

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE β -D- FRUTOFURANOSÍDEO FRUTOHIDROLASE EM
PARTÍCULAS DE QUITOSANA**

Sheila Garziera Valerio

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**IMOBILIZAÇÃO DE β -D- FRUТОFURANOSÍDEO FRUTOHIDROLASE EM
PARTÍCULAS DE QUITOSANA**

Sheila Garziera Valerio

(Farmacêutica – UFRGS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo PPGCTA – UFRGS.

Porto Alegre

2012

CIP – Catalogação na Publicação

Valerio, Sheila Garziera
H576i Imobilização de β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase em
partículas de quitosana / Sheila Garziera Valerio. - - Porto Alegre,
2012.

70f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre,
BR-RS, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Bibliografia

1.Enzimas 2.Invertase 3.Método de imobilização enzimática 4.
Quitosana I. Título. II. Hertz, Plinho Francisco (orient.) III. Rodrigues,
Rafael Costa (coorient.)

CDU 663.1:574.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
da UFRGS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM C&T DE ALIMENTOS/ PPGCTA

Autor: Sheila Garziera Valerio

Título da Dissertação: Imobilização de β -D-Frutofuranosídeo Frutohidrolase em Partículas de Quitosana

Dissertação aprovada por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo
Membro da Comissão Julgadora

Prof. Dr. Helen Treichel
Membro da Comissão Julgadora

Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub
Membro da Comissão Julgadora

Prof. Dr. José Maria Wiest
Coordenador PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor ICTA – UFRGS

Porto Alegre, 15 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Tão importante quanto o conhecimento e o reconhecimento que se adquire ao longo de uma incrível jornada, da qual fazem parte momentos de frustração e êxito, faz-se igualmente necessário perceber que construções como essa são muito mais prazerosas e enriquecedoras quando compartilhadas. Por mais que o 'autor da obra' seja o seu maior responsável, direta ou indiretamente sempre recebe a influência de outros, sendo então injusto atribuir-lhe a exclusividade dos méritos. O próprio grau de dedicação empregado na realização deste projeto em parte foi resultado do estímulo das pessoas que, ao mesmo tempo em que desejaram que não houvesse preocupações, sabiam o quão cruciais eram aqueles momentos, pois a partir deles muitas soluções e novas perspectivas foram originadas.

Ao longo desses dois anos, pude consolidar conceitos adquiridos durante experiências anteriores (graduação e estágios) e mesmo inteirar-me de novas concepções. De modo concomitante, pude reiterar como posturas éticas e não omissas são capazes de influenciar beneficentemente o sistema onde estão inseridas.

Assim, torna-se imprescindível transmitir minha gratidão aos que auxiliaram na obtenção deste Título, o qual, para mim, vai além da Dissertação, Artigo, e Defesa perante a banca avaliadora, pois traz consigo outros personagens igualmente fundamentais: orientadores, colegas de laboratório e fora dele, amigos e família. Para vocês preciso dizer: muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 β -D- Frutofuranosídeo frutohidrolase	12
2.1.1 Aplicações	13
2.2 Imobilização de enzimas	15
2.2.1 Métodos de imobilização	16
2.2.2 Suportes para imobilização	20
2.2.2.1 Quitosana	22
2.2.3 Efeitos da imobilização: Vantagens e limitações	26
2.2.4 Exemplos de β -D- Frutofuranosídeo frutohidrolase imobilizada	28
3 RESULTADOS	30
3.1 High operational stability in sucrose hydrolysis of invertase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> immobilized on chitosan nanoparticles	31
3.2 Discussão Geral	55
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	64
ANEXO	68

IMOBILIZAÇÃO DE β -D- FRUTOFURANOSÍDEO FRUTOHIDROLASE EM PARTÍCULAS DE QUITOSANA

Autor: Sheila Garziera Valerio

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

A enzima β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C. 3.2.1.26), também conhecida como invertase, é uma hidrolase capaz de clivar o dissacarídeo sacarose, gerando mistura equimolar de glicose e frutose ('açúcar invertido'). A aplicação deste, bem como a dos monossacarídeos de modo isolado é bastante comum na indústria alimentícia, por exemplo na manufatura de recheios de doces, além de outras aplicações, como na indústria farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes suportes e métodos de imobilização de uma invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Os experimentos feitos com filmes de celulose, macroesferas de quitosana, e o suporte comercial Immobead não apresentaram resultados conclusivos. A imobilização covalente unipontual da invertase em mistura de nano e agregados de nanopartículas de quitosana possibilitou a obtenção dos seguintes resultados: além desse suporte ser de fácil preparação e ativação, oferecendo grande área superficial para a imobilização, o derivado imobilizado apresentou alta recuperação da atividade, sendo utilizado o protocolo que permitiu obter 74,3 % de rendimento e 61,6 % de eficiência de imobilização. A temperatura (55 °C) e o pH ótimos de atividade (4,5), estabilidade térmica e ao armazenamento não foram modificados pós-imobilização. A afinidade da invertase pelo substrato decaiu cerca de 3 vezes, devido à reduzida acessibilidade da sacarose ao sítio ativo da enzima. Porém, o parâmetro V_{max} manteve-se constante, indicando que não houve perda na máxima conversão da sacarose em seus monossacarídeos. Através da imobilização foi possível obter excelente estabilidade operacional: 59 reusos com 100 % da atividade catalítica da enzima (bateladas de 30 min, sob suave agitação, com solução de sacarose 8 %, a 55 °C).

Palavras-chave: invertase, imobilização, quitosana, estabilidade operacional, nanopartículas

^{1/} Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de concentração Bioquímica), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fevereiro de 2012.

IMMOBILIZATION OF β -D- FRUCTOFURANOSIDE FRUCTOHYDROLASE ON CHITOSAN PARTICLES

Author: Sheila Garziera Valerio

Advisor: Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

The enzyme β -D- fructofuranoside fructohydrolase (E.C. 3.2.1.26), also known as invertase, is one hydrolase able to cleave the sucrose disaccharide, generating an equimolar mixture of glucose and fructose ('invert sugar'). The application of invert sugar, as well the isolated monosaccharides is very common in the food industry, for example in the manufacture of filling of sweets, besides other applications, as in the pharmaceutical industry. The objective of this work was to evaluate different supports and immobilization methods of an invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. The experiments performed with cellulose films, chitosan macrospheres and the commercial support Immobead did not present conclusive results. The unipoint covalent immobilization of invertase in a mixture of chitosan nano and aggregated nanoparticles made possible to obtain the following results: besides the easy preparation and activation of this support, offering high superficial area for enzyme immobilization, the immobilized derivative presented high activity recovery, which allowed getting 74.3 % of immobilization yield and 61.6 % of immobilization efficiency. The optimal temperature (55 °C) and pH (4.5) for activity, thermal and storage stabilities were not modified after immobilization. The enzyme affinity for its substrate decreased about 3 folds, mainly due to the reduced accessibility of sucrose to the catalytic site of the enzyme. However the parameter V_{max} remained constant, indicating that there was not loss in the maximal conversion of sucrose in its monosaccharides. Through the immobilization was possible to obtain excellent operational stability: 59 reuses with 100 % of the catalytic enzyme activity (batches of 30 min, under gentle stirring, with sucrose solution 8 %, 55 °C).

Key-words: invertase, immobilization, chitosan, operational stability, nanoparticles

^{1/} Master of Science dissertation in Food Science and Technology, (Biochemistry Area), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, February, 2012.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formação de enzimas imobilizadas sem a presença de suportes	16
Figura 2 Efeito da imobilização na estabilidade da enzima	19
Figura 3 Métodos de imobilização reversíveis (a-e) e irreversíveis (f-i). Adsorção (a), ligação iônica (b), ligação por afinidade (c), ligação por metal ou quelação (d), pontes dissulfeto (e), ligação covalente (f), aprisionamento (g), encapsulação (h), ligações cruzadas (i)	19
Figura 4 Estruturas dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b), e celulose (c).....	22
Figura 5 Fluxograma de obtenção de quitina, quitosana e seus derivados via termoquímica a partir de resíduos da indústria pesqueira	24
Figura 6 Estrutura química da quitosana ativada com glutaraldeído via carbono.....	25
Figura 7 Possíveis efeitos da imobilização na atividade da enzima.....	27
Figura 8 Estrutura da quitosana reticulada com glutaraldeído	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação e exemplos de suportes para imobilização quanto à composição química	21
--	----

1 INTRODUÇÃO

Muitos processos industriais utilizam catalisadores químicos em suas operações. Em diversos casos, atrelada à geração dos produtos de interesse, ocorre a formação de substâncias indesejadas, tanto em aspectos sensoriais, quanto muitas vezes ambientais. Por exemplo, na hidrólise ácida da sacarose sob altas temperaturas é comum haver a formação de compostos de aroma e outras impurezas coloridas, resultantes da ciclização da glicose e frutose. Vale lembrar que muitas vezes esses compostos indesejáveis não são desagradáveis apenas sensorialmente, mas sim direta ou indiretamente potencialmente maléficos para os consumidores. Esses compostos, ao serem retirados do produto, acrescem mais operações ao processamento, o que encarece o mesmo, além de gerar mais material residual (possivelmente maior impacto ambiental), indo contra o conceito de ‘produção mais limpa’ (inserido em certificações de qualidade de gestão ambiental, como a ISO 14001).

A aplicação de biocatalisadores como alternativa aos catalisadores químicos apresenta diversas vantagens, porém também limitações. Como as enzimas possuem alta seletividade e especificidade evita-se a formação de compostos indesejáveis. Além disso, em diversas circunstâncias há maior eficiência na conversão do substrato em produto. No exemplo citado por Plou *et al.*, (2007), a divulgação e comercialização, já na década de sessenta, de uma glicoamilase catalisando eficientemente a produção de glicose a partir do amido fez frente à hidrólise ácida, além de ter sido um propulsor para a indústria enzimática. Por outro lado, como evolutivamente grande parte das enzimas foram adaptadas aos meios celulares, a maioria não suporta condições de extremos pH e temperaturas ou mesmo condições muito atípicas às suas de origem, bem como a presença de solventes orgânicos (condições muitas vezes utilizadas industrialmente). Assim, durante seu uso, podem ocorrer alterações conformacionais, entre outras, que induzem a queda da estabilidade, promovendo muitas vezes a desnaturação enzimática. Outra grande dificuldade no uso de enzimas dá-se pelo fato de que por serem solúveis, findos os processos catalíticos, encontram-se misturadas com o substrato e os produtos, sendo economicamente desfavorável sua recuperação do meio, assim como não reutilizá-las faz-se igualmente custoso.

Essas desvantagens atreladas ao uso de biocatalisadores livres são minimizadas com a imobilização enzimática, a qual permite a reutilização do biocatalisador, além de muitas vezes proporcionar melhoramento em parâmetros de estabilidade, velocidade e reatividade.

A enzima β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C.3.2.1.26) apresenta a capacidade de hidrolisar a sacarose. Esta atividade justifica sua principal utilização em processos industriais: produção de mistura equimolar de glicose e frutose, produto conhecido como ‘açúcar invertido’, ‘açúcar líquido’, bastante aplicado na confecção de diversos recheios de alimentos. Além disso, a invertase pode ser aplicada em processos fermentativos, manufatura de mel artificial, bem como encontra inserção em outros ramos industriais que não o alimentício como o farmacêutico, além de compor eletrodos para a detecção de sacarose.

Assim, este trabalho teve como **objetivo geral** estudar a imobilização da enzima β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase de *S. cerevisiae* avaliando sua atividade hidrolítica perante o substrato sacarose.

E como **objetivos específicos**:

- Testar diferentes suportes para a imobilização, considerando fatores como área superficial, grau de dificuldade de preparação, adequação ao processo de ativação;
- Definir o método de imobilização (tipo de interação da enzima com o respectivo suporte, otimização do tempo de imobilização, influência da presença do substrato neste período);
- Experimentar diferentes concentrações enzimáticas de imobilização, afim de verificar rendimentos e eficiências;
- Apontar parâmetros ótimos de atividade da enzima livre e imobilizada como pH, temperatura, bem como suas constantes cinéticas (K_m e V_{max});
- Avaliar a estabilidade da invertase imobilizada sob a influência de diferentes temperaturas, comparando-a a sua forma livre;
- Reutilizar o biocatalisador imobilizado sob condições ótimas, indicando assim sua estabilidade operacional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 β -D-Frutofuranosídeo frutohidrolase

A enzima β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase (E.C. 3.2.1.26), também conhecida como β -frutofuranosidase, sacarase, β -frutosidase ou invertase, é pertencente à família das hidrolases. A proteína é capaz de hidrolisar a ligação glicosídica do dissacarídeo sacarose em seus monossacarídeos glicose e frutose (NC-IUBMB, 2009). Dependendo da origem, e da concentração de substrato, pode não hidrolisar a sacarose, mas sim transferir a ela resíduo(s) de frutose, formando os frutooligossacarídeos (FOS). Estes apresentam cerca de 1/3 do poder adoçante da sacarose e são considerados alimentos pré-bióticos por praticamente não serem digeridos pelo metabolismo humano, servindo de nutriente para os microrganismos constitutivos da flora intestinal (YUN, 1996).

Na natureza, a proteína encontra-se em bactérias, fungos, algas verdes, invertebrados e vertebrados. Também nota-se invertase em frutas e vegetais, estando sua atividade estreitamente ligada ao metabolismo energético e conseqüentemente ao perfil de amadurecimento desses sistemas, seja como resposta favorável ao armazenamento, aumentando o teor de FOS (atividade de transferase), seja visando maior disponibilidade de glicose (atividade de hidrolase). Nas plantas, de modo geral, a diferença na seqüência de aminoácidos encontrados na invertase a classifica em duas famílias distintas: GH32 ('forma ácida', encontrada no vacúolo e parede celular) e GH100 ('forma alcalina-neutra') (LAMMENS *et al.*, 2009). Nesse contexto tem sido crescente o número de estudos com interesse no controle enzimático, via ferramentas como as de manipulação molecular (NOOKARAJU *et al.*, 2010).

