UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente

Mariana de Oliveira Faber

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD*

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Outubro de 2011

ISOMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE A FRUTOSE EM BIORREATOR DE LEITO FIXO ALIMENTADO CONTINUAMENTE

Mariana de Oliveira Faber

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em ciências (*MSc*).

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Outubro de 2011

ISOMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE A FRUTOSE EM BIORREATOR DE LEITO FIXO ALIMENTADO CONTINUAMENTE

Mariana de Oliveira Faber

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em ciências (*MSc*).

Aprovada por:

_____

Nei Pereira Jr., *PhD*
(Orientador)

_____

Adriana Ururahy Soriano, *DSc*

_____

Judith Liliana Solórzano Lemos, *DSc*

_____

Prof[a]. Eliana Mossé Alhadeff, *DSc*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Outubro de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

FABER, Mariana de Oliveira.

Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente / Mariana de Oliveira Faber. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

xv, 73 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Nei Pereira Jr., *Ph.D.*

1. isomerização Enzimática. 2. Glicose Isomerase. 3. Leito Fixo. 4. Enzima Imobilizada. 5. Frutose 6. Polímero Verde. 7. Dissertação. I. Pereira Júnior, Nei. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. III. Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Leito Fixo Alimentado Continuamente

Aos meus pais,

Alexandre de Carvalho Faber

& Márcia V. de Oliveira Faber

e às minhas irmãs

Carolina de Oliveira Faber

& Júlia de Oliveira Faber.

“O homem planeja, Deus ri.”

Provérbio iídiche

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças, escutar minhas preces e estar sempre do meu lado nesta caminhada.

Agradeço ao Prof. Nei Pereira Jr. pela orientação, pela oportunidade e pelo conhecimento oferecidos. Por ser uma inspiração e por acreditar na Biotecnologia, instituindo esta área de ciência e tecnologia com afinco, no Brasil.

À minha família, que é minha base, que me fez o sou e me ajudou a chegar até aqui. Ao meu pai, Alexandre, por todo esforço desempenhado, desde meus primeiro anos de escola, para eu tivesse a melhor educação possível. À minha mãe, Márcia, por seu amor incondicional, por suas orações, por seu apoio e amizade. Às minhas irmãs queridas, Carolina e Júlia, pela amizade, pelo companheirismo, pela preocupação, pelo amor de irmãs, pela presença insubstituível em todos os momentos.

Ao meu amor, Rafael, que segurou muitas “barras”, momentos de insegurança e que foi, acima de tudo, um grande amigo, um companheiro essencial, com a palavra certa na hora certa.

Aos amigos, colegas e conhecidos que torceram por mim e continuam torcendo pelo meu sucesso. À todos aqueles que me apoiaram em minhas escolhas e estiveram sempre ao meu lado.

À toda a equipe LADEBIO e principalmente Mariana Mello e Ludmylla Bastos, pela amizade; Gabriel Betancur e Roberto Maeda, pelo apoio em todas as horas, sem o qual seria mais difícil concluir esta pesquisa; Luiz André pela ajuda na pesquisa de mercado; Liliana, Mayara e Mariana Freitas, pelo ótimo trabalho em equipe; Luizão, Vanessa, Sabrina, Patrícia, Daniele Silveira, Élcio, Carol “sorgo”, Felipe, Paulo e Camylle, pela presença e pela preocupação.

Àquela que foi uma grande amiga, presente nas horas boas e ruins, sempre com conselhos, experiências e apoio incondicional: Verônica Ferreira.

Aos professores da Escola de Química, que contribuíram para o meu crescimento intelectual. À Braskem, pelo incentivo financeiro.

Sumário

I Apresentação do Tema **1**

II Justificativa & Objetivos **5**

II.1 Justificativa 6

II.2 Objetivo geral 7

II.3 Objetivos Específicos 7

III Revisão Bibliográfica **8**

III.1 O Desenvolvimento Sustentável e Os Princípios da Química Verde 9

III.1.1 O Desenvolvimento Sustentável 9

III.1.2 Os Princípios da Química Verde 10

III.2 Enzimas 13

III.2.1 Estabilidade enzimática 14

III.2.2 Enzimas Imobilizadas 16

III.2.3 Reatores com Enzimas Imobilizadas 18

III.3 glicose isomerase 20

III.3.1 Microrganismos Produtores de Glicose Isomerase 22

III.4 isomerização química versus isomerização enzimática 27

III.5 glicose 29

III.6 frutose 30

III.6.1 Aspectos do Mercado Brasileiro de Frutose 36

III.7 Considerações Gerais 37

IV Materiais & Métodos **38**

IV.1 Enzima 39

IV.2 Biorreator 39

IV.3 Fontes iônicas 41

IV.4 Caracterização da enzima comercial Glicose isomerase de Streptomyces murinus 41

