado na Figura 2.11 e cujos parâmetros cinéticos são mostrados na Tabela 2.2, apresentaram valores esperados.

Godjevargova, Dayal e Marinov (2003) comprovaram que quase não houve perda de atividade quando as enzimas GOD e CAT foram armazenadas à temperatura de 4°C, pH 5,8 por 60 dias, juntas e separadamente. Este trabalho também concluiu que a velocidade de oxidação da glicose com o sistema GOD/CAT é aproximadamente 2 vezes maior em comparação ao sistema apenas com a GOD, evidenciando a inibição de GOD pelo subproduto H₂O₂.

Figura 2.12 – Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten (inibição pelo substrato) aos dados experimentais de atividade da CAT em função da concentração de H_2O_2 , a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões de replicatas.



Segundo Chelikani, Fita e Loewen (2004) existem cerca de 16 tipos principais de CAT, e todos esses tipos de enzimas não seguem a cinética clássica de MM (com exceção às concentrações baixas de substrato). Também afirmam que aplicando o método de linearização de Lineweaver–Burk à cinética da CAT pode-se obter valores de K_m na faixa de 38 a 599 mM. Switala e Loewen (2002), comparando diferentes CAT nas faixas de concentração de peróxido de hidrogênio não-inibitória, concluíram que a CAT de fígado bovino possui um K_m de 93 mM, na temperatura de 37°C e pH 7 (obtido a partir da linearização da Equação de Michaelis-Menten). Com isso, conclui-se que apesar dos vários tratamentos aos dados cinéticos e diferentes faixas de estudo, os parâmetros de Michaelis-Menten (com inibição de substrato) obtidos neste trabalho apresentam o mesmo valor de grandeza aos reportados na literatura (Tabela 2.2).

4 CONCLUSÕES

A conversão multienzimática de sacarose em ácido glucônico requer a ação sinérgica de três enzimas, invertase, glicose oxidase e catalase. Para se obter um bom desempenho de cada biocatalisador no biorreator, as condições operacionais devem ser adequadamente selecionadas, tendo-se em vista a otimização das atividades enzimáticas e suas estabilidades operacionais.

O estudo cinético das enzimas invertase, GOD e CAT quanto à temperatura e ao pH de máxima atividade catalítica mostraram que as atividades máximas das enzimas ocorrem a 45°C, pH 5,0; 55°C, pH 6,0 e 25°C, pH 8,0; respectivamente. A partir dos perfis de atividade em função do pH e da temperatura, pré-selecionou-se neste trabalho condições em que as enzimas pudessem ser estabilizadas com alta atividade catalítica. Com o estudo de estabilidade concluiu-se que a melhor condição para a produção do ácido glucônico é a de 40°C e pH 6,0; no qual constatou-se que invertase, a GOD e a CAT possuem meias-vidas muito semelhantes, em torno de 100 h.

Na sequência, um estudo cinético foi proposto nas condições de 40°C e pH 6,0, para o melhor entendimento dos modelos cinéticos com e sem inibição das enzimas invertase, GOD e CAT.

A cinética da enzima invertase seguiu o modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato, com valores ajustados de K_m de 133,27 mM, V_{max} de 1.285,11 $\mu\text{M}/\text{min}$ e K_I igual a 1.114,46 mM. Conhecendo as concentrações de sacarose que a invertase apresenta inibição, poderemos estimar com mais confiabilidade a razão enzimas/substrato para operação em regime de batelada em biorreator airlift.

O modelo clássico de Michaelis-Menten (MM) foi ajustado aos dados experimentais da GOD em que se observou K_m de 7,26 mM e V_{max} 80,23 $\mu\text{M}/\text{min}$. Segundo Bao *et al.* (2003), a GOD é uma enzima inibida pelo produto, contudo, o parâmetro de inibição só pode ser estimado em ensaios de longa duração. Entretanto, os ensaios cinéticos da GOD foram realizados com suas velocidades iniciais em que a concentração de produto ainda é baixa, justificando o modelo clássico de MM. Ressalta-se que para a GOD, uma enzima de mecanismo bissubstrato (glicose e oxigênio), avaliou-se nesta etapa do trabalho apenas a influência da concentração de glicose, mantendo-se a concentração de oxigênio em excesso e constante. Na próxima etapa de trabalho, tem-se a intenção de avaliar a real influência do oxigênio na catálise da GOD em bateladas clássicas no reator airlift.

O modelo de inibição pelo substrato foi o que melhor se ajustou à cinética da CAT ($K_m = 124,47$ mM; $V_{max} = 229,57$ $\mu\text{M}/\text{min}$ e $K_I = 136,61$ mM). Não podemos afirmar se realmente ocorre uma inibição de substrato, uma vez que o peróxido de hidrogênio tem alta capacidade oxidante e este pode atacar a estrutura da CAT, inativando-a. Os modelos cinéticos propostos servirão para a estimativa futura das relações enzimas/substrato (m/m) a serem empregadas na produção de ácido glucônico em biorreatores airlift.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Departamento de Engenharia Química- DEQ - UFSCar, ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), à LNF Latino Americana[®] pela doação da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]) e à Granotec do Brasil S.A. pela doação da glicose oxidase de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÁNYI, N. *et al.* Hydrogen peroxide producing and decomposing enzymes: their use in biosensors and other applications. *Industrial enzymes*. Section E, 441-459, 2007.

ALEKSANYAN, E. R.; MARKOSYAN, L. S. Microbial β -fructofuranosidase (survey). *Appl Biochem Microbiol*, 22: 133-45, 1986.

ARRUDA, L. M. O.; VITOLLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81: 23-33, 1999.

BADINO, A.C.; HOKKA, C.O; CERRI, M. O. Sistema reacional pneumático e uso do mesmo. Brasil. PI 0701608-5, 2007.

BANKAR, S. B. *et al.* Glucose oxidase - an overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 489-501. 2009.

BAO, J. *et al.* K.Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 69-72. 2003.

BARBOSA, E. F. *Avaliação da atividade da invertase de Saccharomyces cerevisiae imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana*. 62 f. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Dissertação, 2009.

BARTOSZEK, M.; SULKOWSKI, W. W. The study of pH influence on bovine liver catalase by means of UV-VIS spectroscopy and spin labelling method. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15, n. 4A, p. 41-43, 2006.

BLANDINO, A.; MACÍAS, M.; CANTERO, D. Immobilization of glucose oxidase with in calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*. v. 36, p.601–606, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. *Introdução a Química de Alimentos*. Fund. Cargill, 1985.

BOWSKI, L. *et al.* Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. *Biotechnology Bioengineering*, v.13, p 641-656, 1971.

CECCHI, H. M. *Fundamentos teóricos e práticos na análise de alimentos*. 2º edição. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

CHANCE, B. Effect of pH upon the reaction kinetics of the enzyme-substrate compounds of catalase, 1951.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* v. 61, p.192–208, 2004.

CHISTI, Y. Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena. *Appl. Mech.* v. 51, p. 33-112, 1998.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M., Communication to the editor, on the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* v. 34, p. 1391-1392, 1989.

COURJEAN, O.; MANO, N. Recombinant glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* for efficient bioelectrochemical applications in physiological conditions. *J Biotechnol.*; 151(1):122-9. 2011.

CRUZ, V. A. *et al.* Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245 hydrolysis of inulin from several sources. *Rev. de Microbiologia*, v. 29, p. 301-306, 1998.

FITA, I.; ROSSMAN, M. G. The active center of catalase. *J. Mol. Biol.* 185, 21-37, 1985.

GAO, F.; COURJEAN, O.; MANO, N. An improved glucose/O₂ membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification. *Biosens. Bioelectron.* v. 25, p. 356-361, 2009.

GODJEVARGOVA, T.; DAYAL, R.; MARINOV, I. Simultaneous covalent immobilization of glucose oxidase and catalase onto chemically modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, p. 4057-4063, 2003.

GODJEVARGOVA, T.; DAYAL, R.; TURMANOVA, S. Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. *Macromol. Bioscience*, v. 4, p. 950-956, 2004.

GUO, Y. *et al.* Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, 162(2):498-509, 2010.

HANOVER, M. L.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J. Clin. Nutr.*;58(suppl):724S-32S, 1993.

HSIEH, H. J.; LIU, P. C.; LIAO, W. J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnol Lett*; 22:1459–64, 2000.

HSU, F. *et al.* Silver nanoparticles as a glucose oxidase immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 58, p.756-760, 2011.

HUSSAIN, A. *et al.* Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* v.47, p.188-194, 2009.

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

KIM, K. K.; FRAVEL, D.; PAPAVIDAS, G. Production, purification, and properties of glucose oxidase from the biocontrol fungus *Talaromyces flavus*. *Can J Microbiol.* v.36, p. 199 – 205, 1990.

KISELER, N. A.; SPITZBERG, C. L.; VAINSTEIN, B. K. *J. Mol. Biol.* 25,433, 1967.

KULP, K. Carbohydrases. In: Reed G, editor. *Enzymes in food processing*. New York: Academic Press. p.53-122, 1975.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.

LESKOVAC, V. *et al.* Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v.37, p. 731–750, 2005.

- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265–75, 1951.
- MARQUEZ, L. D. S. *et al.* Otimização da imobilização de invertase por adsorção em resina de troca iônica para a hidrólise de sacarose, *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 86-92, 2007.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31(3), p.426-428, 1959.
- MIWA, A. C. P. *Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização*. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. Dissertação p.133, 2003.
- NAKAO, K. *et al.* Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. *Chem.Eng.Science*, p. 4127-4133, 1997.
- NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474-478, 1972.
- POLAINA, J.; MAC CABE, A. P. *Industrial Enzymes: structure, function and applications*, 2007.
- RAMACHANDRAN, S. *et al.* Gluconic Acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44, n.2, p. 185-195, 2006.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto, 2004.
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chemistry*, v. 94, p. 573-579, 2006.
- SANTANA, L. N. S. *et al.* Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. *XII Seminário de Iniciação Científica UFU*, 2008.
- SANTOS, A. F. dos. *Imobilização de invertase comercial e de Saccharomyces cerevisiae em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar*. 93 f. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Dissertação, 2010.

SCANDALIOS, J. G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A. N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression, pp. 343–406 in oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997.

SHANKAR, V.; KOTWAL, S. M. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*. v.27, p.311–322, 2009.

SILVA, A. R. da. *Conversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glucônico usando reatores descontínuo e contínuo*. Universidade de São Paulo, Dissertação, 2010.

SUGUNAN, S.; SANJAY, G. Invertase immobilized on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. *Catalysis Communications*, v. 6, 2005.

SWITALA, J.; LOEWEN, P. C. Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 401, p.145–154, 2002.

VASILE, L.; IOANA, V. S.; DORIN, P. Comparative studies on invertase activity in strains of genus *Saccharomyces* yeast immobilized sodium alginate. *Analele Universităţii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentară*, 2010.

WANG, W. *et al.* Purification and characterization of a psychrophilic catalase from *Antarctic Bacillus*. *Can. J. Microbiol.* 54, 823-828, 2008.

WILLIAMS, R.S. *et al.* Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene. 1985.

WISEMAN, A.; WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. *Process Biochemistry*, v.10, p.24-30, 1975.

WITT, S. *et al.* Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D glucose. *J Biochem*, 2000.

WITT, S.; SINGH, M.; KALISZ, H. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* v.64(4), p.1405–11, 1998.

WONG, C; WONH, K.; CHEN, X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biot.*, v.78, p. 927–938, 2008.

YAMAGUCHI, H. *et al.* Gene cloning and biochemical characterization of a catalase from *Gluconobacter oxydans*. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 522-527, 2011.

YORUK, I. H.; DEMIR, H.; EKICI, K.; SAVRAN, A. Purification and properties of catalase from Van Apple (*Golden delicious*). *Pak. J. Nutr.*, 4:8-10, 2005.

CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO

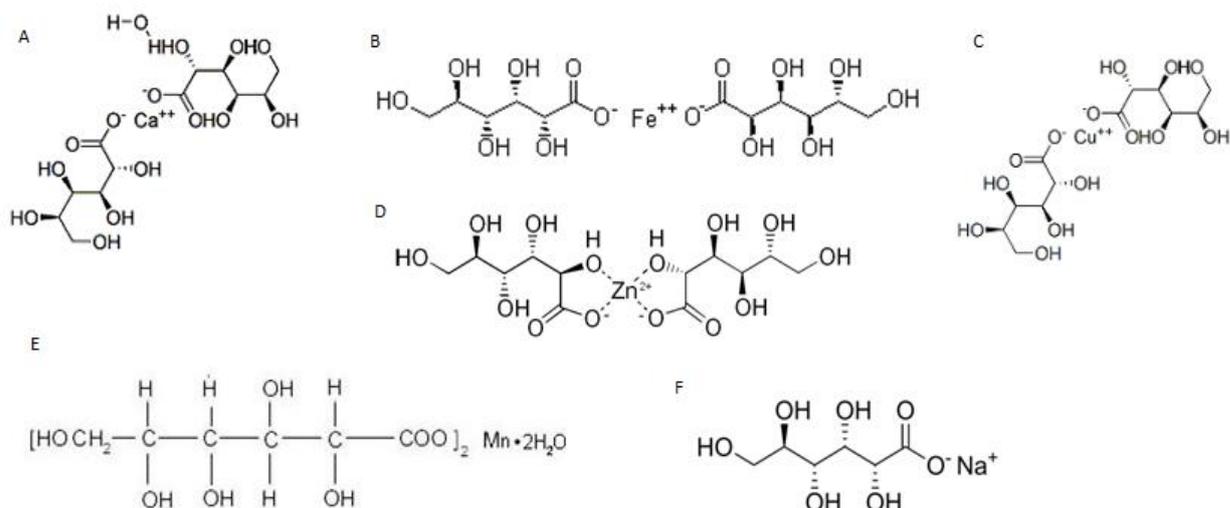
Neste capítulo é apresentado um estudo de revisão bibliográfica sobre o ácido glucônico e seus derivados e, são discutidas as vias de produção do ácido glucônico. Na sequência propôs-se a otimização das concentrações mínimas de enzimas para posteriormente, realizar-se a produção de ácido glucônico (via multienzimática).

Agnes Cristina Oliveira Mafra, Felipe Fernando Furlan, Alberto Colli Badino Jr e Paulo Waldir Tardioli.

1 INTRODUÇÃO

Ácido glucônico (AG) é um ácido orgânico fraco, caracterizado por ser um pó branco, inodoro e cristalino. O ânion gluconato é quelante dos íons Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , K^+ e Na^+ , o que dá origem a derivados como os gluconatos de cálcio (anidro e mono-hidrato), sódio e potássio (anidro), mostrados na Figura 3.1 (BROOKES & NEVILLE, 2005).

Figura 3.1 – Principais derivados do ácido glucônico: (A) gluconato de cálcio, (B) gluconato de ferro, (C) gluconato de cobre, (D) gluconato de zinco, (E) gluconato de manganês e (F) gluconato de sódio.



Fonte: Acervo próprio.

O AG e seus derivados podem ser encontrados naturalmente em produtos como vinho e mel. Atualmente o ácido glucônico, o gluconato de sódio, de potássio, de cálcio e a glucoactona são aprovados como aditivos alimentares pela comissão europeia de regulação de fármacos e alimentos. Esta comissão concluiu que não há provas que demonstrem perigos na ingestão dos mesmos. A FDA (Food and Drug Administration) regulamentou o uso do ácido glucônico e seus derivados, atribuindo-lhes o selo de segurança alimentícia GRAS (Generally Recognized As Safe) (MAGNUSON & LASURE, 2004) permitindo assim seu uso em processos de fabricação de produtos alimentícios como, vinhos, refrigerantes, vinagres, carnes, sucos de fruta, produtos lácteos, arroz e mel (YU & SCOTT, 1997; SINGH & KUMAR, 2007).

As principais aplicações do ácido glucônico (glucoactona hidrolisada) estão baseadas nas suas características físico-químicas (Tabela 3.1). Por ser um ácido fraco e capaz de dissolver óxidos, hidróxidos e carbonatos de cátions polivalentes, podem formar complexos solúveis e estáveis em água sem atacar as superfícies metálicas, características estas exploradas na fabricação de peças de ferro e alumínio.

Tabela 3.1 – Propriedades do AG e seus principais derivados.

	Gluconato de sódio	Glucoactona	AG	Gluconato de cálcio	Gluconato de potássio
Densidade (20°C) (g/cm³)	1,789	1,68	1,23	0,3 – 0,65	0,80
Solubilidade em água 25°C (g/L)	590	590	1000	35	450 – 1000 (20°C)
pk_a	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7

O gluconato de cálcio é o principal sal de interesse industrial, sendo este obtido a partir da cristalização de uma solução concentrada de ácido glucônico previamente neutralizada com carbonato de cálcio (BAO *et al.*, 2001a). O gluconato de sódio é o sal de sódio do ácido glucônico, forma com facilidade quelatos estáveis com o ferro, alumínio, zinco, cálcio e outros metais pesados, por isso, possui uma boa atividade sequestrante em banhos de limpeza, aplicados na indústria têxtil, metalúrgica e de papel. Além disso, o gluconato de sódio é utilizado em adoçantes artificiais ajudando no melhoramento do atraso gustativo que o aspartame, a sacarina e o ciclamato possuem. Os gluconatos de sódio e cálcio são utilizados como suplementos nutritivos em produtos embutidos (salsicha e linguiça), por

possuírem propriedades de retenção de água nesses produtos. O gluconato de potássio é muito solúvel em água, facilitando seu uso para fármacos líquidos. A glucolactona é utilizada especialmente quando há a necessidade de alteração gradual do pH, uma vez que há a reversibilidade entre o ácido e a sua forma lactona (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006).

Tabela 3.2 – Principais patentes de produção de ácido glucônico.

Número da patente	Ano da patente	Autor (es)	Processo patenteado
US4460686	1984	HARTMEIER, W.	Oxidação da glicose em AG através de enzimas imobilizadas (GOD/CAT), em reator batelada.
EP0322723	1990	YOSHIO, I.; YUTAKA, K.; NOBUO, K.; NOBUHIRO, M.	Produção de AG e sorbitol por <i>Zymomonasmobilis</i> a partir de glicose e frutose.
EP649899	1995	KIYOSHI, A ; YOSUO , M	Produção de AG por fungos filamentosos.
BR9403981	1996	JONAS, R. H. H. H.; MOURA-DE-SILVEIRA M.; CASTILHO-LOPES-DE-COSTA, J. P	Produção de gluconatos e etanol por <i>Zymomonassp.</i> com precipitação seletiva de gluconatos.
WO9635800	1995	VROEMEM, A. J.; BEVERINI, M	Conversão de glicose, com concentrações maiores que 10% (m/v), em AG por meio das enzimas GOD e CAT.
5962286	1999	ANASTASSIADIS, S.; AIVASIDIS, A.; WANDREY, C.	Produção de AG por <i>Aureobasidium ullulans</i> .
US005897995	1999	VROEMEN, A. J.; BEVERINI, M.	Produção de AG e gluconatos por processo multienzimático (GOD/CAT).
EP0745677	2002	VROEMEN, A. J.; BEVERINI, M.	Conversão de glicose, com concentrações menores que 15% (m/v), em AG por meio das enzimas GOD e CAT.
EP0870052	2005	LANTERO, O. J.	Processo multienzimático (GOD/CAT) de produção de AG, a partir de glicose (30% m/m) e separação do AG por spray-dried.
EP2457990	2012	Sika Technology AG	Processo enzimático (GOD/CAT) de produção de AG, a partir de glicose em reator pneumático.

Fonte: <http://www.freepatentsonline.com> (acesso 21/10/2012).

Industrialmente o AG é produzido a partir de fermentação, usando como catalisador o fungo *Aspergillus niger*, que excreta o AG. Na primeira etapa a glicose oxidase oxida a glucopirranose a glucolactona, que espontaneamente ou por ação da enzima gluconolactonase é hidrolisada a AG. Na segunda parte, a CAT decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio molecular, etapa importante uma vez que o H_2O_2 oxida os resíduos de metionina da GOD (SINGH, KAPUR & SINGH, 2005). A descoberta da CAT para o aumento na produção do AG é refletido nas inúmeras patentes desenvolvidas nas décadas de 80 e 90 e posteriormente desenvolveram-se inúmeros processos para tornar a produção de AG mais rentável, com o uso de reatores contínuos e/ou imobilização de células e enzimas (Tabela 3.2).

Entretanto, existem algumas desvantagens no processo fermentativo, pois as culturas precisam de meios ricos em variados nutrientes (dificultando o controle da fermentação), a bioconversão pode levar dias, além dos inúmeros subprodutos produzidos concomitantemente, elevando os custos de produção com várias purificações necessárias (NAKAO *et al.*, 1997). Também pode ser produzido a partir da catálise química, utilizando-se catalisadores como o paládio, a platina ou o ouro e também pela catálise eletroquímica (RAMACHANDRAN *et al.*, 2006). A rota enzimática tem sido considerada a mais viável na sua produção, podendo-se obter até 100% de conversão de glicose em ácido glucônico (WONG, WONH & CHEN, 2008) e já comprovado por Silva (2010). Além disso, o processo enzimático é considerado mais favorável do ponto de vista ambiental e econômico (BANKAR *et al.*, 2009; GODJEVARGOVA, DAYAL & TURMANOVA, 2004).

Neste contexto, o objetivo desta etapa do trabalho foi obter ácido glucônico a partir de sacarose em batelada clássica em reator airlift, por meio da catálise multienzimática, em que as enzimas invertase, glicose oxidase (GOD) e catalase (CAT) são responsáveis, respectivamente, pela inversão da sacarose, oxidação da glicose e decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para isso, propôs-se uma estimativa das relações enzimas/substrato a partir da simulação do processo batelada com base nas cinéticas enzimáticas propostas no Capítulo 2 (Tabela 2.2). Na sequência, foram confrontados os dados obtidos experimentalmente com os simulados, e assim, a partir de um ajuste das equações cinéticas da invertase (Michaelis-Menten com inibição de substrato), GOD (modelos de Bi-Bi Ping-Pong, e Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produtos – H_2O_2 e AG) e CAT (Michaelis-Menten com inibição de substrato), puderam ser estimados novos parâmetros cinéticos, bem como o coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas as enzimas invertase (EC 3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]), glicose oxidase (EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e catalase (EC 1.11.16) de fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]). Sacarose (99,9% de pureza, Sigma-Aldrich[®]) e os demais reagentes empregados eram de grau analítico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Otimização das condições de operação

O processo para a produção de ácido glucônico a partir de sacarose foi simulado no software Scilab[®] utilizando os modelos cinéticos obtidos para as enzimas invertase, GOD e CAT (Tabela 2.2), com o intuito de estimar as concentrações ótimas de enzimas num processo em batelada em reator aerado, no qual as reações de hidrólise da sacarose, oxidação da glicose e decomposição do H₂O₂ ocorrem simultaneamente. Neste reator, oxigênio foi suprido continuamente e supôs-se na simulação uma condição de alta velocidade de transferência de oxigênio de forma que esse reagente estivesse em excesso no reator. Na condição inicial do processo, considerou-se que o reator era carregado apenas com solução de sacarose com concentração de 50 g/L. Desta forma, pode-se definir valores de concentração de enzimas envolvidas nas reações para que o ensaio tivesse duração de 4 h. Salienta-se que esta etapa do trabalho foi determinante, uma vez que não é possível estipular arbitrariamente as quantidades de enzimas (invertase, GOD e CAT) que em determinado tempo irão catalisar uma dada quantidade de substrato. Para isso, é necessário considerar as informações sobre a cinética global do processo multienzimático assim como os balanços de massa para os componentes envolvidos.