A invertase proveniente de fontes microbianas também apresenta diferenças conforme o microrganismo de origem, e mesmo quando oriunda de um mesmo microrganismo, o que reflete nos parâmetros ótimos da enzima. Por exemplo, a invertase proveniente de *Aspergillus niger* é descrita como tendo massa molecular de aproximadamente 130 kDa, pH e temperatura ótimos de 5,5, e 50 °C, respectivamente (NGUYEN *et al.*, 2005). Já a invertase proveniente de *S. cerevisiae*, objeto de estudo neste trabalho, é uma enzima extracelular homodimérica, que dissocia apenas em condições de desnaturação sendo, portanto, relativamente estável. Além disso, apresenta 4 isoformas, as quais têm mesma massa molecular (270 kDa). Quanto às propriedades catalíticas, segundo Andjelkovic *et al.*, (2010), o pH ótimo é de 3,5-5,0, K_m em

torno de 25 mM, e temperatura ótima de 60 °C. Ainda segundo o mesmo autor, as próprias isoformas da enzima diferem em valores de ponto isoelétrico, estabilidade térmica e reatividade química, cujos motivos ainda não foram bem elucidados. Por ser constituída por cerca de 50 % de carboidrato (principalmente polimannana e em menor proporção glicosaminas) é considerada uma glicoproteína (NEUMANN e LAMPEN, 1967). Aponta-se que a presença dessa porção carboidrato seja responsável por manter a estabilidade térmica, já que quando a forma não-glicosilada foi submetida a diferentes temperaturas, a enzima apresentou maior grau de desnaturação, e mostrou maior tendência em agregar-se em pHs ácidos, em comparação à enzima nativa (WANG *et al.*, 1996).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que a invertase, coadjuvante de tecnologia na produção de alimentos, seja proveniente dos seguintes microrganismos: *A. niger*, *B. subtilis*, *K. fragilis*, *S. carlsbergensis* e *S. cerevisiae* (BRASIL, 2009). A invertase de *S. cerevisiae* é a enzima mais utilizada industrialmente para a hidrólise da sacarose devido ao fato da levedura ser considerada não patogênica e não toxigênica, além da proteína não necessitar de co-fatores e ser bastante estável. Esses apontamentos explicam em parte o grande número de estudos envolvendo este biocatalisador, inclusive imobilizado (ANDJELKOVIC *et al.*, 2010; CADENA *et al.*, 2010; HSIEH *et al.*, 2000; KOTWAL e SHANKAR, 2009).

2.1.1 Aplicações

A atividade hidrolítica da β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, gera mistura equimolar de α -D-glicose e β -D-frutose. Tanto a sacarose quanto a glicose e a frutofuranose (formada em um primeiro momento pós hidrólise do dissacarídeo) são dextrorrotatórias. Esta última é bastante instável, sendo naturalmente convertida à forma mais estável frutopirranose, a qual é levorrotatória. Esse sentido predomina sobre o outro; assim, ao incidir feixe de luz polarizada sob a mistura de monossacarídeos, há o desvio no sentido contrário ao que era antes da hidrólise da sacarose, justificando o nome ‘açúcar invertido’.

Devido ao fato da frutose apresentar poder adoçante elevado (doçura relativa de 1,52 em comparação à sacarose) (COULTATE, 2004), o xarope de açúcar invertido resultante possui poder edulcorante cerca de 20 % maior em comparação à sacarose (GRATÃO *et al.*, 2004), sem por isso aumentar o teor calórico. Ainda, a mistura de glicose e frutose apresenta menor viscosidade que uma solução equimolecular de sacarose, facilitando as operações de

enchimento e distribuição em porções. Devido às características químicas das moléculas, como o grau de hidratação, a tendência da glicose e da frutose em formar cristais é bastante reduzida em comparação à sacarose (COULTATE, 2004). Assim, caso haja perda de água (situação bastante comum em produtos com alto conteúdo do dissacarídeo), na mistura dos monossacarídeos o fenômeno da cristalização é evitado (KOTWAL e SHANKAR, 2009). Paralelamente pode-se inferir que esses monossacarídeos tendem à maior higroscopicidade frente ao dissacarídeo, mantendo constante a atividade de água do momento da fabricação ao período de armazenamento, aumentando o tempo de prateleira dos produtos. Essas elucidacões explicam a grande utilização do açúcar invertido na confecção de recheios de doces, ‘fondants’ (coberturas, constituídas basicamente de sacarose fundida e água), na formulação de bolos, já que mantém a maciez e teor de umidade dos produtos, sem permitir o amolecimento ou liquefação (DSM FOOD SPECIALTIES, 2010). É possível fazer uso dos diferentes pontos de fusão da glicose e frutose para separá-los, originando o xarope de glicose ou xarope de frutose, e ainda obtê-los na forma cristalina. O xarope de glicose é bastante utilizado na confecção de mel artificial, sendo que ainda hoje a principal fonte de glicose para este fim é o amido, o qual requer etapas de gelatinização acima de 60 °C, e uso de outras enzimas (TOMOTANI e VITOLO, 2007).

Outra aplicação da invertase dá-se em processos fermentativos onde visa-se a produção de, por exemplo, bebidas alcoólicas, ácido láctico, glicerol (KOTWAL e SHANKAR, 2009). Na produção de biocombustível é comum o uso da levedura *S. cerevisiae* para a conversão dos açúcares em etanol, sendo que a hidrólise da sacarose (dissacarídeo oriundo principalmente da cana de açúcar) via enzima extracelular predomina frente a hidrólise via biocatalisador intracelular (BASSO *et al.*, 2011). Essas aplicações enzimáticas justificam-se pelo fato de que os microrganismos seriam incapazes de utilizar o dissacarídeo, então a invertase torna a glicose e frutose disponíveis aos mesmos.

No âmbito da química analítica, a invertase pode ser utilizada como componente de biosensores eletroquímicos baseados em reações bioeletrocatalíticas. Os biosensores têm por mecanismo a conversão de reações enzimáticas em sinais eletroquímicos. Assim, é possível imobilizar a enzima em determinada superfície, e ao crescer amostra contendo sacarose a detecção de frutose, por exemplo, gera um sinal. Este é registrado e pode indicar indiretamente a concentração do substrato, ou mesmo sabendo-se a concentração prévia do substrato, pode-se inferir na medida da própria atividade enzimática (TSUJIMURA *et al.*, 2009).

Expandindo, o xarope de frutose originado pela atividade da β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase é bastante utilizado como substituinte de soluções de sacarose na indústria farmacêutica, além de aplicações como agente plastificante.

2.2 Imobilização de enzimas

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula em um sistema analítico (adaptado de CARDOSO *et al.*, 2009). Mais especificamente, a imobilização enzimática mantém o biocatalisador fisicamente confinado ou localizado numa certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usado repetida e continuamente (CHIBATA *et al.*, 1978, citado por GROSOVÁ *et al.*, 2008). Entre diversos benefícios possíveis, essa retenção permite a facilitada separação das biomoléculas de interesse do meio reacional, solucionando uma das principais dificuldades em usá-las de modo livre.

Historicamente, o estudo de enzimas imobilizadas iniciou-se no início do século XX, quando da observação de que carvão ativo, ao qual havia sido adicionada solução com atividade invertásica, mesmo após lavagens sucessivas mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose (NELSON e GRIFFIN, 1916 citado por CASTRO *et al.*, 2008). A partir de então, passou-se a investigar como otimizar as condições de imobilização, afim de poder utilizar esta técnica em diferentes aplicações. A imobilização tem como principais objetivos: manter e promover a estabilização das enzimas, bem como permitir sua reutilização. Outras vantagens têm surgido nos estudos envolvendo imobilização, como exemplo o aumento da atividade da proteína, controle e manipulação da seletividade, e reações multi-enzimáticas, o que tem impulsionado ainda mais o desenvolvimento e aplicação de derivados imobilizados em processos industriais (BRADY e JORDAAN, 2009).

Considerando que o uso dos biocatalisadores em última instância é visado para grandes escalas, é intenso o desenvolvimento de protocolos de imobilização que proporcionam muito mais que a ligação da enzima ao suporte, mas sim avaliam fatores como a resistência mecânica do sistema imobilizado, quão simples é o protocolo de imobilização e se este requer uso de reagentes tóxicos ou instáveis (MATEO *et al.*, 2007).

Devido à diversidade de enzimas, seus diferentes substratos, tipos de reação e configurações variadas de reatores é notório que cada processo envolvendo biocatalisadores apresente suas peculiaridades. Estas implicam no desenvolvimento de distintos suportes e

métodos de imobilização, explicando o porque de não haver uma metodologia universal para a imobilização enzimática (CAO, 2005a; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

2.2.1 Métodos de imobilização

De modo geral os métodos de imobilização enzimática podem ocorrer via suportes pré-existentes, e sem a presença de suportes (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A imobilização de enzimas sem a presença de suporte é possível usando agentes bifuncionais que ligam as proteínas umas às outras. Quando a enzima está pura pode-se gerar o seu cristal e após promover ligações cruzadas, originando os CLEC (cross-linked enzyme crystal). Caso a enzima não esteja totalmente purificada pode-se promover a precipitação das proteínas com posterior ligação cruzada dos agregados, dando origem aos CLEA (cross-linked enzyme aggregate). Recentemente desenvolveu-se uma técnica que induz a formação de agregados esféricos, mantendo o sítio ativo da enzima para a face externa da partícula, aumentando consideravelmente a atividade da proteína (BRADY e JORDAAN, 2009) (Figura 1). Tanto CLEC quanto CLEA comerciais apresentam diâmetro na escala de μm , e apesar de rígidos são suscetíveis à abrasão (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

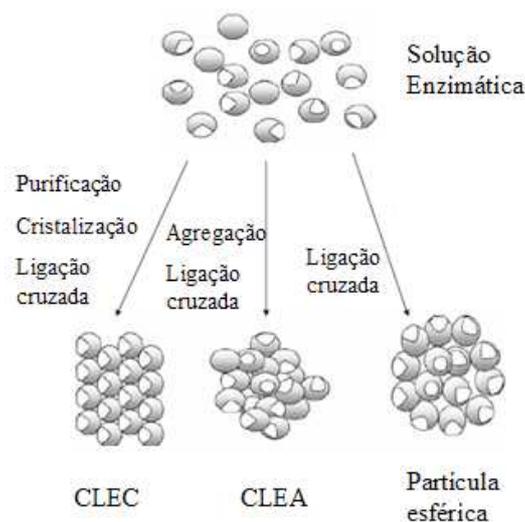


Figura 1: Formação de enzimas imobilizadas sem a presença de suportes. Fonte: Adaptado de Brady e Jordaan, 2009.

A imobilização em suportes pode ocorrer em matrizes porosas e não porosas. Em relação àquela, a fundamentação dá-se na diferença de tamanho entre as moléculas do catalisador e do substrato, havendo a formação de uma estrutura tridimensional que aprisiona a enzima em seu interior ou mesmo promove o confinamento da proteína por uma membrana. Caso não haja a formação de ligações físicas ou químicas, é mantida a mobilidade da enzima, ao mesmo tempo em que há a proteção da mesma evitando o contato direto com o meio externo, minimizando o efeito de solventes orgânicos e hidrofóbicos. É possível ainda fazer uso de agentes de ligação cruzada (*cross-linking*) como o glutaraldeído, promovendo a ligação das moléculas da enzima umas com as outras, impedindo assim sua saída pelos poros durante os reusos do sistema imobilizado. Como exemplos desta técnica citam-se o aprisionamento *in situ* (*entrapment*) com o uso de matrizes poliméricas orgânicas ou sol-gel, e a encapsulação em gel e em suportes fibrosos (BRADY e JORDAAN, 2009), sendo que esta última também pode envolver micelas reversas formadas por surfactantes (BICKERSTAFF, 1997 citado por CARDOSO *et al.*, 2009). Tanto o aprisionamento quanto a encapsulação apresentam algumas desvantagens, pois requerem concentração enzimática relativamente alta que garanta a suficiente imobilização, o catalisador pode ser inativado durante a execução da técnica, e podem ocorrer problemas difusionais (baixa transferência de massa), já que os suportes dificultam a saída das moléculas internas e principalmente o acesso das moléculas externas, situação agravada quanto maior for a molécula do substrato.

Os métodos de imobilização descritos a seguir podem ocorrer em suportes porosos, porém são mais comuns em matrizes não porosas. A adsorção é uma técnica simples, a qual gera pouca perturbação sobre a estrutura nativa do biocatalisador, já que a interação física entre este e o suporte dá-se através das forças de van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Assim, facilmente pode-se provocar a dessorção da enzima, especialmente na presença de solventes aquosos, o que torna-se um fator limitante. Consequentemente esta técnica encontra melhores resultados quando do uso de solventes orgânicos (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A técnica de imobilização por afinidade faz justamente o uso da afinidade entre duas biomoléculas para promover a imobilização, tendo como grande vantagem a alta seletividade; ainda assim, a molécula inicialmente em contato com o suporte provavelmente esteja ligada via covalentemente. Há ainda a imobilização via pontes dissulfeto, e via metais com possível formação de quelatos, baseada na prévia deposição sob o suporte de metais de transição como os sais de zircônio e titânio, os quais interagem reversivelmente com grupamentos da enzima (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006).

Outra técnica simples de imobilização, considerada por alguns autores como um tipo de adsorção, envolve interações eletrostáticas (ligações iônicas) entre a enzima e o suporte. Essas interações são mais fortes que as comentadas anteriormente, visto que são íon-íon, ocorrendo poucas mudanças conformacionais na enzima; porém, como a ligação é reversível, na presença de solventes com relativa alta força iônica pode haver a liberação da enzima pelo suporte, o que limita a utilização desta técnica (e mesmo da adsorção) em grande escala, já que assim a proteína pode contaminar o produto final (CASTRO *et al.*, 2008).

Entre todas as técnicas de imobilização desenvolvidas, a que dá-se por ligação covalente é a mais difundida e estudada, pois há a formação de uma ligação dita ‘forte’ (estável) entre os grupos funcionais presentes na superfície da enzima e os grupos químicos do suporte. De modo geral os tipos de ligações covalentes podem ser através de Reações de Ugi, acilação com imidoéster, via carboidrato, oxirano ou tio-dissulfito, via ativação de grupos carboxil, e método benzoquinona (CAO, 2005b). Os grupos químicos do suporte (como exemplo funções aminadas, hidroxilas e carboxilas) devem ser inatos, ou oriundos via prévia ativação com agentes adequados. Um desses agentes é a molécula bifuncional glutaraldeído, que promove a formação da função aldeído no suporte, a qual fará ligação covalente com o resíduo amino terminal da enzima. A ligação covalente não permite que a molécula de enzima se desprenda do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica (CASTRO *et al.*, 2008), ou seja, não ocorre dessorção. Estudos apontam que em suportes porosos dependendo do tamanho do poro, quantidade de enzima imobilizada, entre outros fatores, a ligação covalente entre a proteína e o suporte pode não gerar dificuldades difusionais, nem mesmo alterar parâmetros de estabilidade, ou seja, mimetiza-se a enzima em sua forma livre, apenas diferindo desta por facilitar sua separação do meio reacional (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Uma maneira de promover a rigidificação da enzima, objetivando limitar seu movimento e com isso alcançar maior estabilidade é através da ligação covalente multipontual. Esta baseia-se no uso de suportes altamente ativados via espaçadores curtos e envolvem mais do que um resíduo da enzima (Figura 2) (MATEO *et al.*, 2007). Há uma correlação positiva entre o número de ligações proteína-suporte com o grau de estabilização da enzima (PEDROCHE *et al.*, 2007). A principal desvantagem da imobilização covalente dá-se quando a enzima perdendo sua atividade impede o reuso do suporte, pois normalmente não pode dele ser separada. Porém, a versatilidade e estabilidade provenientes desse tipo de ligação muitas vezes a torna uma estratégia bastante vantajosa para processos de imobilização.