IV.5 Seleção dos parâmetros importantes para a isomerização enzimática de glicose a frutose 42

IV.6 Determinação das condições apropriadas para a isomerização enzimática de glicose a frutose 43

IV.7 Verificação da imprescindibilidade dos íons Mg2+, Mn2+ e Co2+ para a enzima glicose isomerase de Streptomyces murinus, na isomerização de glicose a frutose 44

IV.8 Determinação do tempo de residência para a isomerização enzimática em biorreator 45

IV.9 Determinação da estabilidade e do tempo de meia vida da enzima glicose isomerase de Streptomyces murinus 47

IV.10 Avaliação da influência da concentração inicial de substrato (glicose) na conversão a frutose 47

IV.11 Quantificações de Glicose e Frutose 48

V. Resultados e Discussão **50**

V.1 Determinação da massa molar da enzima comercial Glicose isomerase de Streptomyces murinus 51

V.2 Seleção dos parâmetros importantes para a isomerização enzimática de glicose a frutose 52

V.3 Determinação das condições apropriadas para a isomerização enzimática de glicose a frutose 55

V.4 Verificação da imprescindibilidade dos íons Mg2+, Mn2+ e Co2+ para a enzima glicose isomerase de Streptomyces murinus, na isomerização de glicose a frutose 58

V.5 Determinação do tempo de residência para a isomerização enzimática em biorreator 60

V.6 Determinação da estabilidade e do tempo de meia vida da enzima glicose isomerase de Streptomyces murinus 62

V.7 Avaliação da influência da concentração inicial de substrato (glicose) na conversão a frutose 64

V.8 Considerações Gerais 70

VI Conclusões & Sugestões 71

Referências 74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reação catalisada por glicose isomerase *in vivo* 20

Figura 2. Reação catalisada por glicose isomerase *in vitro* 20

Figura 3. Estrutura tridimensional de glicose isomerase de *Streptomyces murinus* 22

Figura 4. Ciclização de glicose em anéis piranosídicos 29

Figura 5. Alguns produtos obtidos a partir de glicose 30

Figura 6. Estruturas (a) acíclica e (b) cíclica da frutose 31

Figura 7. Formação de furanose a partir de D-frutose 31

Figura 8. Formas tautoméricas da frutose 32

Figura 9. Síntese de Produtos Furânicos a partir de Frutose 34

Figura 10. Exportação Brasileira de Frutose no triênio 2008/2009/2010. 36

Figura 11. Esquema representativo (a) e imagem real (b) do processo de isomerização de glicose a frutose em biorreator de bancada. 40

Figura 12. Cromatograma típico da quantificação de glicose e frutose. 49

Figura 13. Imagem gerada pelo software Gel-Pro Analyser 4.0, com a determinação da massa molecular da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*. 51

Figura 14. Diagrama de Pareto do planejamento P&B para a conversão de glicose a frutose por glicose isomerase. 53

Figura 15. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado para a conversão de glicose a frutose por glicose isomerase. 57

Figura 16. Conversão de glicose a frutose após 8h de isomerização enzimática em reator de bancada, para diferentes tempos de residência. Temperatura= 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; Concentração inicial de glicose= 35g.L^{-1}; Concentração de metabissulfito de sódio= 0,06g.L^{-1}; Concentração de íon magnésio= 0,197g.L^{-1}; carga enzimática: 350U.g^{-1}. 60

Figura 17. Perfil de conversão de glicose a frutose em processo enzimático contínuo, para tempos de residência de 2 h. Temperatura= 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; Concentração inicial de glicose= 35g.L^{-1}; Concentração de metabissulfito de sódio= 0,06g.L^{-1}; Concentração de íon magnésio= 0,197g.L^{-1}; carga enzimática: 350U.g^{-1}. 62