O consumo de sacarose e as formações de glicose e frutose por ação da enzima invertase é descrita pela cinética de Michaelis-Menten (MM) com inibição pelo substrato, que pode ser expressa pela Equação 3.1:

$$r_{sacarose} = \frac{K_{cat,i} \cdot C_{invertase} \cdot C_{Sacarose}}{C_{sacarose} + K_{m,invertase} + \frac{C_{Sacarose}^2}{K_{I,invertase}}} \quad (3.1)$$

Onde:

$r_{sacarose}$ = velocidade de consumo de sacarose (μM/min);

$K_{cat,i}$ = número de *Turnover* da invertase (min^{-1});

$C_{invertase}$ = concentração da enzima invertase (μM);

$C_{sacarose}$ = concentração de sacarose (mM);

$K_{m,invertase}$ = constante de MM da enzima invertase (mM);

$K_{I,invertase}$ = constante de inibição pelo substrato (mM).

Conforme demonstram Bao *et al.* (2003), o consumo de glicose pela enzima GOD na etapa dois, considerando o mecanismo cinético Bi-Bi Ping-Pong e o inibidor competitivo (subproduto H_2O_2), pode ser descrito pela Equação 3.2:

$$r_{glicose} = \frac{K_{cat,GOD} \cdot C_{GOD}}{1 + \frac{K_{m,glicose}}{C_{glicose}} + \frac{K_{m,O_2}}{C_{O_2}} \cdot \left(1 + \frac{C_{produto}}{K_{I,GOD}}\right)} \quad (3.2)$$

Onde:

$r_{glicose}$ = velocidade de consumo de glicose ($\mu\text{M}/\text{min}$);

$K_{cat,GOD}$ = número de *Turnover* da GOD (min^{-1});

C_{GOD} = concentração da GOD (μM);

$C_{glicose}$ = concentração de glicose (mM);

C_{O_2} = concentração de oxigênio (mM);

$C_{produto}$ = concentração de produto H_2O_2 (mM);

$K_{m,glicose}$ = constante de MM da GOD para o substrato glicose (mM);

K_{m,O_2} = constante de MM da GOD para o substrato oxigênio (mM);

$K_{I,GOD}$ = constante de inibição pelo produto H_2O_2 (mM).

Para esta etapa do trabalho, consideramos a hipótese de que a concentração de oxigênio no meio reacional é alta em comparação à constante de saturação para o oxigênio (K_{m,O_2}), a razão $K_{m,O_2}/C_{O_2}$ é muito menor que a razão $K_{m,glicose}/C_{glicose}$. Portanto, reescrevendo a Equação 3.2, a reação da catálise da glicose a AG, utilizando oxigênio molecular como acceptor de elétrons, pode ser descrita pelo modelo cinético clássico de Michaelis-Menten:

$$r_{glicose} = \frac{K_{cat} \cdot C_{GOD} \cdot C_{glicose}}{C_{glicose} + K_{m,glicose}} \quad (3.3)$$

Onde:

$r_{glicose}$ = velocidade de consumo de glicose ($\mu\text{M}/\text{min}$);

$K_{cat,GOD}$ = número de *Turnover* da GOD (min^{-1});

C_{GOD} = concentração da GOD (μM);

$C_{glicose}$ = concentração de glicose (mM);

$K_{m,glicose}$ = constante de MM da GOD para o substrato glicose (mM).

Na terceira reação em que o H_2O_2 é decomposto pela ação da enzima CAT em H_2O e O_2 , como visto no Capítulo 2, a Equação de Michaelis-Menten (MM) com inibição pelo substrato (Equação 3.4) é adequada para explicar o mecanismo cinético da CAT.

$$r_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{K_{cat,CAT} \cdot C_{CAT} \cdot C_{\text{H}_2\text{O}_2}}{C_{\text{H}_2\text{O}_2} + K_{m,CAT} + \frac{C_{\text{H}_2\text{O}_2}^2}{K_{I,CAT}}} \quad (3.4)$$

Onde:

$r_{\text{H}_2\text{O}_2}$ = velocidade de consumo de H_2O_2 ($\mu\text{M}/\text{min}$);

$K_{cat,CAT}$ = número de *Turnover* da CAT (min^{-1});

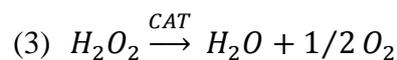
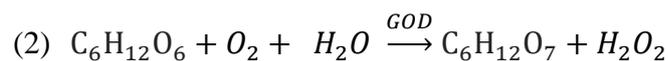
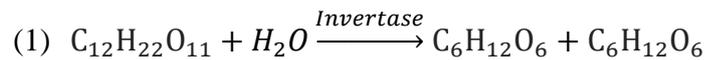
C_{CAT} = concentração da CAT (μM);

$C_{\text{H}_2\text{O}_2}$ = concentração de H_2O_2 (mM);

$K_{m,CAT}$ = constante de MM da CAT;

$K_{I,CAT}$ = constante de inibição pelo substrato H_2O_2 (mM).

Figura 3.2 – Processo multienzimático de sacarose a AG.



As equações que descrevem o modelo do processo multienzimático (Figura 3.2) são baseadas nos balanços de massa para a sacarose, glicose, frutose, H_2O_2 , AG e oxigênio em termos molares, para o reator operador em batelada:

$$r_{sacarose} = r_{glicose1} = r_{frutose1} = r_1 \quad (3.5)$$

$$r_{glicose2} = r_{AG2} = r_2 \quad (3.6)$$

$$r_{\text{H}_2\text{O}_2} = r_3 \quad (3.7)$$

$$\frac{dC_{sacarose}}{dt} = -r_1 \quad (3.8)$$

$$\frac{dC_{glicose}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (3.9)$$

$$\frac{dC_{frutose}}{dt} = r_1 \quad (3.10)$$

$$\frac{dC_{AG}}{dt} = r_2 \quad (3.11)$$

$$\frac{dC_{H_2O_2}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (3.12)$$

A otimização do sistema foi realizada utilizando a função “optmin_ga”, nativa do Scilab®. Esta emprega algoritmos genéticos (EDGAR, HIMMELBLAU & LASDON, 2001) para encontrar o possível ótimo global da função objetivo. A função objetivo escolhida consistiu na minimização da quantidade de enzimas utilizadas na batelada. Ao mesmo tempo, o sistema possui uma restrição de igualdade referente à concentração de ácido glucônico ao final da batelada, o qual deve ser equivalente a 99% da conversão máxima. A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros inseridos na função “optmin_ga”.

Tabela 3.3 – Valores utilizados para os parâmetros da função “optmin_ga”.

Número de indivíduos (Popsiz)	20
Número de gerações (Nbsiz)	20
Probabilidade de mutação (Prob_mut)	0.1*
Probabilidade de crossover (Prob_cross)	0.7*
Limite inferior das variáveis de busca (Min)	[0; 0; 0]
Limite superior das variáveis de busca (Max)	[2; 2; 0.1]

Nota: Os valores marcados com * representam os valores padrões.

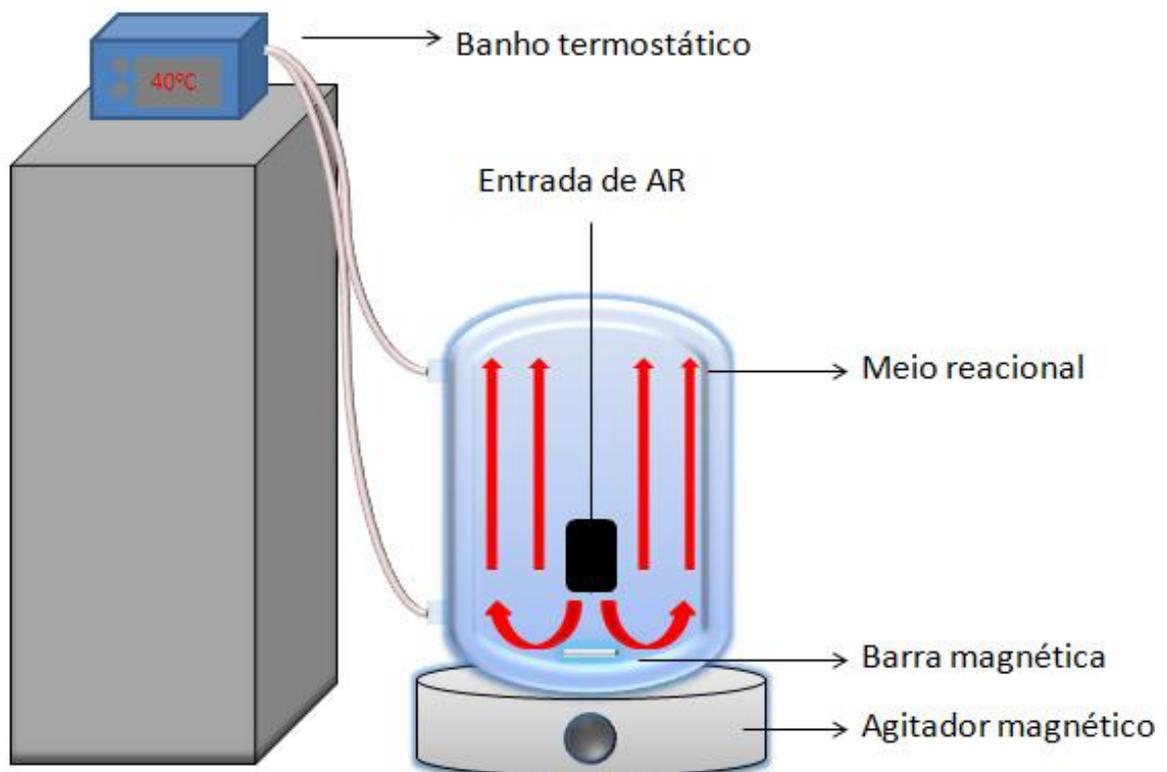
A restrição descrita anteriormente foi incorporada à função objetivo multiplicada por uma constante que determina o impacto da transgressão dessa restrição no valor da função objetivo. Assim, vários valores foram testados, até que o desvio se mantivesse constante. Como a função objetivo faz uso de valores de concentrações ao final da batelada, esta deve solucionar numericamente o conjunto de equações diferenciais ordinárias, que modelam o sistema proposto, para cada valor de concentração de enzimas dado pelo algoritmo de otimização. Empregou-se a função ode, nativa do Scilab, para solucionar o sistema de equações diferenciais ordinárias. Os parâmetros de ajuste dessa função foram mantidos em seus valores padrões, dado que o próprio algoritmo verifica se o sistema envolvido é rígido e escolhe o método adequado para solucioná-lo.

2.2.2 Hidrólise da sacarose em reator operado em batelada

A hidrólise da sacarose pela ação da enzima invertase de *Saccharomyces*

cerevisiae (Novozymes[®]) foi realizada em um reator com capacidade de 500 mL (Figura 3.3), contendo 300 mL de solução de sacarose 50 g/L, preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 6, onde foi adicionada 91.786,92 U de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]). O reator foi mantido agitado e aerado à temperatura de 40°C durante 2 h. A cada intervalo de 10 min foi retirada uma alíquota de 10 µL para a dosagem de glicose (formada) pelo método GOD-PAP (kit enzimático glicose oxidase-peroxidase-aminoantipirina da Doles[®]).

