

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

Avaliação do desempenho de invertase imobilizada em resíduo agroindustrial para a produção de açúcar invertido em reatores enzimáticos de alta taxa

Elen Tomoko Taniguchi¹, Juliana Cristina Bassan², Clariana Zanutto Paulino da Cruz³, Rubens Monti⁴ e Guilherme Peixoto⁵

^{1,2,4} Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP - Universidade Estadual Paulista - Departamento de Alimentos e Nutrição

Cep. 14800-903 Araraquara - SP - E-mail: el.taniguchi@hotmail.com

³ Instituto de Química - UNESP - Universidade Estadual Paulista - Departamento de Biotecnologia

⁵ Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP - Universidade Estadual Paulista - Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

14800-903 Araraquara - SP - E-mail: peixotog@fcfar.unesp.br

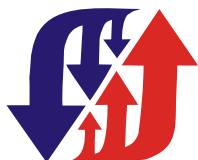
RESUMO

A produção de açúcar invertido via enzimática é considerado um processo limpo para obtenção de produto de alta qualidade, ausente de cor, aroma e subprodutos tóxicos como o 5-hidroximetil-2 furfural (HMF). A invertase possui ampla utilização no segmento alimentício e de bebidas para conversão de sacarose em de açúcar invertido. Neste trabalho a invertase foi imobilizada em pó de sabugo de milho ativado, visando redução de gastos associados ao suporte de imobilização e também ao custo da enzima através de sua reutilização e estabilização operacional do catalisador insolubilizado. A matriz de imobilização escolhida apresentou características físico-químicas interessantes (resistência mecânica, hidrofiliidade, capacidade de derivatização) além de ser de grau alimentício e apresentar baixo custo de aquisição e alta disponibilidade. O derivado enzimático apresentou atividade de 9,55 U.g⁻¹, mantendo 80% de sua atividade após 10 ciclos de reuso.

Palavras chave: invertase, açúcar invertido, imobilização, pó de sabugo de milho, reatores enzimáticos.

INTRODUÇÃO

A invertase ou β -D-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) é uma enzima amplamente utilizada nas indústrias alimentícias. Pode ser obtida a partir de uma variedade de seres vivos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras, plantas e insetos), mas sua principal fonte é, atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Trata-se de uma carboidrase da classe das hidrolases que catalisa a reação de hidrólise da sacarose através da quebra da ligação glicosídica α -1,4 que resulta em uma mistura equimolar de glicose e frutose, denominada xarope de açúcar invertido (EMREGUL; SUNGUR; AKBULUT, 2006; MARQUEZ, et al. 2008; KOTWAL & SHANKAR, 2009; CANLI, et al. 2011; RAJ, et al. 2011; VUJČIĆ, et al. 2011; KARKAS e ONAL, 2012).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

A utilização de enzimas na forma solúvel é limitada em processos industriais em larga escala devido à fatores como: alto custo de produção, instabilidade (pH e temperatura), mudanças conformacionais resultantes de choques mecânicos e pressão osmótica. Além disso, há dificuldade de recuperação do biocatalisador tornando o processo enzimático ainda mais caro (MARQUEZ, et al. 2008; KOTWAL & SHANKAR, 2009).

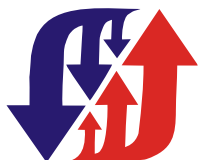
Por esse motivo, a imobilização de enzimas faz parte dos esforços para aumentar a sustentabilidade e rentabilidade de processos enzimáticos industriais. Para a aplicação na indústria de alimentos, o suporte para imobilização de enzimas deve ser de grau alimentício e contribuir positivamente para as características do produto, entretanto, o custo do suporte tem influência significativa sobre o preço do produto final. Nesse contexto, há crescente interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais como o pó de sabugo de milho, que apresenta características físico-químicas interessantes, baixo custo de aquisição e alta disponibilidade.

Outra vantagem da imobilização é a automação de processos, pois permite o emprego do catalisador insolubilizado em uma gama de configurações de reatores (MA et al. 2009; ZHANG & XING, 2011; HOMAEI et al, 2013).

Nesse contexto, estudos têm sido propostos com o objetivo de aumentar a estabilidade conformacional e consequentemente operacional das enzimas (MENDES et al., 2013). Com o objetivo de ampliar o uso de enzimas em processos industriais, somado a necessidade de obtenção de maiores fatores de estabilização e automação de processos, a imobilização de enzimas surge como uma estratégia promissora que objetiva melhorar as propriedades físico-cinética da enzima concomitante à redução de custos (MATEO et al., 2007). Dessa forma este trabalho tem o objetivo de obter açúcar invertido usando o derivado pó de sabugo de milho-glutaraldeído-invertase em reator de leito fixo.

MATERIAL E MÉTODOS

A invertase foi extraída de *Saccharomyces cerevisiae* (15g de fermento biológico) por maceração em areia tratada (5g) com adição de 30 mL de água milliQ e 10mL de éter etílico. A solução foi centrifugada e o sobrenadante utilizado nos experimentos. Em condição ótima de reação (sacarose 2% em tampão de acetato de sódio 0,05 M) foi realizado a determinação das condições de máxima atividade (pH e temperatura), eficiência catalítica (concentração de enzima versus concentração de substrato) e estabilidade térmica da enzima solúvel. A imobilização da enzima solúvel foi realizada seguindo a metodologia descrita por Guisán (2006). A enzima imobilizada em pó de sabugo de milho (SM-glutaraldeído-invertase) também foi caracterizada cineticamente (condições de máximas atividades e atividade específica), o produto de hidrólise foi quantificado de acordo com Miller (1959) e sua estabilidade térmica foi determinada. No caso da enzima solúvel, foram realizados testes utilizando quatro diferentes soluções para tamponamento, para avaliação da melhor e posterior utilização em escala industrial. Essas diferentes soluções continham 2% de sacarose e pH 5,0 ajustado com os respectivos acidulantes: (A) tampão acetato de sódio 0,05 M (condição ótima); (B) água de abastecimento com ácido ascórbico 1M; (C) água de abastecimento com ácido cítrico 1M; (D)