Figura 18. Perfil de isomerização em processo contínuo ao longo de 35 dias. Temperatura= 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; tempo de residência= 2h; alimentação contínua de meio composto por 35g.l^{-1} de glicose, 60 ppm de metabissulfito de sódio e 0,8 mM de $MgSO_4.7H_2O$; carga enzimática: 350U.g^{-1}. 63

Figura 19. Diagrama de Pareto para a variável de resposta Concentração Final de Frutose. S_0: concentração inicial de glicose; t_R: tempo de residência. Planejamento 1 66

Figura 20. Diagrama de Pareto para a variável de resposta Concentração Final de Frutose. S_0: concentração inicial de glicose; t_R: tempo de residência. Planejamento 2 67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens das enzimas imobilizadas frente às enzimas livres. 17

Tabela 2. Processos industriais que utilizam enzima imobilizada 18

Tabela 3. Microrganismos produtores de Glicose Isomerase. 23

Tabela 4. Produção de glicose isomerase por diferentes microrganismos. 24

Tabela 5. Microrganismos produtores de glicose isomerase e seus respectivos fatores de conversão de massa celular em produto. 25

Tabela 6. Microrganismos produtores de glicose isomerase permitidos pela ANVISA à produção de enzimas destinadas ao consumo humano. 26

Tabela 7. Tabela comparativa entre processos de isomerização química e enzimática 28

Tabela 8. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o planejamento segundo a metodologia Plackett & Burman. S_o: concentração inicial de glicose 43

Tabela 9. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o planejamento fatorial fracionado. S_0: concentração inicial de glicose. 44

Tabela 10. Experimentos realizados para investigar a imprescindibilidade dos íons para a isomerização enzimática 45

Tabela 11. Tempos de residência e vazões empregadas em cada ensaio 46

Tabela 12. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o primeiro planejamento fatorial 2^2 48

Tabela 13. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o segundo planejamento fatorial 2^2 48

Tabela 14. Condições e conversões de cada ensaio do planejamento P&B 16. 54

Tabela 15. Condições e conversões de cada ensaio do planejamento fatorial fracionado. 56

Tabela 16. Condições e conversões de cada ensaio do planejamento fatorial 2^3. 59

Tabela 17. Condições e respostas de cada ensaio do primeiro planejamento fatorial 2^2. 65

Tabela 18. Condições e respostas de cada ensaio do segundo planejamento fatorial 2^2. 66

Tabela 19. Tabela comparativa entre os resultados da literatura e os obtidos

nesta pesquisa. 69

ISOMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE A FRUTOSE EM BIORREATOR DE LEITO FIXO ALIMENTADO CONTINUAMENTE

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em ciências (*MSc*).

Mariana de Oliveira Faber

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD*

A frutose é um açúcar vastamente utilizado na indústria de alimentos. Atualmente, suas principais aplicações fora do contexto alimentar correspondem à produção de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e ácido levulínico. Os derivados do HMF são intermediários de elevado potencial, os quais possuem síntese adaptável para larga escala. O HMF também possui grande potencial como intermediário a um monômero para polímero verde, o ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA). A produção de FDCA a partir da frutose é uma alternativa interessante, pois este ácido representa um potencial substituto do ácido tereftálico, obtido por processo petroquímico, na síntese do polietileno tereftalato (PET). Existem diversas formas de se obter frutose, neste trabalho optou-se por produzir este açúcar através da isomerização enzimática da glicose, em biorreator de leito fixo, alimentado continuamente e recheado com glicose isomerase imobilizada comercial, produzida por *Streptomyces murinus*. São muitos os fatores que influenciam a reação de isomerização enzimática, o parâmetro mais importante foi a temperatura e embora a literatura aponte os íons Mg^{2+}, Co^{2+} e Mn^{2+} como ativadores da enzima glicose isomerase, neste trabalho a presença destes íons não foi tão relevante para a obtenção de conversões acima de 50%. Nos experimentos realizados em biorreator de leito fixo alimentado continuamente, foi possível conduzir a reação enzimática por 21 dias, com a estabilidade do leito mantida. Obteve-se, ainda, 315 $g.l^{-1}$ de frutose a partir de 600$g.l^{-1}$ de glicose, ou seja, uma conversão de 52,6%. Fato este que representa a grande contribuição deste trabalho na busca pela obtenção de um polímero de fonte renovável (plástico verde), substituto ao polietileno tereftalato (PET).