Figura 3.3 – Esquema representativo do processo de hidrólise da sacarose em batelada em reator agitado e aerado.



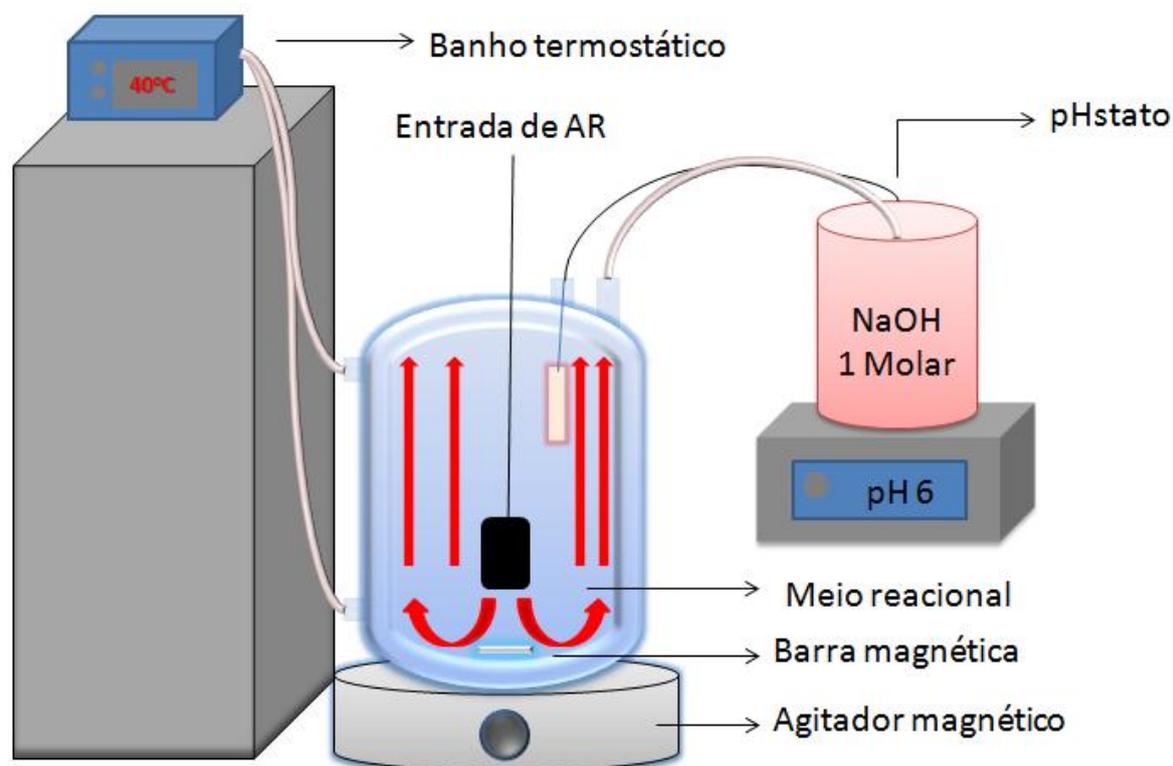
Fonte: Acervo próprio.

2.2.3 Oxidação da glicose em reator operado em batelada

A oxidação da glicose utilizando glicose oxidase de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]) foi realizada em um reator com capacidade de 500 mL (Figura 3.4), contendo 300 mL de solução de glicose e frutose nas concentrações de 26,32 g/L, preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 6, onde foi adicionada 412,13 U GOD de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e 8924 U de CAT de fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]). O reator foi mantido agitado e aerado à temperatura de 40°C

durante 4 h. O pH do meio reacional era mantido em 6,0 pela adição de NaOH 1M, controlado automaticamente por um pH-stat (Metrohm - 718 Titrino). A cada intervalo de 1 h foi retirada uma alíquota 10 μ L para a dosagem de glicose (consumida) pelo método GOD-PAP (kit enzimático glicose oxidase-peroxidase-aminoantipirina da Doles[®]).

Figura 3.4 – Esquema representativo do processo de oxidação da glicose em batelada em reator agitado e aerado com controle de pH.



Fonte: Acervo próprio.

2.2.4 Conversão de sacarose em AG em reator operado em batelada

A conversão de sacarose a ácido glucônico catalisada pelas enzimas invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]), glicose oxidase de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]) foi realizada em um reator com capacidade de 500 mL (Figura 3.4), contendo 300 mL de solução de sacarose 50 g/L, preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM e pH 6, onde foi adicionada 91.786,92 U de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]), 412,13 U GOD de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e 8.924 U de catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]). O reator foi mantido agitado e aerado à temperatura de 40°C durante 4 h. O pH do meio reacional era mantido em 6,0 pela adição de NaOH 1M, controlado automaticamente por um pH-stat (Metrohm - 718 Titrino). A cada intervalo de 1 h foi retirada uma alíquota 100 μ L para a

dosagem de ART, sacarose e AG conforme os métodos descritos nos itens 2.2.7, 2.2.8 e 2.2.9, respectivamente.

Os coeficientes de rendimento de substrato (sacarose) a produto (AG), $Y_{AG/Sacarose}$ teórico (estequiométrico), global e real, a eficiência (real e global) do processo em termos de AG (η) e a conversão global de sacarose ($X_{Sacarose}$) são calculados pelas equações (3.13) - (3.18):

$$(Y_{AG/Sacarose})_{teórico} = 1 \quad (3.13)$$

$$(Y_{AG/Sacarose})_{global} = \frac{\text{númerodemolsformados de AG}}{\text{número de mols de sacarose reagidos}^*} \quad (3.14)$$

$$(Y_{AG/Sacarose})_{real} = \frac{\text{númerodemolsformados de AG}}{\text{número de mols de sacarose inicial}} \quad (3.15)$$

$$\eta_{global}(\%) = 100 \cdot \frac{(Y_{AG/Sacarose})_{global}}{(Y_{AG/Sacarose})_{teórico}} \quad (3.16)$$

$$\eta_{real}(\%) = 100 \cdot \frac{(Y_{AG/Sacarose})_{real}}{(Y_{AG/Sacarose})_{teórico}} \quad (3.17)$$

$$X_{Sacarose}(\%) = 100 \cdot \frac{\text{númerodemolsdesacarosereagidos}}{\text{númerodemolsdesacaroseinicial}} \quad (3.18)$$

Nota: *O número de mols de sacarose reagidos corresponde ao número de mols efetivamente convertidos em AG. Para esse cálculo levou-se em consideração o número de mols residuais de sacarose e glicose no meio reacional.

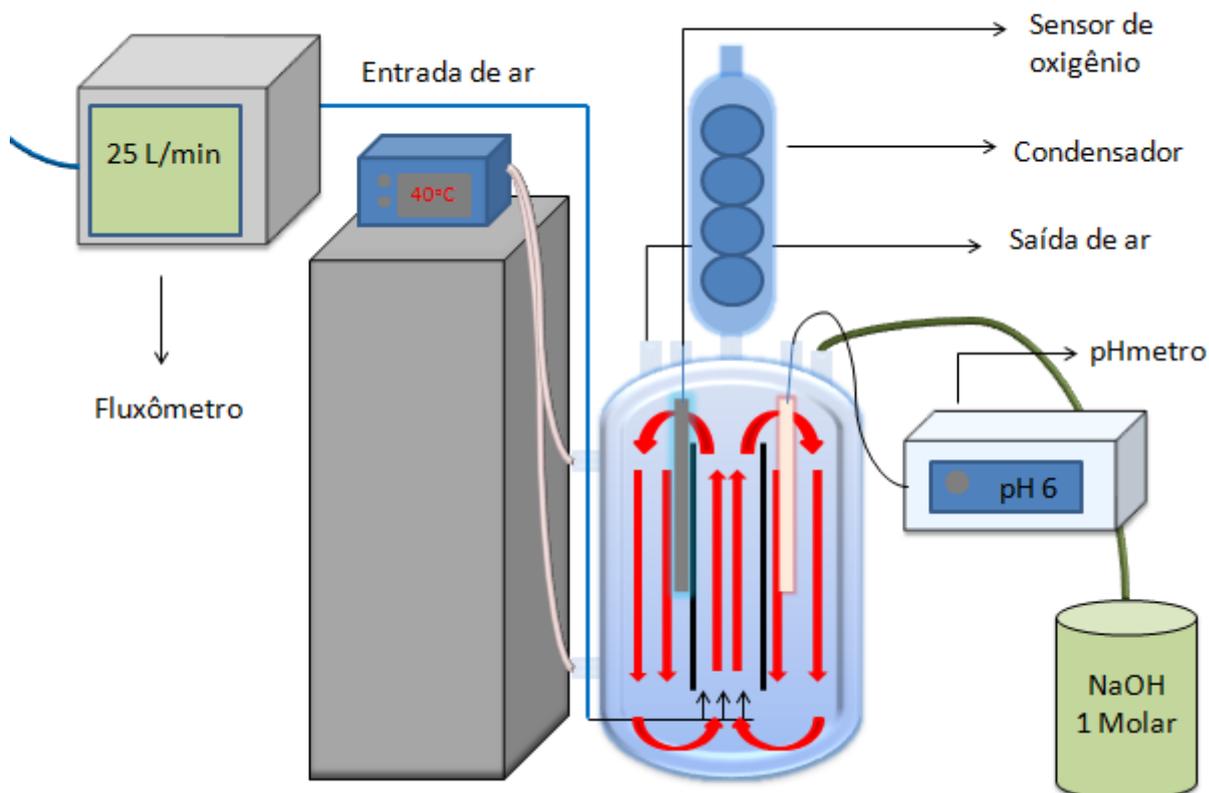
2.2.5 Conversão de sacarose em AG em reator airlift operado em batelada

A batelada para a produção de AG foi conduzida em um biorreator airlift de tubos concêntricos (Figura 3.5) de 2,5L de volume útil, com alimentação de ar de 25L/min, controlada por um fluxômetro de massa (AALBORG, modelo GFC37). A concentração inicial de sacarose foi de 50 g/L e as quantidades de enzimas obtidas conforme o item 2.2.1, quais sejam, 76.9968,67 U de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]), 3.434,41 U glicose oxidase de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]) e 75.885,04 U de catalase fígado bovino (Sigma-Aldrich[®]). A temperatura do biorreator foi controlada à 40°C e do condensador à 15°C através de circulação de água proveniente de banho ultratermostático (SL 152, SOLAB). O pH=6 foi mantido através de adição da solução de NaOH (1 M), sendo inicialmente mantido pela solução tampão fosfato de sódio 100 mM. A cada intervalo de 30 min foi retirada uma alíquota 200 µL para a dosagem de ART, sacarose e AG conforme os métodos descritos nos itens 2.2.7, 2.2.8 e 2.2.9, respectivamente.

Os coeficientes de rendimento de substrato (sacarose) a produto (AG), $Y_{AG/Sacarose}$ teórico (estequiométrico), global e real, a eficiência (real e global) do processo em

termos de AG (η) e a conversão global de sacarose (X_{Sacarose}) são calculados pelas equações (3.13) - (3.18).

Figura 3.5 – Esquema representativo do sistema experimental utilizado para a produção de ácido glucônico em reator airlift.

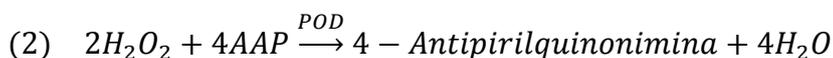
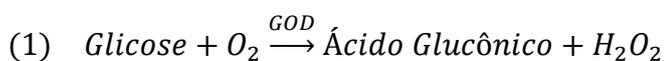


Fonte: Acervo próprio.

2.2.6 Quantificação da concentração de glicose

A dosagem da glicose foi feita pelo método enzimático da glicose oxidase (GOD)-peroxidase (POD)-Aminoantipirina (AAP), usando o Kit GOD-PAP da Doles[®].