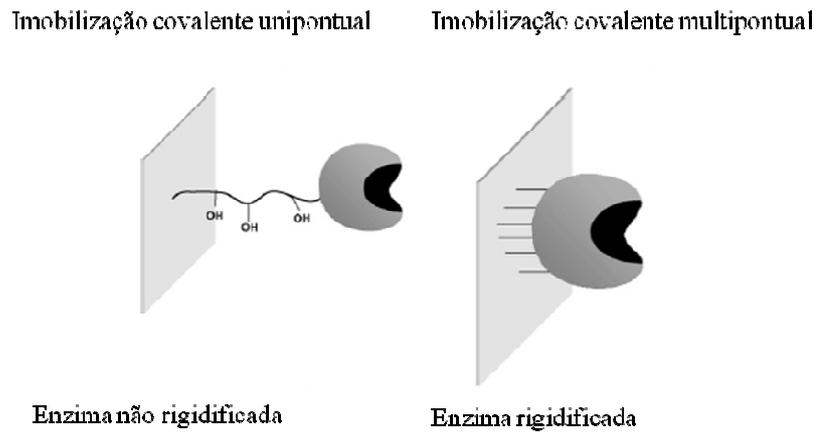


Figura 2: Efeito da imobilização na estabilidade da enzima. Fonte: Adaptado de Mateo *et al.*, 2007.

A figura 3 explicita os métodos de imobilização citados, dividindo-os em reversíveis e irreversíveis em relação à separação-recuperação da enzima dos respectivos suportes.

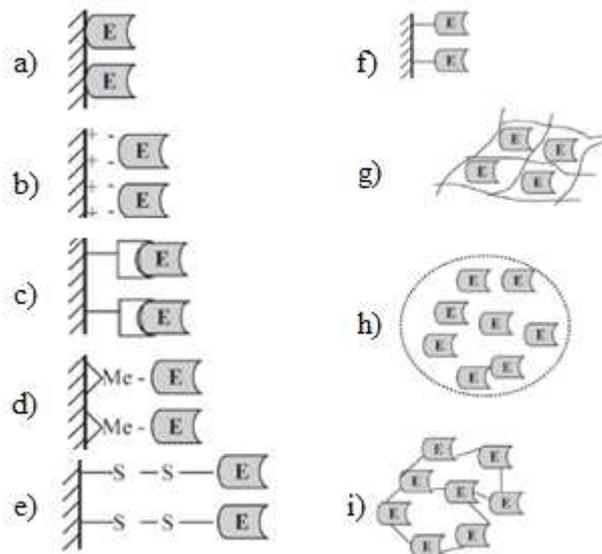


Figura 3: Métodos de imobilização reversíveis (a-e) e irreversíveis (f-i). Adsorção (a), ligação iônica (b), ligação por afinidade (c), ligação por metal ou quelatação (d), pontes dissulfeto (e), ligação covalente (f), aprisionamento (g), encapsulação (h), ligações cruzadas (i). Fonte: Adaptado de Brena e Batista-Viera, 2006.

2.2.2 Suportes para imobilização

Notada a importância da compreensão dos métodos de imobilização, faz-se igualmente necessário avaliar as características dos suportes, já que juntamente com as peculiaridades da enzima, o desempenho do biocatalisador imobilizado depende diretamente do material ao qual está ligado.

Idealmente, na seleção de dado suporte para a imobilização, deve-se observar os seguintes fatores: características morfológicas (quanto maior a área superficial, com porosidade bem definida para permitir o acesso do substrato à enzima, maior a probabilidade de imobilização de quantidades significativas do biocatalisador); natureza hidrofílica (suportes hidrofílicos de modo geral permitem uma melhor difusividade do substrato em comparação aos hidrofóbicos, por isso é preciso avaliar o grau de hidrofília, pois a quantidade de água altera o microambiente suporte-enzima-substrato); insolubilidade (essencial para que além de não permitir a liberação da enzima, evite a contaminação do produto); estabilidade térmica, química e mecânica (capaz de resistir frente às condições de ativação, durante o processo de imobilização, e no decorrer das reações); estabilidade ao escoamento (adequando essa característica ao reator de interesse); resistência ao ataque microbiológico (evitando a alteração do suporte e a própria liberação da enzima ao meio); regenerabilidade (possibilitando novos usos); custo (atrelado inclusive à disponibilidade) e características químicas (deve haver grupos químicos que possam ser ativados ou modificados no suporte, permitindo a ligação com a enzima, sem desnaturá-la) (CASTRO *et al.*, 2008).

De modo geral, materiais poliméricos têm sido bastante utilizados devido a propriedades como boa resistência mecânica e versatilidade quanto a suas formas de apresentação. Por exemplo, é possível a partir de uma única matriz manipulável obter suporte na forma de partículas, membranas e nanofibras (FANG *et al.*; 2011).

Em relação à classificação dos suportes sólidos quanto à composição química, têm-se os orgânicos e inorgânicos (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação e exemplos de suportes para imobilização quanto à composição química.

Orgânico
* Polissacarídeos: celulose, dextrana, agar, agarose, quitina, alginato
* Proteínas: colágeno, albumina
* Carbono
* Poliestireno
* Outros polímeros: polimetacrilato, poliacrilato, poliacrilamida, poliamidas, vinil
Inorgânico
* Bentonita, sílica, vidro, metais, óxidos metálicos

Fonte: Adaptada de Brena e Batista-Viera, 2006.

Os suportes inorgânicos apresentam vantagens como elevada estabilidade térmica e mecânica, bem como resistência a microrganismos e solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Como exemplos de suportes inorgânicos comerciais há matrizes à base de alumina, zeolitos, e sílica de porosidade controlada (SHELDON, 2007). Os suportes orgânicos são menos resistentes mecanicamente, e comparando-se os sintéticos e naturais, estes são de custo inferior àqueles e de fácil degradação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). É possível adquirir polímeros orgânicos comerciais compostos de resinas acrílicas e polivinil álcool, por exemplo (SHELDON, 2007).

Os suportes podem ainda ser classificados morfologicamente como porosos e não porosos. Os não porosos apresentam como vantagem a baixa limitação difusional, porém comparados aos porosos a área superficial destes é maior, permitindo maior carregamento enzimático, bem como certa proteção ao biocatalisador frente ao ambiente. Assim, é importante avaliar a presença ou não de poros e suas dimensões, que aliada ao tamanho da partícula afetam de modo crítico a capacidade de ligação da enzima (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006).

Recentemente tem sido desenvolvida a imobilização de enzimas em líquidos iônicos. Por definição, líquidos iônicos são sais orgânicos com temperatura de fusão inferior a 100 °C, ou seja, apresentam-se líquidos à temperatura ambiente (YANG e PAN, 2005). Dependendo de quais cátions e ânions são utilizados na formulação, é possível manipular propriedades químicas e físicas como a polaridade e hidrofobicidade. De modo geral, apresentam características como não inflamabilidade, alta estabilidade térmica e química. Parte dos trabalhos descritos na literatura os utiliza diretamente como suportes, mas a maioria

demonstra os benefícios do uso sinérgico desses como solventes quando da presença de suportes sólidos (ZHAO, 2010).

2.2.2.1 Quitosana

A quitosana é um poliaminosacarídeo derivado da quitina, sendo esta o segundo biopolímero mais abundante da terra após a celulose (SHAHIDI *et al.*, 1999). A quitina é o principal constituinte de ‘casca’ de crustáceos, exoesqueleto de insetos e da parede celular de fungos, proporcionando dureza e estabilidade. Estima-se que seja sintetizada e degradada na quantidade de 10^{10} toneladas ao ano em toda biosfera. Na indústria pesqueira a quitina é oriunda principalmente de mariscos e camarões, sendo considerada um sub-produto de lenta biodegradação (KRAJEWSKA, 2003).

Quitina, quitosana e celulose são consideradas análogas, já que a diferença entre elas dá-se apenas nos substituintes no carbono 2 (Figura 4). A quitina é composta de unidades 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicose unidas por ligações $\beta(1-4)$, sendo que a quitosana é obtida pela N-desacetilação daquela em diferentes graus. A quitosana é insolúvel em água, mas a presença dos grupamentos amino lhe confere basicidade e a torna um dos poucos polieletrólitos catiônicos encontrados na natureza. Assim, sua solubilidade dá-se em pHs ácidos abaixo de 6,5. Quando em solução ácida adquire alta carga residual positiva, permitindo adesão a superfícies carregadas negativamente, formação de quelatos com íons de metais pesados, e agregação a compostos polianiônicos, sendo que esta última situação confere a excelente capacidade de gelificação (KRAJEWSKA, 2003), explorada neste trabalho.

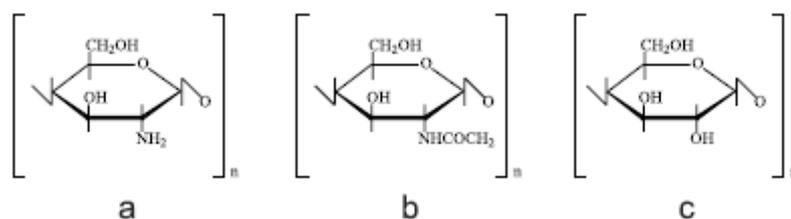


Figura 4: Estruturas dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b), e celulose (c). Fonte: Mendes *et al.*, 2011.

De modo simplificado, a obtenção de quitosana através de sub-produtos da indústria pesqueira pode dar-se via termoquímica pela desproteinização da matéria-prima com solução básica, seguida de desmineralização, desta vez com uso de solução ácida. A desacetilação é feita com solução de NaOH (40-45 %) sob temperatura próxima de 110 °C, seguida de procedimentos de purificação. O grau em que é feita a desacetilação reflete nas características da quitosana obtida, resultado de temperatura e tempo de reação, concentração da solução álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas de quitina e presença de agentes que evitam a despolimerização (CAMPANA FILHO e SIGNINI, 2001). A partir de alterações nos grupos funcionais reativos ligados aos carbonos 2, 3 e 6 (grupamento amino, e duas hidroxilas, respectivamente) da quitosana é possível obter importantes derivados (Figura 5).

Apesar de menos usual e ainda passível de otimização, a obtenção de quitosana também pode ocorrer via enzimática, através da ação de desacetilases de quitina (E.C. 3.5.1.41). Essas enzimas são encontradas em insetos e fungos como *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* e duas cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*. Mesmo necessitando tratamento prévio da quitina para facilitar a acessibilidade da enzima aos grupamentos acetil do polímero, aumentando o rendimento e a taxa de desacetilação, este modo de obtenção da quitosana apresenta vantagens perante o termoquímico: reduzido consumo de energia, menor geração de soluções alcalinas potencialmente poluidoras, e maior controle do peso molecular e do grau de desacetilação dos produtos gerados (TSIGOS *et al.*, 2000).

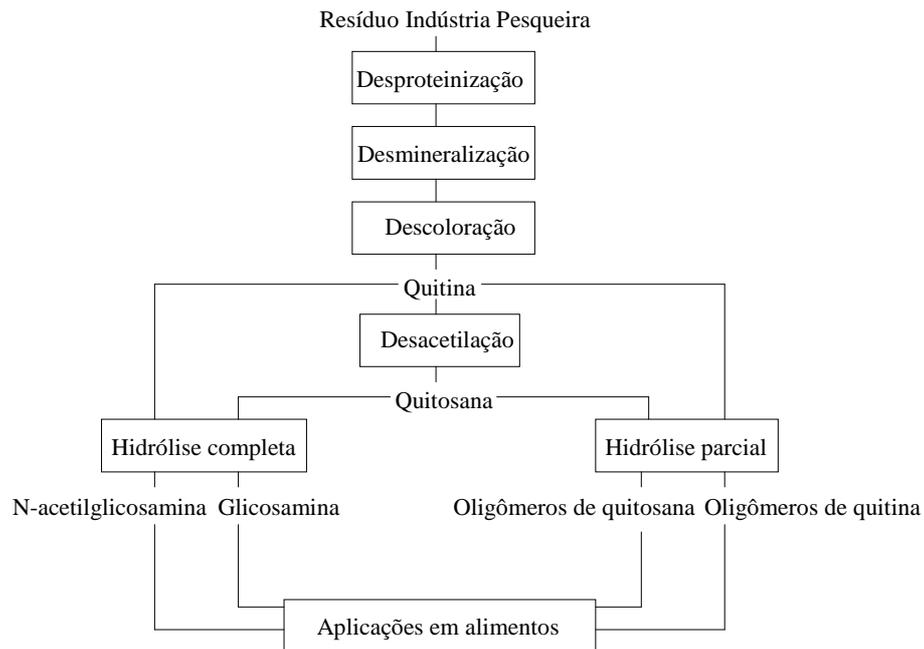


Figura 5: Fluxograma de obtenção de quitina, quitosana e seus derivados via termoquímica a partir de resíduos da indústria pesqueira. Fonte: Adaptado de Shahidi, 1999.

Considerando que a quitosana além de ser biodegradável, é biocompatível, atóxica, tem propriedades antimicrobianas, hemostática, antitumoral e anticolesterolêmica, apresentando notável afinidade por proteínas, fica evidente sua aplicabilidade em diversas áreas. Como exemplos, em tratamentos de purificação de águas (retirando íons indesejáveis, atuando como espécie de membrana, promovendo agregação-floculação de resíduos), na agricultura (em mecanismos de liberação controlada de agrotóxicos, como cobertura de sementes), na indústria de polpa e papel (tratamentos de superfície), em cosméticos (em cremes e loções), na área médica (no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, na engenharia de tecidos biológicos), e como aditivo na indústria de alimentos promovendo maior qualidade nutricional (em produtos com apelo para menor absorção de gordura se consumidos já que nestes também atua como fibra dietética, como conservante, constituindo material de embalagens, provocando a clarificação de frutas e bebidas, estabilizando a coloração, e até mesmo na fabricação de rações animais) (SHAHIDI *et al.*, 1999).