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

água de abastecimento com ácido clorídrico 1M. Ao final dos experimentos foi realizado o teste de reuso, somente com derivado enzimático (enzimas imobilizadas).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

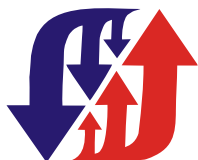
Em condições otimizadas (para enzima solúvel e imobilizada foram 50°C, pH 5,0 e 45°C, pH 5,5 respectivamente.) Na condição (A) ótima de reação, a atividade da enzima livre foi de 3,95 U.mL⁻¹ e na imobilizada foi 0,011 U.mg⁻¹_{deriv.} com 91,06% de imobilização da mesma após 90 minutos. Com relação a estabilidade térmica a60°C a invertase imobilizada apresentou retenção de 60% de sua atividade após 180 minutos, enquanto que a enzima solúvel perdeu 67,6% de sua atividade com 30 minutos. A enzima imobilizada manteve 80% de sua atividade após 10 ciclos de reuso. Na condição (B), a enzima livre apresentou atividade de 1,38 U.mL⁻¹ (50°C) e 0,0019 U.mg⁻¹_{deriv.} (45°C) imobilizada. Na condição (C), esses parâmetros foram 3,05 U.mL⁻¹ (50°C) e 0,006 U.mg⁻¹_{deriv.} (45°C), respectivamente. Por último, a condição (D) apresentou o pior desempenho com 0,58 U.mL⁻¹ (50°C) para a enzima livre e 0,0012 U.mg⁻¹_{deriv.} (45°C) para a enzima imobilizada. Possivelmente a dissociação do HCl causou o maior efeito desnaturante.

CONCLUSÕES

A invertase foi imobilizada com sucesso em pó de sabugo de milho, sendo que para sua aplicação mais sustentável em escala industrial o acidulante mais adequado seria o ácido cítrico 1M porque é menos oneroso economicamente e apresentou as melhores atividades, excetuando àquelas obtidas com o acetato de sódio 0,05 M. Podemos afirmar, com base neste estudo, que o reuso de enzimas imobilizadas seria uma ótima maneira de redução de custos, já que houve manutenção de 80% de atividade mesmo após 10 ciclos de reuso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Canli, O, Erdal, S, Taskin, M, Kurbanoglu, EB.2011. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. Toxicology an industrial health. [online] Available at: <http://tih.sagepub.com/content/27/1/35.long>. Accessed on 12 March 2016.
- Emregul, E, Sungur, S, Akbulut, U.2006. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. Food Chemistry. [online] Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605004139>. Accessed on 12 March 2016.
- 2 ed. New Jersey: Human Press Inc. 2006. Guisan J M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: Guisan JM, editor. Immobilization of Enzymes and Cells. p. 1-13.
- Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. 2013. Enzyme immobilization: an update. Journal of Chemical Biology 6:185-205.
- Karkas T, Önal S.2012. Characteristics of invertase partitioned in polyethylene glycol/magnesium sulfate aqueous two-phase system. Biochemical Engineering Journal. 60: 142– 150.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

ENZITEC 2016

Kotwal SM, Shankar V.2009. Immobilized invertase. *Biotechnology advances*. [Online] Available at: http://ac.els-cdn.com/S0734975009000214/1-s2.0-S0734975009000214-main.pdf?_tid=dcbl11612-f1ca-11e5-8148-00000aacb360&acdnat=1458829109_4e614404e73a386ae6e319f7f469182e. Accessed on 13 March 2016.

Ma J, Zhang L, Liang Z, Zhang W, Zhang Y.2009. Recent advances in immobilized enzymatic reactors and their applications in proteome analysis. *Analytica Chimica Acta*. [Online] Available at: <http://www.proteomics.dicp.ac.cn/publications/2009/3.pdf>. Accessed on 13 March 2016.

Marquez LDS, Cabral BV, Freitas FF, Cardoso VL, Ribeiro EJ.2013. Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 50:68-92.

Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, Guisan J M, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzymes and Microbial Technology*. [Online] Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907000506>. Accessed on 14 March 2016.

Mendes A A, De Castro H F, Andrade, G S S, Tardioli, P W, Giordano, R L C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipase by covalent attachment. *Reactive and Functional Polymers*. [Online] Available at: <http://www.bv.fapesp.br/pt/publicacao/63216/preparation-and-application-of-epoxy-chitosanalginat-suppor/>. Accessed on 14 March 2016.

Miller, G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. [Online] Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>. Accessed on 15 March 2015.

Raj L, Chauhan G S, Azmi W, Ahn J H, Manuel J. Kinetics study of invertase covalently linked to a new functional nanogel. *Bioresource Technology*. [Online] Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410018651>. Accessed on 15 March 2016.

Vujčić Z, Miloradović Z, Miloradović A, Božić N. Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. *Food Chemistry*. [Online] Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610014172>. Accessed on 15 March 2016.

Zhang C, Xing X-H.2011. Enzyme Bioreactors. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*. 2. Waterloo: Elsevier; p. 319-329.