Ao adicionar-se glicose em uma solução tamponada contendo p-hidroxibenzoato, 4-Aminoantipirina (4-AAP), Glicose Oxidase e Peroxidase processam-se as seguintes reações:



O produto formado pela oxidação de 4-Aminoantipirina (4-

Antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro, com absorção máxima em 510nm.

Composição do kit enzimático:

Reagente de cor: Solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,45 ± 0,1, Aminoantipirina 0,03 mM e p-Hidroxibenzoato de sódio 15 mM. Contém, ainda, um mínimo de 12 KU de glicose oxidase e 0,8 KU de Peroxidase por litro.

Solução padrão 100mg/dL: solução aquosa contendo 100 mg/dL de glicose.

Procedimento experimental: Adicionar os reagentes conforme mostra a Tabela 3.4, agitar e incubar por 5 minutos em banho-maria, a 37°C. Proceder à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, em 510nm, zerando o aparelho com o branco. A cor final da reação permanece estável por 20 minutos, à temperatura ambiente (20 - 30°C).

Tabela 3.4 – Procedimento experimental da quantificação de glicose pelo Kit enzimático GOD-PAP.

	B	T	P
Reagente de Cor	1 mL	1 mL	1 mL
Amostra	-	10 µL	-
Solução Padrão	-	-	10 µL

Nota: (B) branco (P) padrão e (T) teste.

A concentração de glicose pode ser determinada pela Equação (3.21):

$$\text{Concentração de glicose}(mg. dL^{-1}) = \frac{Abs \text{ Amostra}}{Abs \text{ Padrão}} \cdot 100 \quad (3.19)$$

2.2.7 Quantificação da concentração de ácido glucônico

A concentração de ácido glucônico no meio reacional foi determinada por cromatografia líquida de troca iônica em um cromatógrafo Waters, equipado com detector UV Waters410. Os compostos eram separados em uma coluna Aminex HPX87-Ha 30°C utilizando-se como fase móvel ácido sulfúrico (5 mM) com fluxo de 0,6 mL/min, sendo o composto detectado a 210 nm.

2.2.8 Quantificação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

A determinação de ART (açúcares redutores totais) foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico – DNS (MILLER, 1959). Este método baseia-se na redução do

DNS em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ocorrendo a oxidação do grupo aldeído ou cetônico de uma hexose a grupos carboxílicos. A concentração de ART foi expressa como equivalentes de glicose a partir de uma curva padrão.

O método consiste em adicionar os reagentes conforme mostra a Tabela 3.5, ferver por 5 min e levar a um banho de gelo por 10 min, adicionar 7,5 mL de água e ler a absorvância a 540 nm em um espectrofotômetro previamente calibrado com o branco.

Tabela 3.5 – Procedimento experimental da quantificação de ART.

Tubo	Água	Amostra	Reagente de DNS
B	2500 µL	-	1000 µL
A	2300 µL	200 µL	1000 µL

Nota: (B) branco e (A) amostra.

2.2.9 Quantificação da concentração de sacarose

A concentração de sacarose no meio reacional foi determinada por cromatografia líquida de troca iônica em um cromatógrafo Waters, equipado com detector infravermelho. Os compostos eram separados em uma coluna Shodex KS802, a 80°C, utilizando-se como fase móvel água Milli-Q com fluxo de 1mL/min.

2.2.10 Ajuste de novas equações cinéticas aos dados experimentais de produção de AG em airlift

Um ajuste das equações cinéticas da invertase, GOD e CAT foi proposto, com o objetivo de encontrar novos valores de constantes cinéticas ($K_{cat,i}$, $K_{cat,GOD}$, $K_{cat,CAT}$, $K_{m,invertase}$, $K_{m,glicose}$, K_{m,O_2} , $K_{m,CAT}$, $K_{I,invertase}$, $K_{I,GOD}$, $K_{I,CAT}$) que se adequassem melhor aos dados experimentais. Com esse intuito, empregou-se o software EMSO[®] (Environment for Modeling, Simulation and Optimization).

Considerou-se na cinética de consumo de sacarose e a formação de glicose e frutose da enzima invertase, a equação cinética de Michaelis-Menten com inibição de substrato (Equação 3.22). Para o consumo de glicose pela enzima GOD, consideram-se os modelos de Bi-Bi Ping-Pong (Equação 3.23) e Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produtos – H₂O₂ e AG (Equação 3.24). A cinética da decomposição do H₂O₂ foi expressa pela equação de Michaelis-Menten com inibição de substrato (Equação 3.25).

$$r_{sacarose} = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot C_{sacarose}}{C_{sacarose} + K_{m, invertase} + \frac{C_{sacarose}^2}{K_I}} \quad (3.20)$$

$$r_{glicose2} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_{m, glicose}}{C_{glicose}} + \frac{K_{m, O_2}}{C_{O_2}}} \quad (3.21)$$

$$r_{glicose2} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_{m, glicose}}{C_{glicose}} + \frac{K_{m, O_2}}{C_{O_2}} \cdot \left(1 + \frac{C_{H_2O_2} + C_{AG}}{K_I}\right)} \quad (3.22)$$

$$r_{H_2O_2} = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot C_{H_2O_2}}{C_{H_2O_2} + K_{m, CAT} + \frac{C_{H_2O_2}^2}{K_I}} \quad (3.23)$$

Consideram-se os seguintes balanços de massa para a sacarose, glicose, frutose, H₂O₂, AG e oxigênio, sendo que no balanço do oxigênio a simulação ajustou o melhor coeficiente de transferência de oxigênio.

$$r_{sacarose} = r_{glicose1} = r_{frutose1} = r_1 \quad (3.24)$$

$$r_{glicose2} = r_{AG2} = r_2 \quad (3.25)$$

$$r_{H_2O_2} = r_3 \quad (3.26)$$

$$\frac{dC_{sacarose}}{dt} = -r_1 \quad (3.27)$$

$$\frac{dC_{glicose}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (3.28)$$

$$\frac{dC_{frutose}}{dt} = r_1 \quad (3.29)$$

$$\frac{dC_{AG}}{dt} = r_2 \quad (3.30)$$

$$\frac{dC_{H_2O_2}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (3.31)$$

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - r_2 + \frac{1}{2} \cdot r_3 \quad (3.32)$$

Onde:

$r_{sacarose}$ = velocidade de consumo de sacarose (μM/min);

$r_{glicose1}$ = velocidade de formação de glicose (μM/min);

$r_{frutose1}$ = velocidade de formação de glicose (μM/min);

r_1 = velocidade da reação de hidrólise (μM/min);

$r_{glicose2}$ = velocidade de consumo de glicose na reação de oxidação (μM/min);

r_{AG2} = velocidade de formação de AG (μM/min);

$r_{H_2O_2}$ = velocidade de consumo de H₂O₂ (μM/min);

$C_{sacarose}$ = concentração de sacarose (mM);

C_{O_2} = concentração de oxigênio (mM);

$C_{H_2O_2}$ = concentração de H_2O_2 (mM);

$C_{glicose}$ = concentração de glicose (mM);

$C_{frutose}$ = concentração de frutose (mM);

$k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (min^{-1});

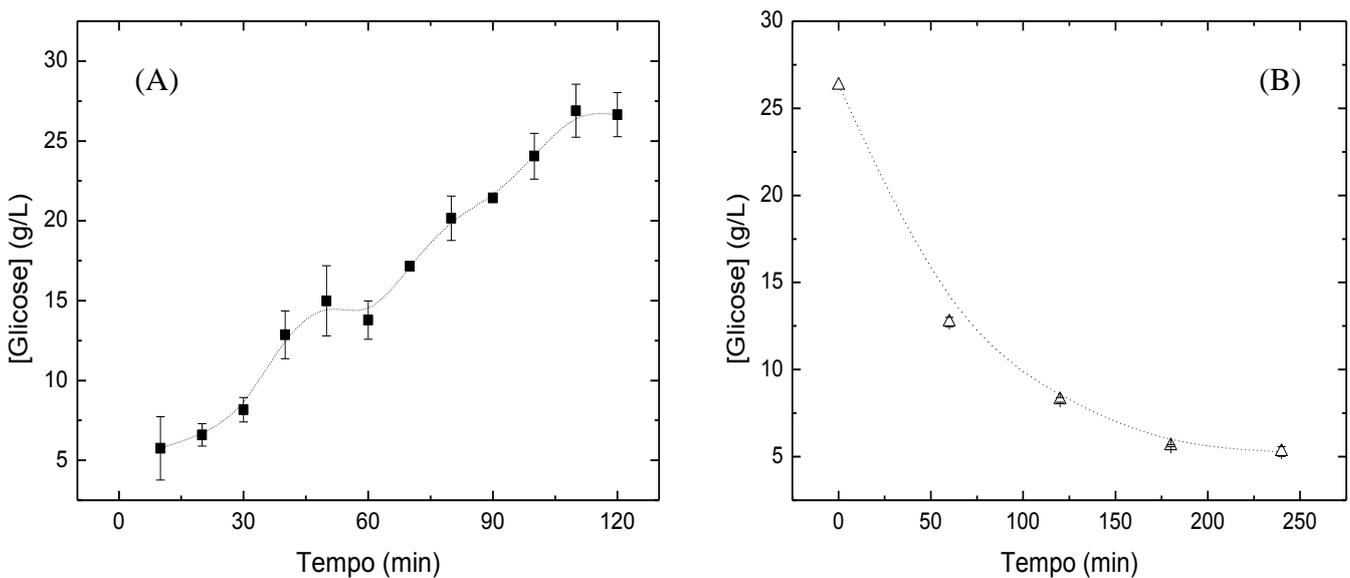
$C_{O_2}^*$ = concentração de oxigênio na saturação (mM).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ENSAIOS DE HIDRÓLISE DE SACAROSE E OXIDAÇÃO DE GLICOSE EM BATELADA EM REATOR AGITADO E AERADO

As relações enzima/substrato foram determinadas através dos modelos cinéticos das enzimas invertase, GOD e CAT propostos no Capítulo 2, utilizando a função “optmin_ga”. Para tal, definiu-se com meta a máxima hidrólise da sacarose no meio reacional (50 g/L), a máxima oxidação da glicose a AG e restringiu-se o acúmulo de H_2O_2 no meio reacional em 35 mM, para um ensaio em batelada de 4 h em condições de não limitação do processo pelo oxigênio.

Figura 3.6 – (A) Geração de glicose a partir de sacarose pela invertase solúvel e (B) consumo de glicose pelo sistema multienzimático GOD/CAT, em ensaios em batelada em reator agitado magneticamente e aerado, a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas.



Com os resultados deste estudo computacional, conduziu-se primeiramente a conversão de sacarose a glicose e frutose (Figura 3.6 - A), conforme descrito no item 2.2.2. Posteriormente, procedeu-se a oxidação da glicose utilizando GOD/CAT (Figura 3.6 - B), conforme descrito no item 2.2.3. As quantidades de glicose produzidas (reação de hidrólise) e consumida (reação de oxidação) foram acompanhadas através de análises utilizando o Kit enzimático GOD-PAP descrito no item 2.2.6. O primeiro ensaio teve como objetivo principal verificar uma possível inibição da atividade enzimática da invertase pelo O₂ e o segundo teve como objetivo investigar uma possível inibição da atividade da GOD pela presença de frutose no meio reacional.