Outra interessante aplicação da quitosana é como suporte para a imobilização de enzimas, sendo comercializada na forma de pó e flocos. Segundo Krajewska (2003), pode-se

dividir os métodos de preparação da quitosana como suporte em 4 grupos: evaporação do solvente, neutralização, ligação cruzada e gelificação ionotrópica.

O método de evaporação do solvente é utilizado principalmente para a preparação de filmes e membranas, úteis na composição de superfícies de eletrodos. Basicamente, a quitosana em solução é disposta na superfície em questão e sob temperaturas acima de 65°C evapora-se o solvente. Faz-se uso de um agente de reticulação pré-secagem, e após diferentes técnicas de ativação da película originada.

O método da neutralização promove a precipitação da quitosana dissolvida em soluções ácidas pelo gotejamento em soluções básicas. Este método é mais útil na produção de esferas de diferentes tamanhos e porosidades, sendo comum também o uso de algum agente de reticulação.

O método de ligação cruzada por sua vez mistura solução ácida de quitosana diretamente com agente de reticulação, o que resulta em formação de gel. Este gel pode ser manipulado para gerar partículas e mesmo filmes de suporte. Vale ressaltar que pelo uso prévio de agente de ligação cruzada (geralmente moléculas bifuncionais como o glutaraldeído) não se faz necessária posterior ativação.

Por fim, a gelificação ionotrópica, método utilizado neste trabalho. Conforme ligeiramente esboçado, devido à natureza catiônica da quitosana em solução ácida, em contato com polieletrólitos aniônicos ocorre a imediata atração das moléculas devido às cargas opostas, formando então complexos insolúveis (gel) em água. Como exemplos de polieletrólitos aniônicos há a carragena, alginato, polifosfatos e sulfatos orgânicos. Novamente, é possível manipular o gel obtido para gerar diferentes apresentações de suporte. Para a fabricação de esferas (partículas), fez-se uso de gotejamento de sulfato de sódio em solução de quitosana em ácido acético sob agitação. A posterior ativação foi feita com glutaraldeído, conforme representado na figura 6.

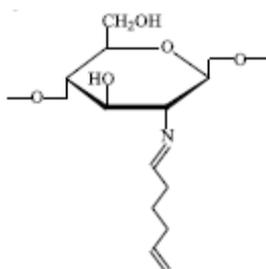


Figura 6: Estrutura química da quitosana ativada com glutaraldeído via carbono 2.
Fonte: Adaptado de Mendes *et al.*, 2011.

2.2.3 Efeitos da imobilização: Vantagens e limitações

Após a imobilização, as propriedades físicas e químicas da enzima podem sofrer modificações. As diferenças no comportamento da enzima imobilizada, quando comparada à sua forma livre, devem-se aos seguintes fatores: efeitos conformacionais (alteração na estrutura terciária), efeitos estereoquímicos (a enzima é imobilizada de forma tal que o sítio ativo fica inacessível), efeitos de transferência de massa ou difusionais (devido à resistência de difusão do produto e do substrato ao sítio catalítico), efeitos microambientais (resultantes do método de imobilização ou da presença e natureza -grau de hidrofilia- do suporte na vizinhança da enzima). Esses fatores podem influenciar nas propriedades cinéticas, modificações de constantes de velocidade (K_m e V_{max}), no deslocamento de valores ótimos de pH e temperatura (DIXON e WEBB, 1979 citado por CARDOSO *et al.*, 2009).

Conforme previamente abordado, dentre as principais vantagens que a imobilização enzimática acarreta, pode-se citar o fato de que por meio de métodos simples de filtração, centrifugação e/ou decantação é possível separar as enzimas utilizadas das soluções contendo os produtos, já que a imobilização facilita essa segregação. Outra importante vantagem é a possibilidade de reuso destas proteínas de alto valor agregado (MAZZUCA *et al.*, 2006), o que implica diretamente na redução dos custos dos processos em que estão envolvidas. O número de reusos vai depender, dentre outros fatores, da avaliação de parâmetros como quantidade de enzima imobilizada e com atividade catalítica remanescente. Segundo Kotwal e Shankar (2009) é possível, em um sistema de imobilização, fazer uso de outras enzimas concomitantemente, já que a técnica permite muitas vezes melhor controle das propriedades do biocatalisador, e os custos reduzidos permitem a inserção de uma proteína anteriormente considerada inviável devido a não reutilização.

A figura 7 exemplifica algumas das situações que podem ocorrer quando do uso de suportes sólidos na imobilização, afetando a atividade da enzima.

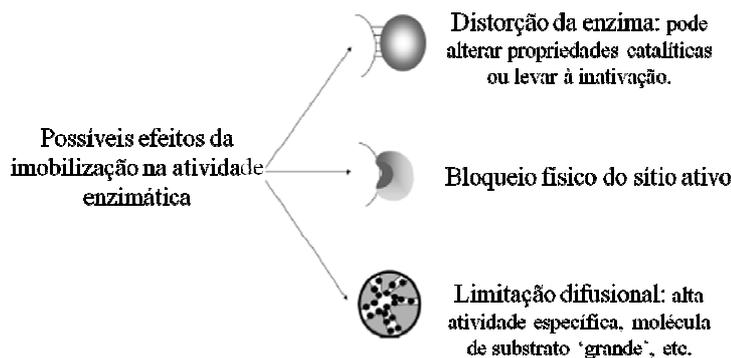


Figura 7: Possíveis efeitos da imobilização na atividade da enzima. Fonte: Adaptado de Garcia-Galan *et al.*, 2011.

Diversos trabalhos citam o melhoramento na atividade, estabilidade e seletividade das enzimas via técnicas de imobilização bem projetadas. Em relação à estabilidade, por exemplo, a estratégia de ligações covalentes multipontuais (representada acima) pode reduzir a possibilidade de alterações conformacionais envolvidas na inativação enzimática, e aumentar sensivelmente a estabilidade frente a agentes como calor, pH extremos e solventes orgânicos (MATEO *et al.*, 2007). Em contrapartida, se envolver nas ligações covalentes resíduos protéicos imprescindíveis para a própria manutenção da conformação enzimática, bem como intimamente ligados à atividade catalítica (por exemplo, resíduos constituintes do sítio ativo), pode ocorrer a distorção do biocatalisador, diminuindo a atividade da proteína e até mesmo provocando sua inativação.

O bloqueio físico do sítio ativo acontece quando não há uma orientação enzimática adequada. Essa situação desfavorável pode ser evitada através de técnicas de imobilização envolvendo meios e suportes com força iônica diferenciados, via indução da imobilização por regiões específicas como a porção carboidrato, e ainda através de mutagênese sítio-dirigida. Ou seja, a preservação dos sítios catalíticos nos processos de imobilização faz-se possível e tem apresentado vantagens não só por permitirem a manutenção da atividade enzimática, mas também tem proporcionado melhoramentos até mesmo na estabilidade do biocatalisador (HERNANDEZ e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Limitações difusionais acontecem geralmente quando ao fazer uso de suportes sólidos e porosos, a enzima fica imobilizada em seu interior, e há dificuldade de transição de íons e das próprias moléculas do substrato em migrar nesse microambiente. Essa limitação reflete negativamente na atividade do derivado imobilizado, e pode ser evitada fazendo-se uso de nanosuportes não-porosos, por exemplo (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

De modo geral, estratégias adequando protocolos de imobilização, e mesmo através de modificações pós-imobilização, podem tornar possível a estabilização e rigidificação da enzima, o impedimento de interações intermoleculares e de dissociação de subunidades protéicas, a geração de um microambiente artificial favorável ao biocatalisador, redução de efeitos inibitórios, modulação da seletividade e especificidade, e até mesmo a reativação da enzima (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

2.2.4 Exemplos de β -D- Frutofuranosídeo frutohidrolase imobilizada

A enzima β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase tem sido imobilizada em diversos suportes hidrofílicos, como a celulose, bem como em matrizes inorgânicas e resinas de poliestireno (KOTWAL e SHANKAR, 2009).

Pelo método da encapsulação, Siso *et al.*, (1997) testaram diferentes concentrações enzimáticas e de agente *cross-linking* (glutaraldeído) para a obtenção de microesferas de quitosana via *spray-drying*, apontando que esta seria uma técnica efetiva de imobilização. Hsieh *et al.*, (2000) compararam diferentes métodos de imobilização de invertase também utilizando quitosana como suporte. A enzima teve sua porção glicosilada previamente oxidada por periodato de sódio, e imobilizada de duas maneiras. Os melhores resultados em termos de atividade e estabilidade foram obtidos através da imobilização covalente unipontual diretamente no suporte, e pela imobilização contendo o espaçador glutaraldeído-etilenodiamina. Neste caso, houve aumento de cerca de 3 vezes no tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da enzima a 60 °C em comparação à forma livre, e em ambas as técnicas o pH ótimo decresceu de 4,5 para 2,5, enquanto a concentração de sacarose para atividade máxima subiu de 0,5 M para 1,0 M. Gómez *et al.*, (2000a) fizeram uso de técnica semelhante de imobilização (ainda com quitosana) via porção não protéica da enzima e obtiveram aumento de 5 minutos para 5 horas no $t_{1/2}$ da invertase a 65 °C. Imobilizando invertase modificada com quitosana em suportes à base de alginato e à base de carboximetilcelulose (ambos cobertos com quitina), Gómez *et al.*, (2006b; 2006c) notaram aumento de 10 °C e 5 °C, respectivamente, na temperatura ótima da enzima, o derivado imobilizado em alginato manteve 80 % da atividade após 50 horas de uso contínuo em reator de leito fixo, enquanto para o suporte com carboximetilcelulose a enzima manteve 100 % de atividade durante 70 horas. Fazendo 10 reusos deste derivado imobilizado, não houve perda de atividade.

David *et al.*, (2006) fizeram uso de uma matriz porosa de sílica funcionalizada com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS). Os grupamentos aminados gerados foram ativados com glutaraldeído. A enzima imobilizada através de ligação covalente manteve 99 % de sua atividade, e K_m 1,5 vezes menor, indicando interessante aumento da afinidade pelo substrato pós-imobilização. Kovalenko *et al.*, (2009) testando suporte à base de sílica-alumina coberto com nanofibras de carbono, imobilizaram invertase via adsorção e apontaram alta retenção da atividade enzimática pós-imobilização.

Ao testar a imobilização de β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase em suportes celulósicos preparados de modos distintos, Bryjak *et al.*, (2008) constataram que a preparação com alta atividade e estabilidade ao armazenamento foi obtida com o uso de Granocel modificada com pentaetilenodiamina (espaçador), apresentando alto teor de grupos amina e ativada com glutaraldeído. Os autores indicam a manutenção de atividade residual próxima a 100 % após 20 reusos em batelada da enzima imobilizada.

Notada a ausência de relatos de imobilização de invertase de *S. cerevisiae* em nanopartículas de quitosana, suporte orgânico natural de alta área superficial, utilizando o método de gelificação ionotrópica para sua preparação e glutaraldeído como agente de ativação, este trabalho valeu-se da investigação da viabilidade destes fatores em conjunto como método de imobilização e posterior avaliação de diferentes parâmetros no derivado imobilizado.

3 RESULTADOS

Parte dos resultados deste trabalho está apresentada na forma de artigo (item 3.1) a ser submetido para publicação na revista Food Chemistry, já formatado de acordo com as normas da respectiva revista. Os demais resultados são mencionados no item 3.2.

3.1 High operational stability in sucrose hydrolysis of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles

High operational stability in sucrose hydrolysis of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles

Sheila Garziera Valerio ^a, Joana Silva Alves ^a, Manuela Poletto Klein ^b, Rafael Costa Rodrigues ^c, Plinho Francisco Hertz ^{a,*}

^a Enzymology Lab, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500 P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Engebio Lab, Technological Center, Federal University of Santa Catarina, Trindade P.O. Box 476, ZC 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^c Biocatalysis and Enzyme Technology Lab, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7094; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: plinho@ufrgs.br (P. F. Hertz).

Highlights

- Invertase from *S. cerevisiae* was covalently immobilized on chitosan nanoparticles.
- The support provided high superficial area.
- The immobilized derivative showed good recovery of enzyme activities.
- High operational stability was reached: 59 reuses with maximal enzyme activity.

Abstract

Invertase (E.C.3.2.1.26) from *Saccharomyces cerevisiae* was covalently immobilized on chitosan prepared by the ionotropic gelation method and activated with glutaraldehyde. The support was characterized and it was studied its load capacity, the influence of the presence of substrate during immobilization, and determined the biocatalyst kinetic parameters and stabilities. The light scattering analysis (LSA) and transmission electron microscopy (TEM) techniques indicated a mixture of chitosan nano and aggregated nanoparticles, providing high superficial area for enzyme immobilization. The thermal and storage stabilities, the optimal pH and temperature of the enzyme were not altered. K_m increased 3-fold, while V_{max} remained unaltered. The immobilized biocatalyst was reused for 59 batches with maximal invertase activity, the highest operational stability so far described in the literature. These results fulfill some important aspects for the enzyme immobilization: the simplicity of the protocols, the conservation of the enzyme activity, and the high operational stability.

Key-words: Invertase, immobilization, chitosan nanoparticles, operational stability

1. Introduction

Invertase or β -D-fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) from *Saccharomyces cerevisiae* is an enzyme that has major specificity for sucrose hydrolysis. This reaction results in an equimolar mixture of α -D-glucose and β -D-fructose, known as invert syrup. As a consequence, the crystallization phenomenon is avoided and, as fructose is sweeter than sucrose, the sweetness of the product is higher. The prevention of crystallization justifies the main food industrial application of the enzyme in the manufacture of fillings of sweets, keeping the softness. Also, invertase can be applied in fermentation process, when sucrose is the substrate, in the manufacture of artificial honey, humectant agent for candies production, besides other applications as in cosmetic, paper and drug industry (Kotwal & Shankar, 2009).

The solubility of free enzymes makes their uses for large-scale relatively costly since in a mixture containing the substrate, products and other components, their recoveries are difficult, being economically unattractive (Kotwal et al., 2009). Nevertheless, biocatalysts are increasingly being employed because of their high selectivity and potential as a greener alternative to chemical catalysts (Polizzi, Bommarius, Broering & Chaparro-Riggers, 2007), which could result in the formation of undesirable colour and flavoring agents.