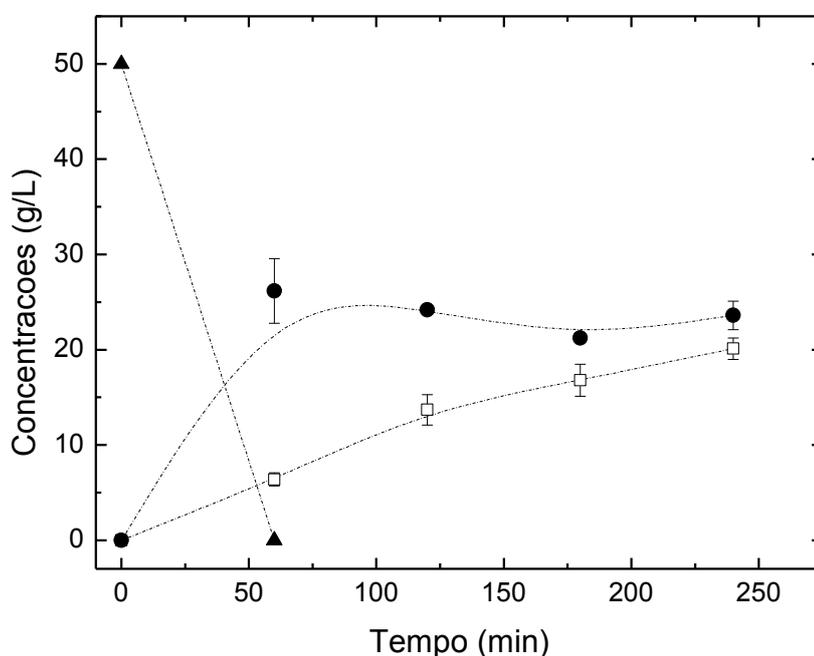
A enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]) foi testada na inversão da sacarose, em meio aerado e pH=6 controlado por tampão fosfato de sódio (100 mM) e temperatura de 40°C. Observa-se na Figura 3.6 que, para a razão $6.159 U_{invertase}/g_{substrato}$, invertase produziu $26,65 \pm 1,40$ g/L de glicose em 2 h. Neste experimento não se observou qualquer mudança de pH e nem uma possível inativação da enzima invertase no meio aerado nas 2 h de reação.

O sistema multienzimático GOD de *Aspergillus niger* e CAT de fígado bovino foi testado na oxidação da glicose em um meio reacional (300 mL) contendo 26,32 g/L de glicose e 26,32 g/L de frutose, aerado constantemente, com o pH 6 controlado por adição de hidróxido de sódio (1M) e meio tamponado (tampão fosfato, 100mM, pH 6), temperatura de 40°C, conforme descrito no item 2.2.3. Observou-se nas bateladas de oxidação (Figura 3.6 - A) que, para as razões $52,19 U_{GOD}/g_{glicose}$ e $21,65 U_{CAT}/U_{GOD}$, a reação consumiu $79,89 \pm 1,07\%$ da glicose disponível, em 4 h. Neste experimento, nota-se que a atividade enzimática da GOD deve ter sido afetada pela alta concentração de frutose, fenômeno comprovado por Jairajpuri, Fatima e Saleemuddin (2008) que observaram perda de 88% de atividade da GOD de *Aspergillus niger* quando incubada com 100 mM de frutose por 8 dias. Como a concentração de oxigênio dissolvido não foi medida, não se pode afirmar se havia disponibilidade de oxigênio suficiente para a reação de oxidação, contudo a presença de aeração não impediu a atividade catalítica das enzimas GOD e CAT.

3.3 ENSAIO EM BATELADA PARA A PRODUÇÃO DE AG EM BATELADA EM REATOR AGITADO E AERADO

A Figura 3.7 mostra desempenho catalítico da conversão multienzimática da sacarose em ácido glucônico, em processo batelada e biorreator airlift com alimentação de ar constante de 25 L/min, conforme descrito no item 2.2.5.

Figura 3.7 – Perfis de concentração de AG (\square), ART (\bullet) e sacarose (\blacktriangle) durante a conversão multienzimática de sacarose em AG durante ensaio em reator batelada em reator agitado magneticamente e aerado, a 40°C e pH 6,0 controlado por pHstato. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas.



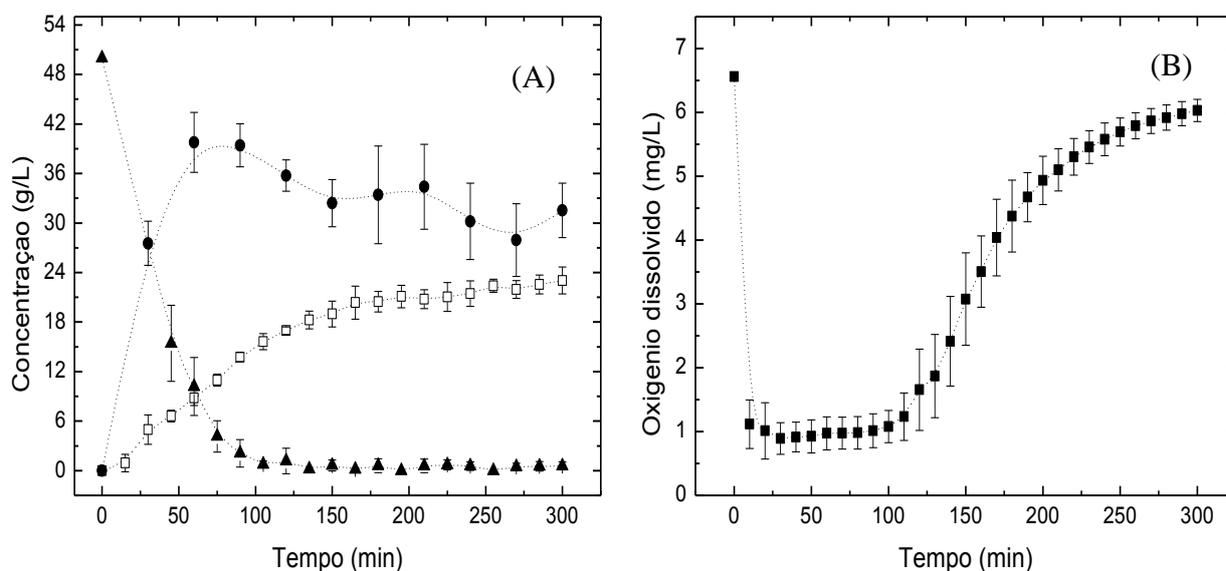
A eficiência real em AG foi de $70,19 \pm 3,92$ % (Figura 3.7) e a conversão de sacarose foi de $100 \pm 0,00$ % em 1h. Contudo neste experimento a vazão de alimentação de ar e a concentração de oxigênio dissolvido não foram medidas. Nota-se, também, que pode ter ocorrido o arraste mecânico da glicose ou frutose ou sacarose pela alta vazão de alimentação de ar, justificando a concentração de ART de $23,6 \pm 1,48$ g/L, abaixo do esperado.

Entretanto, como o objetivo desse experimento era testar as concentrações de enzimas calculadas a partir das simulações em Scilab[®] e comprovar a possibilidade do processo multienzimático de produção de AG a partir de sacarose em reator agitado aerado, o mesmo foi interrompido no tempo predeterminado.

3.4 BIOCONVERSÃO DE SACAROSE EM ÁCIDO GLUCÔNICO EM BIORREATOR AIRLIFT OPERADO EM BATELADA

A Figura 3.8A mostra o desempenho catalítico da conversão multienzimática da sacarose em ácido glucônico, em processo em batelada em biorreator airlift com alimentação de ar constante de 25 L/min, conforme descrito no item 2.2.5. A Figura 3.8 - B mostra a variação da concentração de oxigênio dissolvido (OD) em função do tempo, durante a conversão de sacarose à AG. Os experimentos foram acompanhados por 5 h.

Figura 3.8 – Perfis de concentração de sacarose (\blacktriangle), ART (\bullet), AG (\square) e concentração de OD (\blacksquare) do processo multienzimático em reator airlift com alimentação de ar (25 L/min), a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas.



Como mostra a Figura 3.8 - B, a concentração de OD teve uma queda brusca nos primeiros 10 min diminuindo de $100 \pm 0,9$ % para cerca de 15 % da saturação de oxigênio do ar no meio reacional e mantendo-se nesta faixa de saturação por quase 1,5 h, ou seja, nesse período todo oxigênio transferido para o meio estava sendo consumido pela reação de oxidação da glicose, sendo a transferência a etapa controladora do processo. Observa-se que ocorre um crescimento gradativo após 1,5 h de processo até $92,0 \pm 2,7$ % de saturação em 5 h de reação, indicando o fim da reação quando não há mais consumo de oxigênio.

Considerando a conversão de sacarose obtida ($98,86 \pm 0,97$ %), tem-se ao final do ensaio 26,01 g/L de frutose e 5,52 g/L de glicose não reagidos, obtendo após 5 h do ensaio em batelada para a produção de AG uma eficiência global e real de respectivamente $103,20 \pm$

0,96 % e $80,40 \pm 5,70$ % em AG. Esse resultado pode ter sido influenciado pelo difícil controle de pH em meio aquoso, uma vez que a injeção contínua de ar e a formação de AG contribuem para a acidificação do meio, fazendo com que as enzimas sejam parcialmente inativadas pelo contato com as gotas da solução alcalina durante o controle. No momento da adição de base no meio reacional, o pH local pode atingir valores próximos a 12, contribuindo para a inativação enzimática. O excesso de oxigenação do meio também pode contribuir para a inativação das enzimas, visto que moléculas de O_2 podem se ligar ao sítio catalítico, dificultando ou até mesmo impedindo a catálise enzimática. Outra possibilidade seria o efeito oxidativo do H_2O_2 que pode formar subprodutos indesejados a partir da frutose e da glicose como os alcoóis de açúcares, manitol e sorbitol (OLIVEIRA, FERREIRA & SOUZA, 2009). Contudo as bateladas de produção de AG apresentaram recuperação de massa de $102,92 \pm 10,10$ %, o que indica que não ocorreram reações paralelas durante o processo multienzimático. Para fins comparativos, a Tabela 3.6 apresenta valores de produtividade em AG de diferentes trabalhos da literatura.

Quando comparamos a produtividade em AG obtida neste experimento ($4,61 \pm 0,33$ g.L⁻¹.h⁻¹) com outras reportadas na literatura (Tabela 3.6), nota-se que todas estão na mesma ordem de grandeza. Produtividades maiores são observadas para altas concentrações iniciais de glicose (acima de 100 g/L), aproximadamente 4 vezes superiores a utilizada neste trabalho, considerando-se que a inversão total de toda a sacarose utilizada no presente trabalho produza 26,32 g/L de glicose.

Como reportam Silva, Tomotani e Vitolo (2011), o processo multienzimático em batelada alimentada pode melhorar consideravelmente a eficiência do processo em termos de AG, passando de 85 % em bateladas convencionais para 100 % em bateladas alimentadas. Contudo, este trabalho estimou as eficiências em AG a partir do consumo de açúcares redutores totais e tampouco explicou como foram definidas as relações enzima/substrato.

Tabela 3.6 – Produtividade em ácido glucônico (AG).