The interest for enzymatic processes is over growing, which also reflects the great interest for biocatalysts immobilization. Taking into account distinct applications, there are diverse immobilization techniques with different methods of linkages among enzymes and supports. It is noteworthy that each protein and support has typical characteristics, so there is no universal ideal method of immobilization. For example, when the support for the immobilization is solid and non porous, the size of the particles needs to be as small as possible, considering that nanoparticles provide a reasonable enzyme load capacity (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente & Rodrigues, 2011). In general, the enzyme

immobilization aims at keeping or increasing storage, temperature, pH, and operational stabilities.

An example of a polymer utilized as support for enzyme immobilization is chitosan. The polysaccharide is a derivative N-deacetylated to a varying extent from chitin, obtained from wastes of the fishing industry (Krajewska, 2004). Taking into account the versatility and high availability of chitin (the second most abundant biopolymer in nature), the possibility of applications of this polymer and its derivative in food and pharmaceutical industries is subject of many researches. Chitosan is insoluble in water, but amino groups make increase its solubility in pH 6.5 or below. Besides these properties, it is biocompatible, biodegradable, non toxic, has antibacterial properties, can form gel, and has some affinity to proteins (Krajewska, 2004). Siso, Lang, Carrenõ-Gómez, Becerra, Espinar & Méndez (1997) encapsulated invertase in chitosan microbeads. Invertase was modified with chitosan and immobilized in hyaluronic-acid-coated chitin support (Gómez, Ramirez, Cabrera, Simpson & Villalonga, 2008). Teodor, Radu, Dan & Stanciu (2006) utilized chitosan films for the biocatalyst immobilization. Biró, Németh, Sisak, Feczko & Gyenis (2008) described protocols for the preparation of chitosan support suitable for biocatalysts immobilization, applying to β -galactosidase. The ionotropic gelation method proposed for nanoparticles production, modified from that described by Berthold, Cremer & Kreuter (1996), showed the highest enzyme activity, serving as model for the chitosan preparation described in the present study.

The objective of this work was to immobilize invertase from *S. cerevisiae* on chitosan nanoparticles, increasing the superficial area for the biocatalyst immobilization, evaluating the enzyme properties and operational stability.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Invertase from *S. cerevisiae* (Maxinvert L 10000, batch 409200451) was kindly donated by DSM Food Specialties (The Netherlands). Chitosan from shrimp shells (>75 % deacetylated) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Sucrose and all other chemicals (acetic acid, dinitrosalicylic acid, ethylene glycol, glutaraldehyde, magnesium chloride, polysorbate 80, potassium phosphate, sodium and potassium tartrate, sodium chloride, sodium hydroxide and sodium sulfate) were of analytical grade and purchased either from Merck or Fluka (São Paulo, Brazil). All the following tests were performed in duplicate.

2.2. Preparation of chitosan particles

Chitosan support was prepared by ionotropic gelation according to the procedure described by Berthold et al. (1996) with some modifications. Chitosan (0.25 %) was dissolved in an aqueous solution of acetic acid 0.35 M containing 0.011 m³/m³ of polysorbate 80 (acetic acid solution is 95 % of the final sample volume). A solution of sodium sulfate 1.41 M was dropwised (0.052 m³/m³) under sonication during 6 min and following, the mixture was shaken with magnetic stirrer during 2 h. The particles were separated by centrifugation (15 min, 4 °C, 3000 x g) and washed with phosphate buffer (0.05 M; pH 7 with 1.5 mM MgCl₂) until neutrality. To promote cross-linking, the chitosan particles were suspended in 10 mL of the described buffer, with addition of glutaraldehyde 2.65 M (0.05 m³/m³). This activation was made under gentle stirring for 30 min. The excess of glutaraldehyde was washed out with the potassium phosphate buffer.

2.3. Dry weight and support size determination

Support dry weight was performed after activation by lyophilization. The further immobilization results are expressed as units of enzyme activity by dry mass of support.

Two different techniques were utilized for support size determination, considering the procedures involved in the preparation of the samples for analysis and the sensitivity of each equipment. Results of the mean particle size before activation were performed using filtered sample (membrane of 45 μm of diameter) in light scattering analysis (LSA) on a Brookhaven Instruments standard setup (BI-200 M goniometer, BI-9000AT digital correlator) with a He-Ne laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) as light source. Using a JEOL JEM 1200ExII transmission electron microscope (JEOL, Tokyo) operating at 120 kV, the transmission electron microscopy (TEM) was done for attainment morphological images of chitosan particles before and after activation. The support was suspended in distilled water and after homogenized with ultrasonic bath for 5 min, the samples were negatively stained with uranyl acetate solution (0.047 M). At room temperature the samples were air-dried.

2.4. Invertase covalent immobilization

Covalent immobilization of invertase on chitosan beads was carried out incubating 0.05 g (dry weight) of the chitosan activated support with 10 mL of each enzyme solution in acetate buffer (0.1 M; pH 4.5) overnight under gentle stirring, at room temperature. Then, the immobilized enzymes were centrifuged (15 min, 4°C, 3000 x g) and washed with solutions of acetate buffer (0.1 M; pH 4.5), sodium chloride (1 M), ethylene glycol (5.38 M), and again with acetate buffer, until activity was no longer detected in the washing solutions. The immobilization yields were calculated using equation 1:

$$IY = \frac{U_i - (U_s + U_w)}{U_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Where IY is the immobilization yield, U_i is the initial enzyme activity in the solution, U_s the activity in the supernatant after immobilization, and U_w the activity in the washing solutions.

The efficiency of immobilization was defined as:

$$Ef = \frac{U_i}{IY} \cdot 100 \quad (2)$$

Where Ef is the immobilization efficiency, U_i the activity in the immobilized enzyme, and IY the immobilization yield.

Except for free enzyme, all aliquots were submitted to the washing solutions.

2.5. Enzymatic activity assay

Based on the protocol described by Bryjak, Liesiene & Stefuca (2008), activities of free and immobilized enzyme were assayed by the addition of invertase suspension (1 mL of final volume) in acetate buffer (0.1 M; pH 4.5) to 2 mL of sucrose (8 % in the same buffer). The samples were incubated during 5 min at 55 °C in a water bath (with agitation for the immobilized derivatives), and ice bath was used to stop the reaction. An aliquot of 100 µL was withdrawn and analyzed with 1 mL of DNS reagent by DNS method (Miller, 1959), in order to quantify released reducing sugars by the sucrose hydrolysis. The absorbance was measured at 540 nm and the results were calculated using glucose standard absorbances. The enzyme activity unit (U) was defined as the amount of enzyme liberating 1 µmol of reducing sugars per minute under the assay conditions. All samples were analyzed in duplicate.

2.6. Determination of optimal pH, temperature and kinetic parameters

For the determination of optimal pH and temperature of free and immobilized invertase, each parameter was individually changed (pH from 3.0 to 7.0; temperature from 40

°C to 70 °C). The buffers concentrations were 0.1 M, and except for pH 3 (citrate buffer) and for pH 7 (phosphate buffer), the others measurements were performed with acetate buffer.

The Michaelis-Menten constant (K_m) and V_{max} were calculated under optimal conditions, using Lineweaver-Burk plot.

2.7. Thermal stability

Thermal stabilities of free and immobilized invertase were performed at 55 °C and 65 °C. Samples were collected periodically until the residual activity was 10 %. Each sample was immersed in ice bath to stop the temperature damage and analyzed by previous enzymatic activity assay also being determined the half-life time ($t_{1/2}$).

2.8. Storage stability

Free and immobilized enzymes were stored at 8 °C in acetate buffer (0.1 M; pH 4.5), and their stabilities measured once a week, during 25 weeks.

2.9. Operational stability

The operational stability of the immobilized enzyme was obtained by sucrose hydrolysis at 55 °C. The batches run up during 30 min, under gentle stirring, using 20 mL of substrate (8 % in acetate buffer) and 0.05 g of support (200000 U/g support). At the end of each batch, homogenous samples were taken, centrifuged (15 min, room temperature, 3000 x g), and the supernatant obtained utilized for reducing sugars determination. The precipitated

pellet was recovered and used in a new batch (support washings among batches were not necessary).

3. Results and Discussion

3.1. Support size determination

Light scattering analysis (LSA) indicated that the mean particle size of non-activated support was 410.9 nm, with a low polydispersity of 0.266 (parameter related to the particle size homogeneity, being higher as unequal is the sample). In the absence of stabilizing agents the nanoparticles form unstable systems with a tendency to aggregation. These events are addressed in a recent review (Zhang et al., 2011) in which are discussed various aspects of the production of nanoparticles providing particular reference to their influence on stability and size. Figure 1 shows the transmission electron microscopy (TEM) pictures of the support not activated, indicating aggregated nanoparticles even before the utilization of glutaraldehyde. The TEM results after cross-linking (data not shown) indicate more particle aggregation phenomena, also showing the support with uneven surfaces and part of the samples reaching a micro size. The formation of larger support particles occurs because since the glutaraldehyde is a bifunctional agent, through its aldehyde groups it can crosslink two chitosan units from different polymeric chains (Monteiro Júnior & Airoidi, 1999).

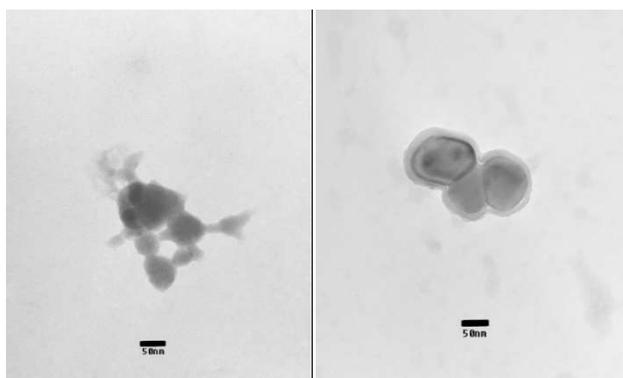


Figure 1: Transmission Electron Microscopy of non-activated chitosan particles.

LSA after activation (data not shown) without sample filtration presented very higher values for polydispersity, showing a wide distribution of the aggregated particles, where it is not possible to determine the mean particle size formed. By other side, performing LSA after activation with the filtration step, considerable part of the support was retained. Thus, because of these factors this technique was used only before cross-linking.

As briefly mentioned, based on the protocol described by Berthold et al. (1996) for producing chitosan microparticles, Biró et al. (2008) proposed some modifications with the aim of generating nanoparticles. The mean particle size determination found by the authors was 517 nm by using laser diffraction technique before activation, and at the same time a wide particle distribution from 0.5 to 50 μm (data after cross-linking are not shown) (Biró et al., 2008). The same authors also verified the aggregation phenomena even before activation, as well as described by Bharti, Meissner & Findenegg (2011) utilizing protocol for preparing silica nanoparticles, using a filtration step for separation the particles by size.

Each additional unit operation for the support preparation represents an additional cost, being less attractive for use in large-scale process. In order to minimize the number of steps for support preparation and the possible material losses inherent in each step, in this work filtration step for particle size classification was not performed. So, it can be concluded that the invertase was immobilized on a chitosan support constituted by nano and aggregated nanoparticles, which have high superficial area for enzyme immobilization.

3.2. Support load capacity

Different enzyme solutions were prepared diluting Maxinvert L 10000, for the determination of the support load capacity. Immobilization yields and efficiencies for each

concentration tests are presented in Table 1. Activity detected in the support increased with invertase concentrations, although not proportionally.

Table 1: Enzyme solutions for estimating support load capacity.

Sample	Offered Free Enzyme (U/g support)	Immobilized Enzyme (U/g support)	Immobilization Yield (%)	Immobilization Efficiency (%)
1	10400	9200	91.8	96.36
2	45800	45800	100	100
3	140600	119200	90.3	93.89
4	453600	207600	74.3	61.6
5	1121400	223200	59.87	33.24

The aim of this study involves only covalent linkages, so through the washing solutions (see section 2.4) is possible to remove the non-covalent attached enzymes (mainly adsorptions). According to Amaya-Delgado, Hidalgo-Lara & Montes-Horcasitas (2006), unipoint covalent immobilization in a non-porous support provides a system free of diffusion limitation. However, when high enzyme concentrations are immobilized diffusion limitation phenomena can happen, as result of the blocking effect caused by neighboring proteins, in part because there are random enzyme orientations (Wong, Khan & Micklefield, 2009), reducing the accessibility of substrate to the catalytic site (Giacomini, Villarino, Franco-Fraguas & Batista-Viera, 1998). Besides the considerations about the support load and the enzyme concentration, it is important to regard the uneven surfaces from the aggregated nanoparticles that, in part, resembles a porous structure. This suggested ‘porous nature’ (Biró et al., 2008) could be considered as another promoter factor for diffusion effects. These indications may explain the lower efficiency values for samples 4 and 5, compared to the

others. Considering free enzyme concentration offered values and immobilized enzyme detected, sample number 4 was selected for further experiments.

Once defined the enzyme concentration for following studies, the immobilization kinetics was evaluated (Figure 2a). With the purpose of checking if the presence of substrate would influence the enzyme immobilization by protecting its catalytic site (Cadena, Jeronimo, Melo, Silva, Lima Filho & Pimentel, 2010), experiments were performed maintaining sucrose concentration at 8 % in the immobilization solution, keeping the catalytic site saturated (Figure 2b).

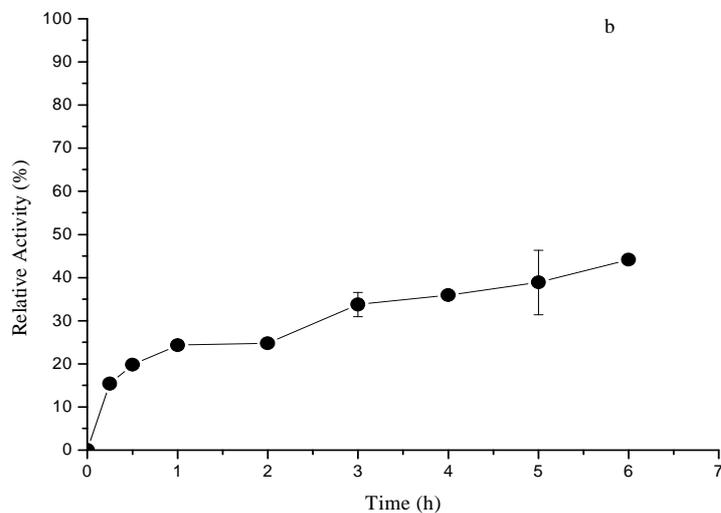
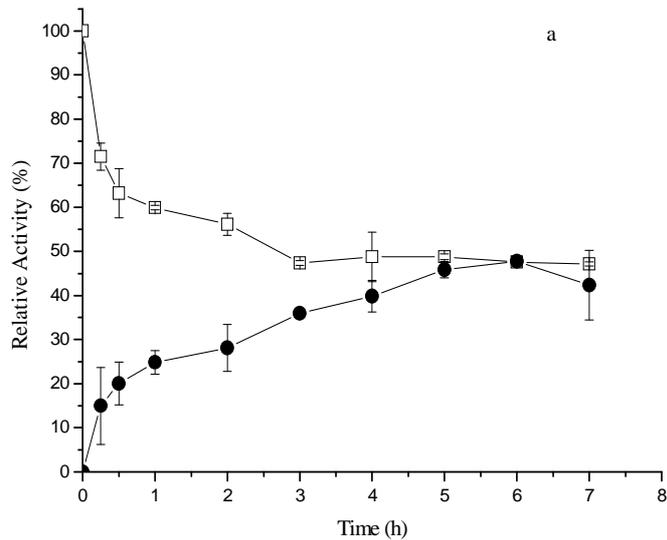


Figure 2: Supernatant of immobilization solution (□) and support activity (●) during invertase immobilization process. a) Absence of sucrose. b) In the presence of sucrose (8 %).

Immobilization occurred in 5 h, when around 50 % of the offered enzyme was immobilized in the support. It was defined 5 h as the immobilization time, since activity in the supernatant and support kept unaltered after this time. The presence of substrate (sucrose) in the immobilization solution did not improve enzyme immobilization, in contrast to another study (Cadena et al., 2010), in which is shown the increased covalent immobilization of invertase to an organic polymer in a sucrose solution (10%).

3.3. pH, temperature and kinetic parameters assay

Results for the effects of pH and temperature on the activity of free and immobilized invertase are presented in Figures 3 and 4, respectively. Activities are related to the highest value, which was considered as 100 % activity.

Although it is possible to change the optimal pH, temperature and kinetic parameters for an immobilized derivative as a result of the immobilization method, support structure and conformation change of the enzyme after bounded, making the catalytic site more or less accessible to substrate (Bayramoglu, Karakisla, Altintas, Metin, Saçak & Arica, 2009), in our work no alterations in pH and temperature were detected.

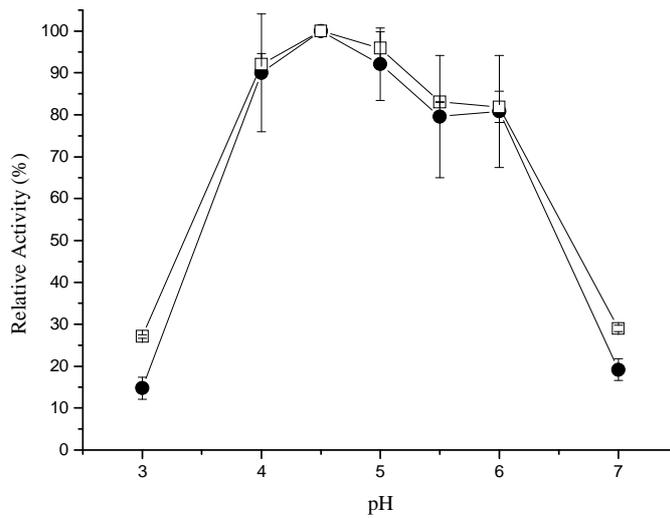


Figure 3: Effect of pH on free (\square) and immobilized (\bullet) invertase activity at 55 °C.

Figure 3 shows the same optimal pH (4.5) for both enzymatic preparations, indicating that there is no conformational alteration by immobilization process in the monomeric invertase. Other authors (Bahar & Tuncel, 2002) also covalently immobilized the enzyme onto polymeric supports and did not find shifts in optimal pH after immobilization. These authors considered this as a positive factor to the preservation of the biocatalyst during the immobilization process.

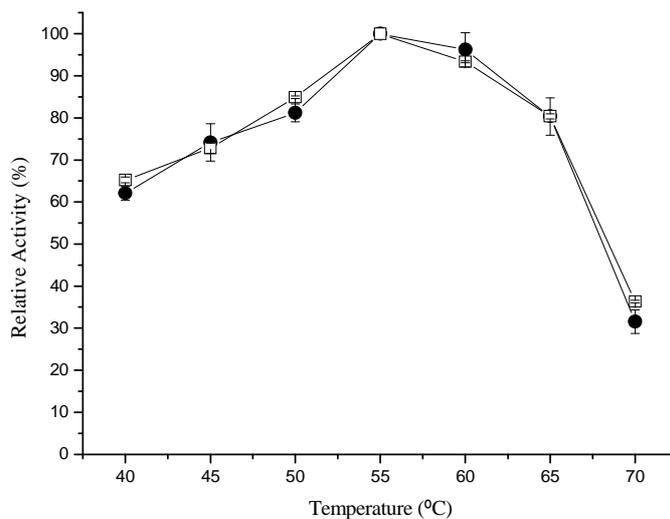


Figure 4: Effect of temperature on free (\square) and immobilized (\bullet) enzyme at pH 4.5.

It can be observed in Figure 4 that the behavior for free and immobilized invertase at different temperatures is similar, and 55 °C is the optimal temperature for both enzymatic forms. As stated in other studies (Mateo, Palomo, Fernandez-Lorente, Guisan & Fernandez-Lafuente, 2007; Rodrigues, et al., 2009) the one point covalent immobilization of the enzyme suggests that the immobilized biocatalyst presented the same rigidity than the soluble form. For these reason, the immobilization did not present rigidification and protective effects, as can be seen in multipoint or multisubunit covalent immobilization examples, where there are improvements in the stability of the enzymes (Mateo et al., 2007).

The determination of enzyme kinetic parameters is important because it is possible to measure the reaction rate and how it is influenced by physical and chemical conditions. The kinetic parameters for free and immobilized invertase (Table 2) were obtained by measuring the enzyme activities at sucrose concentration from 29.2 mM to 292.2 mM for free and immobilized invertase, in acetate buffer (0.1 M, pH 4.5) at 55 °C.

Table 2: Kinetic parameters for free and immobilized invertase.

Enzyme Form	K_m (mM)	V_{max} (U/mL)	Catalytic Efficiency ^a
Free	65.7	1670.0	25.4
Immobilized	205.7	1830.0	8.9

^a V_{max}/K_m

K_m for the biocatalyst after immobilization increased approximately 3-fold. The catalytic efficiency shows higher value for the free enzyme. Mazi, Emregul, Rzaev & Kibarer (2006) found similar results for invertase K_m (46 mM and 203 mM, for free and immobilized form, respectively) in a study using a polymeric membrane as support. This considerable reduction in the affinity of the enzyme for the substrate, could be due to the uneven surface of the support, and also attributed to the high concentration of protein that was immobilized,

generating diffusion effects. On the other hand, V_{\max} did not change, showing the conservation of the maximal conversion of sucrose into its monosaccharides.

3.4. Thermal stability

One of the different targets of immobilization is the improvement of the enzyme stability (Garcia-Galan et al., 2011), which is quite dependent of the immobilization technique, besides the enzyme and support characteristics (Cao, 2005). Considering 55 °C the optimal temperature obtained for free enzyme and immobilized form, and the fact that many immobilization techniques can improve enzyme stability (Mateo et al., 2007), thermal stability of free and immobilized invertase were carried out at optimal conditions (Figure 5) and at 65 °C. The enzymatic forms were incubated in the absence of sucrose.

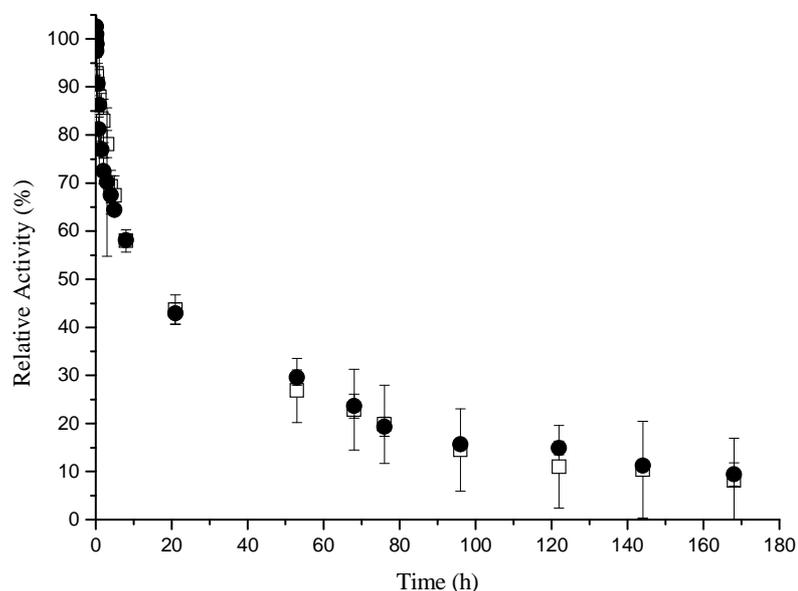


Figure 5: Influence of temperature on the stability of free (\square) and immobilized (\bullet) invertase at 55 °C and pH 4.5.

At 55 °C free biocatalyst and immobilized derivative showed very similar profile, with no difference between the half-life times before and after immobilization. At 65 °C (data not

shown) the half-life times also did not change between free and immobilized invertase, but sharply decreased for few minutes of incubation in relation to the results obtained for optimal temperature. Kumar, Chauhan & Nahar (2008) also observed significant decrease in immobilized derivative activity at temperatures higher than optimal. Gómez, Ramírez & Villalonga (2000) obtained similar result for free invertase at similar conditions, but increased this parameter for immobilized derivative, using an immobilization protocol that induced enzyme sugar moiety oxidation by sodium periodate. According to Turková (1999), the explanation is that nonpolar surface area of proteins indirectly induces the enzyme inactivation in vitro, therefore oriented immobilization protocols, which couple the biocatalyst to the support through carbohydrate moiety, can contribute to derivative stabilization.

The results from the present work agreed with previous reports, which showed that one-point attached enzymes to the support, with no diffusion limitations, have similar profiles to free biocatalyst (Garcia-Galan et al., 2011). Although there was not an improvement in the invertase thermal stability, the conservation of whole enzyme activity observed after immobilization is important because of the possibility of reusing the immobilized biocatalyst is dependent upon the residual enzyme activity.

3.5. Storage stability

For practical applications, storage stability of immobilized derivatives is important (Öztop, Hepokur & Saraydin, 2010), the more stable the better.

Free and immobilized invertase did not lose their activities after 25 weeks of storage at 8 °C and optimal pH, showing that there were neither biocatalyst modifications nor stabilization by the immobilization process.

3.6. Operational stability

Due to the high cost of enzymes, they should be reused for several times to be competitive with chemical catalysts. Ideally, the immobilization of enzymes should provide, besides thermal and solvent stabilities, a high operational stability (Bayramoglu et al., 2009). The results for repeated uses of the immobilized invertase in the sucrose hydrolysis are presented in Figure 6.

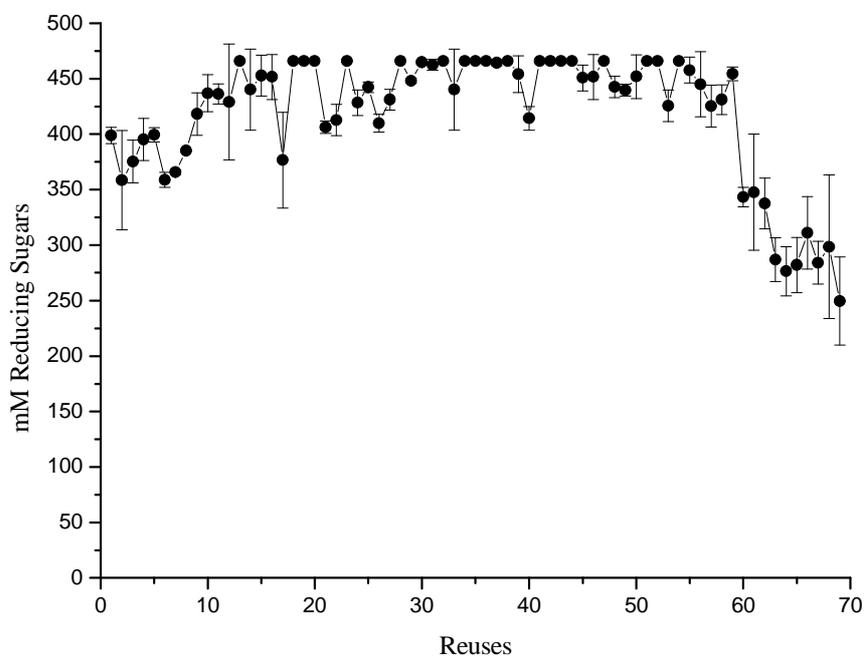


Figure 6: Residual enzyme activity using invertase immobilized in 0.05 g support in a sucrose solution (20 mL, 8 %) during 69 batches (each batch of 30 min, 55 °C, gentle stirring).

Figure 6 shows the expressive number of 69 reuses of the immobilized invertase, keeping the sucrose hydrolysis near to 100% (465.93 mM) until reuse 59. Raj, Chauhan, Azmi, Ahn & Manuel (2011) immobilized invertase onto nanogels, remaining 11.03 % of initial activity at the ninth cycle. Öztöp et al. (2010) reused the immobilized derivative (hydrogel-clay) for 26 successive batches retaining about 50 % of residual activity. Sanjay &

Sugunan (2008) observed 30 cycles keeping at the last one 70 % of activity using a mineral as support.

Probably the decrease in the activity shown at the final batches is a consequence to different factors as the progressive decay in mechanical resistance of the preparation (support-enzyme), inherent wastes by the material transfer, but mainly due to the natural denaturation of the biocatalyst. Nevertheless, the results obtained in this study are very attractive, since there was not found in literature any work for sucrose hydrolysis by immobilized invertase with similar number of reuses.

4. Conclusions

This work showed the immobilization of invertase from *S. cerevisiae* on nano and aggregated chitosan nanoparticles. The immobilization presented high recoveries of activities, with good immobilization yields and efficiencies. After the immobilization the enzyme presented similar parameters of the soluble form (optimal pH, temperature, thermal and storage stabilities). V_{\max} did not change, while K_m presented a sharp increase (from 65.7 mM to 205.7 mM), showing the reduction of the affinity of the enzyme for sucrose, yet keeping the invertase maximal conversion capacity. In terms of operational stability, the immobilized preparation could be reused for 59 batches at maximal enzyme activity. These results fulfilled some important requirements for the invertase immobilization because the protocols for support preparation and enzyme immobilization are simple, the enzyme activity and optimal conditions were conserved, and it was obtained the highest operational stability for sucrose hydrolysis so far described in the literature.