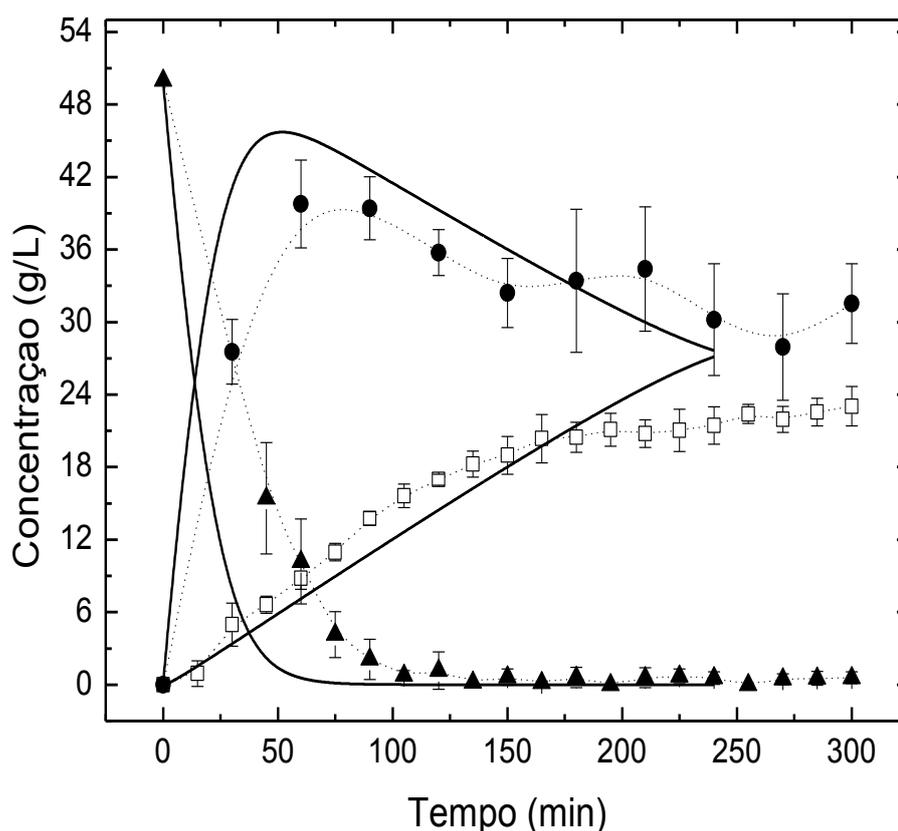
Catalisador (es)	Produtividade de AG (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de sacarose (g/L)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	8,6	600	-	MILSON & MEERS (1985)
Glicose oxidase imobilizada	1,5	-	-	BOURDILLON, LORTIE & LAVAL (1988)
Enzima glicose-frutose oxidorreductase	19,2	200	-	KIM & KIM (1992)
Enzima glicose oxidase imobilizada encapsulada em alginato	3,84	11,34	-	NAKAO <i>et al.</i> (1997)
<i>Gluconobacteroxydans</i>	3,0	-	-	DONEVA, VASSILIEFF & DONEV (1999)
<i>Zymomonas mobilis</i> confinada em reator Hollow-Fiber	33g _{gluconato} /g _{proteína} .h	100	-	FERRAZ, BORGES, & ALVES (2000)
<i>Aspergillus niger</i> imobilizada	8,2	100	-	FIEDUREK (2001)
Glicose oxidase imobilizada	0,10	1,0	-	HESTEKIN <i>et al.</i> (2002)
GOD/CAT imobilizada	0,18	1,0	-	GODJEVARGOVA DAYAL & TURMANOVA (2004)
<i>Aspergillus niger</i> imobilizada	1,28	50	-	MUKHOPADHYAY <i>et al.</i> (2005)
Invertase/GOD/CAT	4,61 ± 0,33	-	50	Presente trabalho (reator airlift)

Fonte: Adaptado GODJEVARGOVA, DAYAL & TURMANOVA, 2004.

3.5 SIMULAÇÃO DA CINÉTICA MULTIENZIMÁTICA E AJUSTE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A simulação dos balanços molares de cada componente da conversão multienzimática de sacarose a AG foi realizada conforme o item 2.2.1, considerando excesso de oxigênio durante o processo e os parâmetros cinéticos obtidos anteriormente no Capítulo 2 para as enzimas invertase, GOD e CAT (Tabela 2.2).

Figura 3.9 – Perfis de concentração experimentais de AG (\square), ART (\bullet) e sacarose (\blacktriangle) experimentais obtidos em ensaio em biorreator airlift e simulados pela função “optmin_ga”(—) obtidos no processo de produção de AG, catalisado pelas enzimas invertase, GOD e CAT em reator airlift com alimentação de ar (25 L/min), a 40°C e pH 6,0. Barras referem-se a desvios padrões das duplicatas e as linhas pontilhadas ligam os pontos experimentais.



O principal objetivo desta simulação foi estimar as relações enzima/substrato para a produção de AG em batelada em biorreator airlift. Esta etapa do trabalho foi de fundamental importância, pois possibilitou a otimização das quantidades das enzimas no processo multienzimático, ou seja, as quantidades mínimas das enzimas que possibilitassem a

conversão total de uma quantidade inicial de sacarose definida, num tempo de processo preestabelecido. Ressalta-se que não foram localizados trabalhos na literatura que utilizassem abordagem metodológica semelhante em processos multienzimáticos. Definindo as quantidades de enzimas arbitrariamente não poderíamos visualizar problemas com inibições de produtos e substrato recorrente nas etapas do processo multienzimático, ou certamente teríamos mais massa de biocatalisadores do que o necessário.

A simulação proposta obteve as relações de enzima/substrato (m.m^{-1}) de 0,03, 2,11, 0,02 % para a invertase, GOD e CAT, respectivamente. Dessa forma, foram conduzidos ensaios em batelada em biorreator tipo tanque agitado aerado (hidrólise, oxidação e conversão multienzimática) e em airlift (conversão multienzimática). A Figura 3.9 ilustra a comparação entre os perfis de concentração de sacarose, ART e AG experimentais obtidos em ensaio em biorreator airlift e simulados pela função “optmin_ga”, onde se pode observar que a simulação previu com boa precisão os resultados experimentais.

Contudo, a simulação previa uma eficiência em AG de 99% em 4 h, enquanto que nos ensaios em batelada em airlift obteve-se eficiência real da ordem de 80% em 5 h de processo (a conversão de sacarose não foi de 100%). Na reação de hidrólise observa-se que a simulação superestimou a velocidade da conversão da sacarose em glicose e frutose, sendo que para 30 min de processo a simulação previa uma conversão de 84%, enquanto que experimentalmente a conversão atingiu valor da ordem de 70%.

No modelo cinético da GOD, considerou-se que a concentração de oxigênio no meio reacional estaria em excesso, fazendo com que o modelo cinético Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produto (H_2O_2) recaia em um modelo de Michaelis-Menten (MM) clássico (BAO *et al.*, 2003; BAO *et al.*, 2001). Para os experimentos de velocidades iniciais (Capítulo 2) realizados em cubetas (3 mL) com agitação magnética, o modelo clássico de MM ajustou-se de forma satisfatória (Figura 2.11). Entretanto, no processo de produção de AG nos reatores tipo tanque agitado e aerado e em airlift, a disponibilidade de oxigênio se torna determinante para a oxidação da glicose em AG (Figura 3.8B). Por consequência, o modelo cinético Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produto (H_2O_2) deve ser reconsiderado.

Segundo Mirón *et al.* (2004), a cinética da oxidação da glicose catalisada pela GOD utilizando o método das velocidades iniciais, pode ser ajustada pelo modelo proposto por Michaelis-Menten (considerando o excesso de O_2 no meio reacional) com inibição pelo substrato (glicose) e produtos (H_2O_2 e AG). Além disso, os autores relatam que a presença do AG diminui a velocidade de catálise da GOD, por impedir a transferência de oxigênio.

Por consequência, propôs-se no presente trabalho, o ajuste de dois possíveis modelos cinéticos para a GOD (Bi-Bi Ping-Pong e Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produtos: H_2O_2 e AG), sendo que para as enzimas invertase e CAT considerou-se o modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição de substrato, conforme descrito no item 2.2.10. Portanto, foi realizado o ajuste do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) junto com os parâmetros cinéticos das enzimas invertase, GOD e CAT; mostrados na Figura 3.10 e Tabelas 3.7 e 3.8.

Os parâmetros cinéticos das Tabelas 3.7 e 3.8 apresentaram valores de mesma ordem de grandeza que aqueles obtidos pela literatura pesquisada (Tabela 2.2). No caso da CAT, a mesma apresenta cinética de inibição por substrato (H_2O_2) a partir de 35 mM. No entanto, a simulação das relações enzima/substrato restringiu a concentração de H_2O_2 em 35 mM, ou seja, na faixa de trabalho não inibitória.

A cinética de consumo de sacarose na conversão multienzimática, obedeceu à tendência dos dados experimentais (Figuras 3.10 A-C) e, sendo a reação de hidrólise independente da cinética de oxidação, esta apresentou os mesmos parâmetros cinéticos independentemente do modelo ajustado para a GOD (Tabelas 3.7 e 3.8).

A oxidação da glicose a AG catalisada pela GOD pode satisfatoriamente ser ajustada pelos modelos de Bi-Bi Ping-Pong com ou sem inibição por produtos, como mostra a Figura 3.10A e C, sugerindo que no processo multienzimático não está ocorrendo inibição pelo produto. Pode-se atribuir a maior diferença entre os valores simulados e experimentais no final da conversão multienzimática (Figura 3.10 A-C), às possíveis interferências difusionais pelo excesso de AG como afirmam Mirón *et al.* (2004), que concluíram a partir de um estudo cinético de inibição de produto da GOD de *Aspergillus niger*, que concentrações acima de 5 g/L de AG dificultam a transferência de oxigênio para o meio reacional diminuindo a velocidade de oxidação da glicose pela GOD.

Tabela 3.7 – Parâmetros cinéticos ajustados para os modelos de Michaelis-Menten com inibição por substrato para a invertase e CAT e Bi-Bi Ping-Pong para GOD.

Parâmetros	Invertase	GOD		CAT
K_m (mM)	133	70*	4E-05**	26
$V_{m\acute{a}x}$ (μ M/min)	4.405	611		1.382
K_I (mM)	528	-		28
Coefficiente de correlação (r^2)	0,91	0,96		0,94
$K_L a$ (min^{-1})		3,00		
Modelo ajustado	$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$	$v = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_{m,1}}{[S_1]} + \frac{K_{m,2}}{[S_2]}}$		$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$

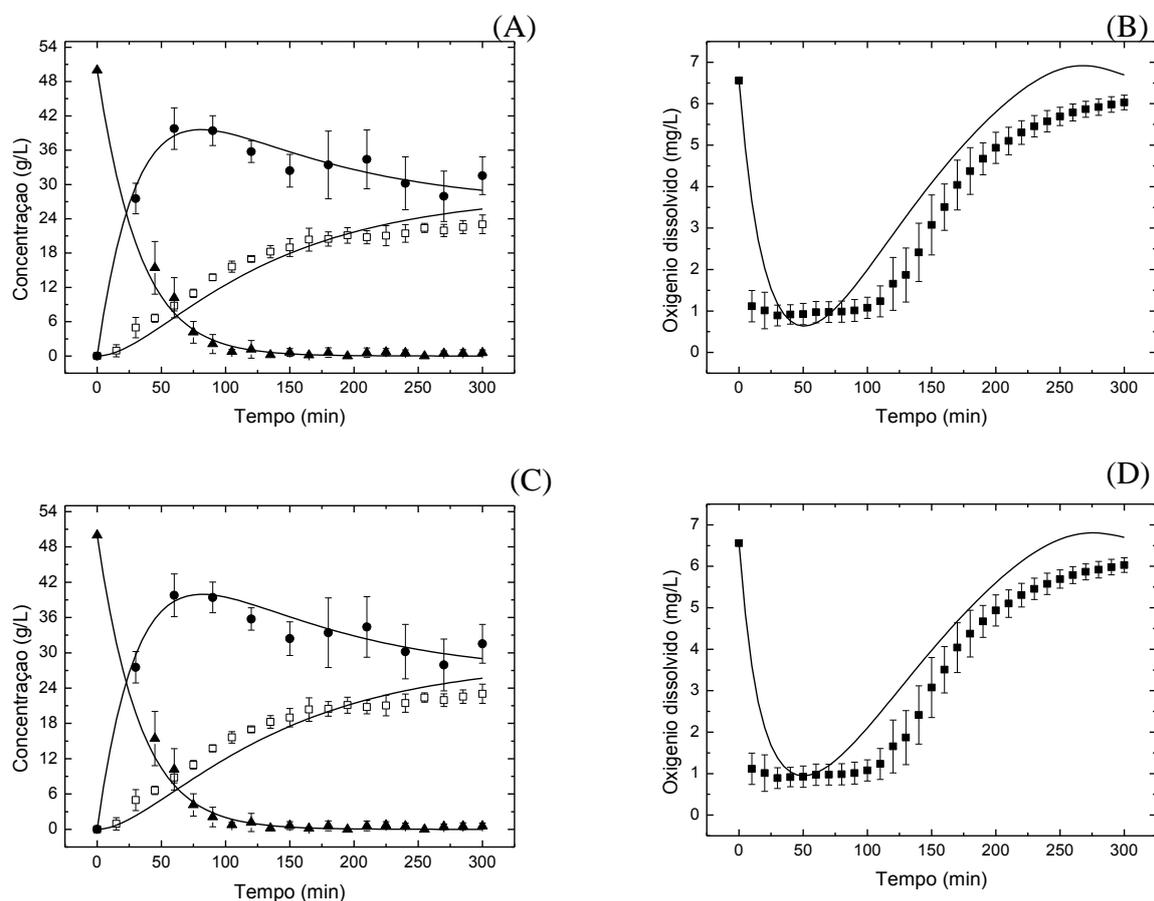
Nota: *substrato \rightarrow glicose **substrato \rightarrow oxigênio.