Acknowledgements

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Brazilian bureau for science and education, for its financial support and scholarships for this project.

References

- Amaya-Delgado, L., Hidalgo-Lara, M. E., & Montes-Horcasitas, M. C. (2006). Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*, 99, 299-304.
- Bahar, T., & Tuncel, A. (2002). Immobilization of Invertase onto Crosslinked Poly (*p*-chloromethylstyrene) Beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 83, 1268-1279.
- Bayramoglu, G., Karakisla, M., Altintas, B., Metin, A. U., Saçak, M., & Arica, M. Y. (2009). Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase. *Process Biochemistry*, 44, 880-885.
- Berthold, A., Cremer, K., & Kreuter, J. (1996). Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release*, 39, 17-25.
- Bharti, B., Meissner, J., & Findenegg, G. H. (2011). Aggregation of Silica Nanoparticles Directed by Adsorption of Lysozyme. *Langmuir*, 27, 9823-9833.
- Biró, E., Németh, Á. S., Sisak, C., Feczko, T., & Gyenis, J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 1240-1246.
- Bryjak, J., Liesiene, J., & Stefuca, V. (2008). Man-tailored cellulose-based carriers for invertase immobilization. *Cellulose*, 15, 631-640.
- Cadena, P. G., Jeronimo, R. A. S., Melo, J. M., Silva, R. A., Lima Filho, J. L., & Pimentel, M. C. B. (2010). Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresource Technology*, 101, 1595-1602.
- Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? *Biocatalysis and Biotransformation*, 9, 217-226.

- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353, 2885-2904.
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L., & Batista-Viera, F. (1998). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on sílica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, 313-327.
- Gómez, L., Ramirez, H. L., Cabrera, G., Simpson, B. K., & Villalonga, R. (2008). Immobilization of invertase-chitosan conjugate on hyaluronic-acid-modified chitin. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 264-277.
- Gómez, L., Ramírez, H. L., & Villalonga, R. (2000). Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan. *Biotechnology Letters*, 22, 347-350.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139.
- Kumar, S., Chauhan, V. S., & Nahar, P. (2008). Invertase embedded-PVC tubing as a flow-through reactor aimed at conversion of sucrose into inverted sugar. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 517-522.
- Kotwal, S. M., & Shankar, V. (2009). Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, 27, 311-322.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451-1463.
- Mazi, H., Emregul, E., Rzaev, Z. M. O., & Kibarar, G. (2006). Preparation and properties of invertase immobilized on a poly(maleic anhydride-hexen-1) membrane. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 17, 821-835.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Monteiro Júnior, O. A. C., & Airoidi, C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 119-128.
- Öztop, H. N., Hepokur, C., & Saraydin, D. (2010). Poly(acrylamide/maleic acid)-sepiolite composite hydrogels for immobilization of invertase. *Polymer Bulletin*, 64, 27-40.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., & Chaparro-Riggers, J. F. (2007). Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 220-225.
- Raj, L., Chauhan, G. S., Azmi, W., Ahn, J.H., & Manuel, J. (2011). Kinetics study of invertase covalently linked to a new functional nanogel. *Bioresource Technology*, 102, 2177-2184.

Rodrigues, R. C., Godoy, C. A., Filice, M., Bolivar, J. M., Palau-Ors, A., Garcia-Vargas, J. M., Romero, J. M., Wilson, L., Ayub, M. A. Z., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2009). Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, 44, 641-646.

Sanjay, G., & Sugunan, S. (2008). Acid activated montmorillonite: an efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. *Journal of Porous Materials*, 15, 359-367.

Siso, M. I. G., Lang, E., Carreño-Gómez, B., Becerra, M., Espinar, F. O., & Méndez, J. B. (1997). Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. *Process Biochemistry*, 32, 211-216.

Teodor, E., Radu, G. L., Dan, C., & Stanciu, V. A. (2006). Chitosan-hyaluronic acid films for enzyme immobilization studied by confocal scanning laser microscopy. *Revista de Chimie*, 57, 211-214.

Turková, J. (1999). Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *Journal of Chromatography B*, 722, 11-31.

Wong, L. S., Khan, F., & Micklefield, J. (2009). Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chemical Reviews*, 109, 4025-4053.

Zhang, F., Lees, E., Amin, F., Rivera-Gil, P., Yang, F., Mulvaney, P., & Parak, W. J. (2011). Polymer-Coated Nanoparticles: A Universal Tool for Biolabelling Experiments. *Small*, 7, 3113-3127.

3.2 Discussão Geral

É consenso na maioria dos trabalhos sobre imobilização de enzimas que não existe um suporte e um método universal para tanto. Embora um determinado número de aspectos práticos possa ser considerado antes do desenvolvimento dos experimentos de imobilização, muitas vezes são necessárias diferentes tentativas que envolvem testes de distintos suportes, métodos e até mesmo de diferentes fontes de enzima, até que se alcance um resultado satisfatório. Assim, além da imobilização da enzima invertase em nano e micropartículas (agregados de nanopartículas) de quitosana, foram testadas imobilizações em outros suportes. A tentativa de imobilização covalente unipontual em filmes de celulose foi feita com uma invertase comercial de *S cerevisiae* (Invertase[®]) comercializada em forma de pó pela empresa Novozymes. Os filmes de celulose, de superfícies de 1cm² cada, foram ativados durante uma hora com solução de glutaraldeído (2,5 %) em tampão fosfato de sódio 0,02 M e pH 7,0. O próprio tampão foi usado para as lavagens a fim de retirar o excesso de glutaraldeído. A enzima foi previamente solubilizada e deixada em contato com o suporte ativado para promover a imobilização. Os resultados não foram conclusivos, provavelmente devido ao fato de que as membranas de celulose utilizadas estavam impróprias (ressecadas) não garantindo a ativação, o tempo de contato enzima-suporte não otimizado, e ainda, naquele período a medida da atividade enzimática executada apresentava-se inadequada.

Devido à possibilidade e facilidade de utilização da enzima (ainda proveniente de *S. cerevisiae*) na sua forma líquida, os testes subsequentes foram realizados com MAXINVERT[®] L 10000 (DSM Food Specialties). Fez-se a imobilização em macroesferas de quitosana, cujo protocolo de preparação do suporte propõe, conforme CHIU *et al.* (2004), a precipitação de quitosana dissolvida em solução de ácido acético (2 %) por gotejamento em solução de hidróxido de sódio 1 N contendo 26 % v/v de etanol. Novamente a ativação com glutaraldeído 2,5 % foi feita, por um período de 3 h. Após, retirado o excesso com água destilada, adicionou-se a solução enzimática 'overnight' sob agitação. Medindo-se a atividade enzimática das macroesferas para verificar a eficiência da imobilização, em uma mesma batelada os valores mostraram-se bastante discrepantes, impedindo seu uso, já que não seriam confiáveis por não serem representativos. A provável causa desses resultados deu-se pelo fato de que apesar de ter sido feita a desaeração da solução de quitosana antes do gotejamento, evitando a inclusão de ar no interior das macroesferas, foi notória a presença deste, já que o fluxo utilizado na bomba peristáltica para o gotejamento estava acima da velocidade ideal, gerando macroesferas desuniformes.

O suporte comercial Immobead[®] 150 (Sigma Aldrich) também foi utilizado para imobilização de β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase. Este é um copolímero de metacrilato composto de grupamentos oxirano, com tamanho de partícula variando de 0,15 a 0,3 mm (SIGMA, 2011). Devido a sua relativa alta hidrofobicidade ser um fator desfavorável à imobilização em meio hidrofílico (podendo alterar de modo indesejado o microambiente e mesmo a conformação da enzima), fez-se tratamento prévio de 1 g de suporte com 10 mL de solução de acetonitrila P.A. durante 1 h para aumentar o caráter hidrofílico. Após, parte do suporte foi utilizada para a imobilização, enquanto o restante passou pelo processo de hidrólise dos grupamentos epóxidos a aldeídos. A formação ocorre via hidrólise com ácido sulfúrico (0,5 M, durante o tempo mínimo de 5 h, em uma relação 1:9 suporte:ácido), seguida de oxidação com periodato de sódio (0,1 M, durante 2 horas sob agitação, em uma relação 1:9 periodato de sódio: água destilada). Ambas preparações permitem a imobilização covalente via epóxidos e aldeídos, respectivamente. Contudo, a imobilização da enzima ao suporte por esse tipo de interação foi praticamente nula, já que a invertase foi detectada quase que em sua totalidade nas sucessivas lavagens inerentes a esse protocolo de imobilização. Apesar desses resultados, não se deve descartar a hipótese de novos experimentos, pois novamente a concentração de enzima e o tempo de contato desta com o suporte podem ter sido inferiores aos mínimos necessários.

Em paralelo aos testes de imobilização com suporte à base de quitosana, testou-se a atividade de transferase da invertase de *S. cerevisiae* para a produção de FOS, considerando as interessantes aplicações destes e seus benefícios à saúde. Segundo Hernalsteens e Maugeri (2008), os estudos avaliando a produção de FOS por invertase oriunda de leveduras são minoria frente ao número de relatos para fungos e bactérias. Assim, incubou-se 0,05g de derivado imobilizado em nanopartículas contendo cerca de 10380 U enzimáticas, durante 48 h, em solução de sacarose 60% (50 mL) a 55 °C. O tempo de incubação e a concentração de substrato foram baseados em referências que apontavam condições semelhantes para a enzima, porém de outras origens microbianas (HERNALSTEENS e MAUGERI, 2008). Através da medida dos açúcares redutores via método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959), e determinando-se a concentração da glicose via kit Glicose PAP Liquiform (Labtest), pode-se deduzir a seguinte relação:

$$F = R - G \quad F' = G - F \quad F' = 2G - R$$

onde F corresponde à quantidade de frutose livre; R indica açúcares redutores livres; G aponta glicose livre; e F' corresponde à quantidade de frutose transferida à sacarose, formando os FOS (NGUYEN *et. al.*, 2005). Os resultados apontaram concentrações equimoleculares dos

monossacarídeos, não havendo transferência de frutose, ou seja, apenas ocorreu a hidrólise da sacarose, e não sua polimerização. Assim, a continuidade desses testes foi descartada, já que nessas condições não houve a produção de FOS, aparentando ser uma característica inerente da enzima em questão.

Conforme pode ser observado no artigo apresentado, foram produzidas partículas de quitosana que oferecem grande área superficial para a imobilização de invertase. Um dos possíveis fatores da não uniformidade do suporte após ativação com glutaraldeído deve-se ao fato de que este, por ser bifuncional, pode formar duas bases de Schiff concomitantemente com duas unidades amino-2-deoxi- β -D-glicose pertencentes ou não a mesma cadeia polimérica de quitosana (MONTEIRO JÚNIOR e AIROLDI, 1999), conforme esboçado na Figura 8. Este fenômeno provoca a agregação indesejada das partículas, as quais quando analisadas via microscopia eletrônica de varredura apresentaram-se com diâmetros na escala de micrometro. Mesmo assim, com o intuito de evitar operações unitárias adicionais, e perda de material, não foram feitas separações das partículas por tamanho, aproveitando a totalidade do suporte produzido. A concentração de glutaraldeído (1,25 %) utilizada para a ativação da quitosana foi baseada no protocolo descrito por Biró *et al.*, (2008). Considerando o mecanismo de ação apontado, é pertinente testar diferentes concentrações deste ativador, no intuito de induzir a ativação impedindo que uma mesma molécula tenha suas duas funções aldeído formando ligações covalentes com os grupamentos aminados da quitosana, havendo uma espécie de ‘competição’ pelos sítios de ligação. Por outro lado vale ressaltar que um terceiro mecanismo envolvendo o agente bifuncional e a quitosana pode ocorrer: a polimerização das próprias moléculas de glutaraldeído (MONTEIRO JÚNIOR e AIROLDI, 1999), as quais poderiam atuar como um longo espaçador para a imobilização da enzima, o que pode refletir nos resultados, necessitando análise.

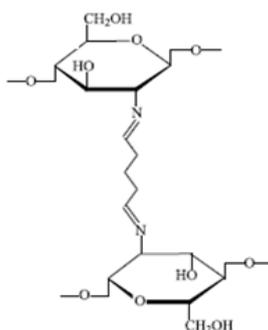


Figura 8: Estrutura da quitosana reticulada com glutaraldeído. Fonte: Adaptada de Mendes *et al.*, 2011.

No artigo anteriormente referido (inserido no item 3.1), também testou-se a influência da imobilização na presença de substrato (mantendo saturados os sítios ativos), objetivando evitar possíveis alterações conformacionais da enzima e gerar melhor eficiência após a imobilização. Porém, os resultados foram semelhantes aos obtidos sem a presença da sacarose, demonstrando que, nessas condições, a região catalítica estando ou não saturada, não influenciou os resultados. Assim, baseando-se no fato de que a imobilização de hidrolases via porção não protéica mantém inalterado o sítio ativo das enzimas e ainda pode aumentar a termoestabilidade, uma alternativa seria explorar a imobilização da invertase da mesma maneira, fazendo uso de agentes oxidantes que induziriam a ligação da enzima de modo não aleatório, ou seja, de modo orientado (TURKOVÁ, 1999).

Na tentativa de uma possível proteção do biocatalisador pós-imobilização na presença de substrato (conforme elucidado), visando maior $t_{(1/2)}$, foi realizado experimento semelhante ao esboçado no item ‘Thermal Stability’ descrito no artigo em questão. Brevemente, o suporte contendo a enzima imobilizada foi imerso em banho a 55 °C, sem agitação, com solução de sacarose adequada para a saturação dos sítios ativos enzimáticos. Ao longo do experimento foram coletadas amostras homogêneas, e em paralelo fez-se reposições da solução do dissacarídeo, para a manutenção da saturação devido à atividade hidrolítica da invertase. Os resultados foram superiores em relação à manutenção da atividade enzimática quando comparados ao experimento sem a presença de substrato. Porém, considerando que os *pellets* gerados na centrifugação das alíquotas não foram previamente lavados para a análise, provavelmente haja uma super estimativa da atividade invertásica. Isso porque além da concentração de sacarose ofertada para a medida usual, foram verificados, via quantificação de soluções de lavagem (sem adição de sacarose), a presença do dissacarídeo e dos monossacarídeos remanescentes. Deste modo, executadas as operações corretas, este teste é passível de repetição.

Em ‘Operational Stability’ é possível perceber uma oscilação no percentual da atividade enzimática medida no decorrer do experimento. Essas oscilações podem ser atribuídas em grande parte a não uniformidade das partículas de suporte, o que implica em diferentes quantidades enzimáticas já que as áreas superficiais contendo enzima imobilizada também são diferentes. Em relação ao desgaste mecânico apontado como uma das possíveis causas da queda na atividade da enzima imobilizada, a avaliação de outras concentrações de glutaraldeído utilizada na preparação das partículas de quitosana poderia promover maior rigidificação do suporte (*crosslinking* quitosana-quitosana). Assim, através de um suporte mais resistente mecanicamente o desgaste inerente ao longo do reusos seria minimizado,

auxiliando na manutenção da atividade enzimática. Por fim, vale ressaltar que apesar destes fatores, a queda na atividade residual da invertase iniciou após expressivo período de utilização (59 reusos), resultado bastante favorável.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo principal imobilizar a enzima β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase proveniente de *S. cerevisiae*, avaliando a atividade hidrolítica do biocatalisador. De modo geral os protocolos de imobilização executados envolveram ligações covalentes, consideradas as particularidades de cada matriz, inclusive com distintos métodos de ativação. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a grande área superficial oferecida por nano e agregados de nanopartículas de quitosana, sendo apontado rendimento médio de imobilização de 74 % e eficiência de 62 %. Parâmetros ótimos da invertase imobilizada, como pH e temperatura, bem como o tempo de meia vida na temperatura ótima (55 °C) e 65 °C, não diferiram dos indicados para a forma livre da enzima, o que se justifica já que a ligação covalente unipontual não promoveu alterações conformacionais na proteína, mimetizando o microambiente que ocorre quando não há a imobilização. A afinidade pelo substrato decaiu cerca de 3 vezes após a imobilização, mas a capacidade máxima de conversão da sacarose manteve-se constante. A imobilização permitiu o reuso do derivado por 59 ciclos com manutenção total da atividade hidrolítica da enzima, tendo sido o melhor resultado já descrito na literatura até então. Assim, foram alcançados diferentes requisitos para a imobilização enzimática com projeção de uso em grande escala: protocolos simples para a preparação do suporte e para a imobilização da enzima, a manutenção da atividade desta pós-imobilização, e a excelente estabilidade operacional.

Levando-se em consideração o crescente mercado de comercialização mundial de enzimas, o qual tem projeção de movimentações financeiras para 2013 para em torno de U\$ 7 bilhões de dólares (FREEDONIA, 2011), aliado a um mercado igualmente expressivo de manufatura de quitosana estimado em 100 bilhões de toneladas produzidas ao ano (TSIGOS *et al.*, 2000), a imobilização de invertase em suportes à base deste polímero é bastante pertinente, o que é reforçado pelos interessantes resultados obtidos neste trabalho.

Portanto, para atingir resultados ainda mais satisfatórios, as suposições explanadas na ‘Discussão Geral’ devem ser consideradas em novos planejamentos experimentais, lembrando que, ao contrário de outras enzimas, ainda não há exemplos de invertase imobilizada em quitosana aplicada industrialmente (MENDES *et al.*, 2011).

Por fim, como perspectivas futuras desse trabalho sugere-se:

- Testar o pH ótimo da imobilização da enzima em nanopartículas de quitosana, além de promover a imobilização via porção carboidrato da proteína, avaliando parâmetros como a estabilidade térmica e operacional;

- Considerar novos testes para a padronização do tamanho e mesmo maior rigidificação das partículas de quitosana;
- Avaliar a possibilidade de preparação de um suporte magnético, por exemplo, facilitando o processo de separação do derivado imobilizado do meio reacional em substituição à etapa de centrifugação;
- Estudar as melhores condições de preparação das macropartículas de quitosana, e comparar os resultados obtidos com os descritos para nanopartículas, além de considerar testes em um biorreator;
- Realizar novos experimentos para a imobilização da invertase em filmes de celulose e no suporte comercial Immobead;
- Buscar a enzima de outras fontes microbianas para a produção de FOS via invertase imobilizada, levando-se em consideração microrganismos pouco descritos ou inéditos;

REFERÊNCIAS

ANDJELKOVIC, U.; PICURIC, S.; VUJCIC, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms, **Food Chemistry**, v.120, p.799-804, 2010.

BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPÍRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J. M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield, **Metabolic Engineering**, v.13, p. 694-703, 2011.

BIRÓ, E.; NÉMETH, Á. S.; SISAK, C.; FECZKÓ, T.; GYENIS, J. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p.1240-1246, 2008.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation, **Biotechnology Letters**, v.31, p.1639-1650, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 26. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 maio 2009.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes. In: GUISÁN, J. M. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa: Humana Press, 2006. cap.2, p.15-30.

BRYJAK, J.; LIESIENE, J.; STEFUCA, V. Man-tailored cellulose-based carriers for invertase immobilization, **Cellulose**, v.15, p.631-640, 2008.

CADENA, P. G.; JERONIMO, R. A. S, MELO, J. M.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron, **Bioresource Technology**, v.101, p.1595-1602, 2010.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação da Quitina, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, n.4, p.169-173, 2001.

CAO, L. Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design. The Netherlands: Wiley, 2005b, pp.531.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art?, **Current Opinion in Chemical Biology**, v.9, p.217-226, 2005a.

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. **Química Nova**, v.32, n.1, p.175-187, 2009.

CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. ; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap.6, p.123-151.

CHIU, S. H.; CHUNG, T. W.; GIRIDHAR, R.; WU, W. T. Immobilization of β -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk, **Food Research International**, v.37, n.3, p.217-223, 2004.

COULTATE, T. P. Alimentos: a química de seus componentes. Porto Alegre: Artmed, 2004, pp. 15-38.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros, **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

DAVID, A. E.; WANG, N. S.; YANG, V. C.; YANG, A. J. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes, **Journal of Biotechnology**, v.125, p.395-407, 2006.

DSM FOOD SPECIALITIES. **MAXINVERT® L 10000 Batelada AG2379 Invertase for food processing**. The Netherlands, 2009. 5p. Boletim Técnico.

FANG, Y.; HUANG, X. J.; CHEN, P. C.; XU, Z. K. Polymer materials for enzyme immobilization and their applications in bioreactors, **BMB Reports**, v.44, p. 87-95, 2011.

FREEDONIA GROUP. 2009. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/brochure/25xx/2506smwe.pdf>>. Acesso em 18/01/2012.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance, **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.353, p.2885-2904, 2011.

GÓMEZ, L.; RAMÍREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation, **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.22-27, 2006b.

GÓMEZ, L.; RAMÍREZ, H. L.; VILLALONGA, R. Immobilization of Chitosan-Invertase Neoglycoconjugate on Carboxymethylcellulose-Modified Chitin, **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.36, p.259-271, 2006c.

GÓMEZ, L.; RAMÍREZ, H. L.; VILLALONGA, R. Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan, **Biotechnology Letters**, v.22, p.347-350, 2000a.

GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; SILVEIRA JÚNIOR, V. Reologia do açúcar líquido invertido: influência da temperatura na viscosidade, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.4, p.652-656, 2004.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review, **Czech Journal of Food Science**, v.26, n.1, p.1-14, 2008.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus* sp., **European Food Research Technology**, v.228, p.213-221, 2008.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance, **Enzyme and Microbial Technology**, v.48, p.107-122, 2011.

HSIEH, H. J.; LIU, P. C.; LIAO, W. J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability, **Biotechnology Letters**, v.22, p.1459-1464, 2000.

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

KOVALENKO, G. A.; PERMINOVA, L. V.; CHUENKO, T. V.; RUDINA, N. A. Adsorptive immobilization of enzymatic active substances on alumina-silica foam coated by carbon nanofibres, **Carbon**, v. 47, p. 420-427, 2009.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126-139, 2004.

LAMMENS, W.; LE ROY, K.; SCHROEVEN, L. ; VAN LAERE, A. ; RABIJINS, A. ; VAN DEN ENDE, W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications, **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.3, p.727-740, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451-1463, 2007.

MAZZUCA, S.; GIORNO, L.; SPADAFORA, A.; MAZZEI, L.; DRIOLI, E. Immunolocalization of β -glucosidase immobilized within polysulphone capillary membrane and evaluation of its activity *in situ*, **Journal of Membrane Science**, v.285, p.152-158, 2006.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial, **Química Nova**, v.34, n.5, p.831-840, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MONTEIRO JÚNIOR, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.119-128, 1999.

NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Purification and Properties of Yeast Invertase, **Biochemistry**, v.6, n.2, p.468-475, 1967

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; BHAT, M. K.; HOSCHKE, A. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386, **Process Biochemistry**, v.40, p.2461-2466, 2005.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. 2009. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/26.html>>. Acesso em 21/07/2010.

NOOKARAJU, A.; UPADHYAYA, C. P.; PANDEY, S. K.; YOUNG, K. E.; HONG, S. J.; PARK, S. K.; PARK, S. W. Molecular approaches for enhancing sweetness in fruits and vegetables, **Scientia Horticulturae**, v.127, p.1-15, 2010.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUISÁN, J. M.; MILLÁN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability, **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1160-1166, 2007.

PLOU, F. J.; de SEGURA, A. G.; BALLESTEROS, A. Application of Glycosidases and Transglycosidases in the Synthesis of Oligosaccharides. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. The Netherlands: Springer, 2007. cap.9, p.141-160.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans, **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.37-51, 1999.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p.1289-1307, 2007.

SIGMA ALDRICH **IMMOBEAD 150 94129**. Disponível em:

< <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail>>. Acesso em 18/01/2012.

SISO, M. I. G.; LANG, E.; CARRENÑO-GÓMEZ, B.; BECERRA, M.; ESPINAR, F. O.; MÉNDEZ, J. B. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads, **Process Biochemistry**, Great Britain, v.32, n.3, p.211-216, 1997.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor, **Journal of Food Engineering**, v.80, p.662-667, 2007.

TSIGOS, I.; MARTINO, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology, **Tibtech**, v.18, p.305-312, 2000.

TSUJIMURA, S.; NISHINA, A.; KAMITAKA, Y.; KANO, K. Coulometric D-Fructose Biosensor Based on Direct Electron Transfer Using D-Fructose Dehydrogenase, **Analytical Chemistry**, v.81, p.9383-9387, 2009.

TURKOVÁ, J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function, **Journal of Chromatography B**, v.722, p.11-31, 1999.

WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. Influence of the Carbohydrate Moiety on the Stability of Glycoproteins, **Biochemistry**, v.35, n.23, p.7299-7307, 1996.

YANG, Z.; PAN, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.19-28, 2005.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.19, p.107-117, 1996.

ZHAO, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids – a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.85, p.891-907, 2010.

ANEXO

As especificações do boletim técnico a seguir são semelhantes às da batelada 409200451, utilizada neste trabalho.

MAXINVERT® L 10000 (20 kg drum) as per batch AG2379

Product Information

Product description	Enzyme preparation for food use containing invertase derived from a selected strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Product number	622
Country of origin	France
Application market	Fruit processing: Sucrose inversion; prevents crystallisation & preserves the softness of fillings of sweets & marzipan applications
Appearance	liquid (appearance may vary from batch to batch)
Standardised activity	≥ 10000 SU/ml
Activity standardised	≤ 0.03 BDGLU/g
Status	<ul style="list-style-type: none"> • Identity preserved (non GMO strain and raw materials) • Kosher approved • Halal approved • Suitable for organic production • Preservative free • Food intolerance info available on request

Regulatory information

The product complies with general specifications for food enzyme preparations as published by JECFA, FCC and in French "Arrêté auxiliaires technologiques du 19 octobre 2006" and with FDA current GMP standards (21 CFR 110).

Composition

Carrier	glycerol ≥ 55.0 %
---------	-------------------

Chemical properties

pH	5.0 - 6.0
Heavy metals	< 30 ppm (as Pb)
Lead	< 5 ppm
Arsenic	< 3 ppm
Cadmium	< 0.5 ppm
Mercury	< 0.5 ppm

Microbiological properties

Total viable count	< 10 ⁴ CFU per g	with DSM method
Coliforms	< 30 CFU per g	
<i>Escherichia coli</i>	absent in 25 g	
<i>Salmonella</i>	absent in 25 g	
<i>Staphylococcus aureus</i>	absent in 1 g	
Sulphate reducers	< 30 CFU per g	
Anti bacterial activity	absent by test	
Mycotoxins	absent by test	
Yeasts	< 10 per g	
Moulds	< 10 per g	

Nutrient data

typical % Content is based on calculated values from ingredients/additives

Ash (Minerals)	0.1 %
Carbohydrates	47.3 %
Energy (kcal) per 100 g	193 kcal
Energy (kJ) per 100 g	818 kJ
Fat (Vegetable)	0.1 %
Protein	0.6 %
Trans fatty acids	0.0%

Stability data

- Recommended storage temperature 4 - 8°C
- When stored in recommended condition, the activity loss will be less than 5% within 36 months.

Packaging

20 kg plastic drum - 24 drums per pallet (120 * 80 * 90 cm)

Safety & handling

Please refer to the Material Safety Data Sheet available on request

Contact

DSM Food Specialties B.V.
www.dsm-foodspecialties.com

Head Office	USA	Asia	China	Latin America
Alexander Fleminglaan 1 P.O. Box 1 2600 MA Delft The Netherlands tel. +31 15 279 4001 fax. +31 15 279 4020	45 Waterview Blvd Parsippany, NJ 07054-1298 USA tel. +1 973 257 1063 fax +1 973 257 8248	152 Beach Road #13-07/08 Gateway East Singapore 189721 Singapore tel. +65 6393 6128 fax. +65 6295 6650	11f, The Headquarters Building No 168 Middle Xi Zang Road Shanghai 20001 China tel. +86 21 6141 8188 fax +86 21 6141 7008	Av. Eng. Billings 1729 - Prédio 9 05321 - 900 Jaguaré São Paulo SP Brasil tel. +55 11 3719 8237 fax +55 11 3719 4985
info.food@dsm.com				

Although diligent care has been used to ensure that the information provided herein is accurate, nothing contained herein can be construed to imply any representation or warranty as to the accuracy, currency or completeness of this information. The content of this document is subject to change without further notice. This document is non-controlled and will not be automatically replaced when changed. Please contact us for the latest version of this document or further information.

DSM Food Specialties B.V. | A. Fleminglaan 1 | 2613 AX Delft | The Netherlands | Trade Register Number 27235314

REF No. 7/14/2009