Tabela 3.8 – Parâmetros cinéticos ajustados para os modelos de Michaelis-Menten com inibição de substrato para a invertase e CAT e Bi-Bi Ping-Pong com inibição de produtos para GOD.

Parâmetros	Invertase	GOD		CAT
K_m (mM)	133	5,94*	6,25E-09**	25
$V_{m\acute{a}x}$ (μ M/min)	4.405	55		1.297
K_I (mM)	528	1,5		32
Coefficiente de correlação (r^2)	0,91	0,94		0,95
$K_L a$ (min^{-1})		3,00		
Modelo ajustado	$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$	$v = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{K_{m,1}}{[S_1]} + \frac{K_{m,2}}{[S_2]} \cdot \left(1 + \frac{[P]}{K_I}\right)}$		$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$

Nota: *substrato \rightarrow glicose **substrato \rightarrow oxigênio.

Figura 3.10 – Estudo comparativo entre os ajustes do modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição de substrato para a invertase e CAT, e Bi-Bi Ping-Pong para a GOD (A e B) e do modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição de substrato para a invertase e CAT, Bi-Bi Ping-Pong com inibição por produtos para a GOD (C e D) para a conversão multienzimática de sacarose a AG em reator airlift com alimentação de ar (25 L/min), a 40°C e pH 6,0. Valores experimentais: concentrações de AG (□), ART (●), sacarose (▲) e oxigênio (■).



Entretanto, para tal afirmação ser válida, se faz necessário um acompanhamento reológico do fluido reacional, corrigindo o valor de $k_L a$ durante o ensaio, uma vez que o mesmo varia em função da viscosidade do fluido e da vazão específica de ar.

4 CONCLUSÕES

A produção de AG é um processo de oxidação que pode ser realizada de várias formas. A rota microbiana tornou-se um modo usual para a produção deste importante insumo. Contudo, apesar dos inúmeros relatos da literatura com relação à avaliação de diferentes fontes de carbono, o processo fermentativo não tem se mostrado viável devido às inúmeras etapas de purificação, abrindo caminho para o desenvolvimento do processo de produção de AG via enzimática e com substratos mais acessíveis como a sacarose.

As enzimas envolvidas no processo multienzimático de conversão de sacarose a AG (invertase, GOD e CAT) apresentaram alta atividade catalítica em pH 6,0 e 40°C, como mostrado nos de estabilidade enzimática. Os modelos cinéticos propostos se mostraram adequados para a simulação da bioconversão, uma vez que as concentrações enzimáticas estimadas apresentaram as mesmas ordens de grandezas. A eficiência real e global do processo em termos de AG obtido em 5 horas de reação foi de respectivamente aproximadamente 80 e 100%, obtida em processo descontínuo em biorreator airlift com adição simultânea das enzimas. Os ajustes dos parâmetros cinéticos aos dados experimentais de AG em biorreator airlift foram satisfatórios e mostraram que os modelos Bi-Bi Ping-Pong com ou sem inibição de produto respondem de forma adequada à tendência dos dados experimentais. O ajuste do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio de 3 min^{-1} está de acordo com valores relatados pela literatura. Contudo, um estudo da reologia da mistura de AG e xarope de frutose devem ser realizados, para que a transferência de oxigênio no processo seja melhor representada.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Departamento de Engenharia Química- DEQ - UFSCar, ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq), à LNF Latino Americana[®] pela doação da Invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (Novozymes[®]) e à Granotec do Brasil S.A. pela doação da Glicose oxidase de *Aspergillus niger* (Novozymes[®]). E ao doutorando do Departamento de Engenharia Química – UFSCar, Felipe Fernando Furlan que contribuiu com as simulações nos Softwares Silab[®] e Emso[®].

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAO, J. *et al.* A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, p. 91-102, 2001a.

BAO, J. *et al.* K. Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochemical Engineering Journal*. v. 13, p. 69-72. 2003.

BOURDILLON, C.; LORTIE, R.; LAVAL, J. M. Gluconic acid production by an immobilized glucose oxidase reactor with electrochemical regeneration of an artificial electron acceptor. *Biotechnol. Bioeng.* v.31, p.553, 1988.

BROOKES, G. C.; NEVILLE, K. B. An analysis of labeling requirements, market dynamics and cost implications. *The Global GM Market* — implications for the European food chain. UK: PG Economics Limited, 2005.

DONEVA, T.; VASSILIEFF, C.; DONEV, R. Catalytic and biocatalytic oxidation of glucose to gluconic acid in a modified three-phase reactor, *Biotechnol. Lett.* v.21, p.1107, 1999.

EDGAR, T. F.; HIMMELBLAU, D. M.; LASDON, L. S. *Optimization of Chemical Processes*. McGraw-Hill, 2001.

FERRAZ, H. C.; BORGES, C. P.; ALVES, T. L. M. Sorbitol and gluconic acid production using permeabilized *Zymomonas mobilis* cells confined by hollow-fiber membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.89, 2000.

FIEDUREK, J. Production of gluconic acid by immobilized in pumice stones mycelium of *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Biotech Letter*, v.23(21), p.1789-1792, 2001.

GODJEVARGOVA, T.; DAYAL, R.; TURMANOVA, S. Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane. *Macromol. Bioscience*, v. 4, p. 950-956, 2004.

HESTEKIN, J. A. *et al.* Electrochemical enhancement of glucose oxidase kinetics: gluconic acid production with anion exchange membrane reactor. *J. Appl. Electrochem.* v.32, p.1049, 2002.

JAIRAJPURI, D. S.; FATIMA, S.; SALEEMUDDIN, M. Complexing of glucose oxidase with anti-glucose oxidase antibodies or the F(ab)'(2)/F(ab)' fragments derived therefrom protects both the enzyme and antibody/antibody fragments against glycation. *Biochemistry*. v.73, p.1235-1241, 2008.

KIM, D. M.; KIM, H. S. Continuous production of glucônico acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and inulinase. *Biotechnol. Bioeng.* v.39, p.336, 1992.

LOPES, S. M. Estudos preliminares de produção de ácido glucônico a partir de sacarose invertida em biorreator airlift. 65 f. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, dissertação, 2011.

MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic Acid Production by Filamentous Fungi, *Advances in Fungal Biot. for Industry, Agric., and Med.* p.307-340, 2004.

MILSON, P.; MEERS, J. Gluconic and itaconic acid. *Comp. Biotechnol.* v.3, p.681-700, 1985.

MIRÓN, J. *et al.* A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivation and diffusional effects, and their interactions. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 34, p. 513–522, 2004.

MUKHOPADHYAYA, R. *et al.* Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal.* v.15, p.299–303, 2005.

NAKAO, K. *et al.* Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. *Chem.Eng.Science*, p.4127-4133, 1997.

RAMACHANDRAN, S. *et al.* Gluconic Acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44, n.2, p. 185-195, 2006.

SILVA, A. R. da. *Conversão multienzimática da sacarose em frutose e ácido glucônico usando reatores descontínuo e contínuo.* Universidade de São Paulo, Dissertação, 2010.

SILVA, A. R.; TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Invertase, glucose oxidase and catalase for onverting sucrose to fructose and gluconic acid through batch and membrane-continuous reactors. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* .v.47, n.2, 2011.

SINGH, O. V.; KAPUR, N.; SINGH R. P. Evaluation of agrofood by-products for gluconic acid production by *Aspergillus niger* .*World J. Microbiol. Biotechnol.* v.21, p.519-524, 2005.

SINGH, O. V.; KUMAR, R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, p.713–722, 2007.

WONG, C; WONH, K.; CHEN, X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biot.*, v.78, p. 927–938, 2008.

YU, R. J.; SCOTT, E. V. Method of using gluconic acid or gluconolactone for treating wrinkles. US Patent 5.677.340, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PROPOSTAS FUTURAS

O objetivo principal do trabalho foi definir condições de pH, temperatura e quantidades de substratos e catalisadores para a conversão multienzimática da sacarose em ácido glucônico em biorreator airlift. Com esse intuito, foi realizado um estudo cinético das enzimas envolvidas no processo multienzimático (invertase, GOD e CAT), em que se variou temperatura e pH e observou-se os pontos de máxima de atividade catalítica. A partir disso, propôs-se ensaios de estabilidades térmica e de pH ao redor das condições obtidas no estudo anterior. Na sequência, foi feito um estudo cinético de concentração de substrato *versus* atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos de processo em que, ajustando as equações de Michaelis-Menten com inibição (invertase e CAT) e sem inibição (GOD) encontrou-se os parâmetros cinéticos para esses modelos. Com estes parâmetros foi realizada uma simulação da conversão multienzimática de sacarose a ácido glucônico em biorreator aerado, para que fossem definidas as quantidades mínimas de biocatalisadores que garantissem a eficiência de 99% em ácido glucônico em 4h de processo. Desse modo, foram realizados ensaios em batelada em biorreatores agitado e aerado e airlift. No final do trabalho, propôs-se um ajuste dos parâmetros cinéticos e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) a partir dos dados experimentais obtidos em biorreator airlift, em que se observou uma representação pouco fiel do comportamento da concentração de oxigênio no meio pelo modelo proposto. Este fato pode ser justificado pelo possível aumento na viscosidade no meio reacional causada pela produção de ácido glucônico e frutose.

Para dar continuidade ao estudo realizado, propõem-se as seguintes etapas:

- ✓ Estudo da reologia de soluções de ácido glucônico/frutose, para verificar se esta está correlacionada com a mudança no coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) e refinamento do modelo proposto para melhor ajuste;
- ✓ Avaliação de diferentes modos de operação, como batelada sequencial e batelada alimentada, para que os problemas com possíveis inibições de substrato sejam contornados, podendo-se assim, melhorar a produtividade e o rendimento em ácido glucônico;
- ✓ Estudo de imobilização/estabilização das enzimas invertase, GOD e CAT, em que se sugere a imobilização por auto-agregação ou CLEA (Cross-linked enzyme aggregate) que consiste em um método de imobilização onde os biocatalisadores são de maneira natural ou artificial, precipitados e posteriormente é adicionado um agente de cruzamento de ligações. A principal vantagem está na maior atividade por volume de biocatalisador, além da estabilidade

tridimensional para enzimas multiméricas evitando a dissociação das subunidades e dos cofatores ou coenzimas.