Glucose to fructose enzymatic isomerization in continuously fed fixed bed bioreactor

Abstract of the dissertation submitted to TPQB/EQ/UFRJ as a requisite for obtaining the degree of Master of Science (*M.Sc*)

Mariana de Oliveira Faber

Supervisor: Nei Pereira Jr., Ph.D.

Fructose is a largely used sugar in food industry. Recently, its main applications outside this scope are the productions of 5-hydroximethilfurfural (HMF) and levulinic acid. HMF derivatives are intermediates with high potential, which have large scale adaptable synthesis. HMF also has great potential as a monomer intermediate for the production of green polymer from the monomeric unit 2,5-Furandicarboxylic acid (FDCA). The FDCA production using fructose is an interesting alternative, since this organic acid shows high potential to substitute the terephtalic acid, obtained in petrochemical processes, in the polyethilene terephtalate (PET). There are many ways to obtain fructose and in this work the glucose enzymatic isomerization in continuously fed fixed bed bioreactor was persued, filled with commercial immobilized glucose isomerase produced by *Streptomyces murinus*. Many factors influence the enzymatic isomerization reaction and the most important parameter was temperature. Although literature points the ions Mg^{2+}, Co^{2+} and Mn^{2+} as glucose isomerase activators, in this work they were not relevant for achieving conversions above 50%. In the experiments carried out in continuously fed fixed bed bioreactor, it was possible reaching fructose concentrations of $315 g.L^{-1}$ from glucose concentrations of $600 g.L^{-1}$, resulting in a conversion of 52.6%. This work incorporates a great contribution in the search for a renewable source polymer (green plastic), which may substitute polyethilene terephtalate (PET), having as building block the furanosic sugar fructose.

I Apresentação do Tema

Neste capítulo será contextualizado brevemente o tema da presente dissertação, bem como as justificativas para estudá-lo.

É crescente a busca por materiais “verdes”, matérias-primas renováveis e produtos biodegradáveis, seja devido à escassez das fontes não renováveis ou devido à preocupação com o meio ambiente. Tanto os produtores quanto os consumidores têm se preocupado cada vez mais com as questões ambientais e, como consequência, observa-se o aumento da produção e do consumo de produtos ambientalmente amigáveis.

Neste cenário, o primeiro polietileno verde certificado no mundo foi produzido no Brasil, pela Braskem, em sua unidade industrial de Triunfo/RS. Diversas empresas se interessaram e aplicaram este plástico em embalagens, produtos e sacolas, como a Natura, a Estrela® e a Shiseido, entre outras (Braskem, 2011).

O polietileno verde produzido pela Braskem não é biodegradável, contudo possui características de processo desejáveis, como utilização de matéria-prima renovável (cana-de-açúcar) e captação de CO_2 com consequente diminuição dos gases do efeito estufa, além de ser 100% reciclável.

Ainda no universo dos polímeros verdes, o polipropileno já é produzido em escala laboratorial e o polietileno tereftalato (PET), produzido atualmente por matéria-prima petroquímica, pode ser produzido a partir de frutose.

A frutose é um açúcar de grande interesse industrial, suas aplicações se estendem desde a indústria de xarope de glicose (para produção de produtos dietéticos) até produção de energia elétrica (célula combustível), passando pela produção de 5-hidroximetilfurfural (HMF).

O HMF possui grande potencial como intermediário para diversos produtos químicos, inclusive o ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA), possível substituto “verde” para o ácido tereftálico (unidade monomérica do PET).

O Brasil ainda não está entre os grandes produtores de frutose. Segundo o Radar Comercial (site de análises de mercados e produtos, do governo brasileiro), em 2010, o Brasil exportou cerca de 20 toneladas referentes à Frutose, no estado sólido, e xarope de frutose contendo, em peso, no estado seco, mais de 50% de frutose; e cerca de 70 toneladas referentes à Frutose quimicamente pura, no estado sólido.

A Frutose é considerada um açúcar de elevado custo e diversas formas de produção têm sido estudadas com a finalidade de viabilizar seu emprego como matéria-prima para outros produtos químicos.

A produção de frutose a partir da isomerização enzimática de glicose é interessante do ponto de vista ambiental, visto que consiste em uma reação bem específica que gera pouco ou nenhum resíduo, porém sua viabilização depende da produção de frutose para cada unidade de massa de enzima aplicada ao processo. O grande entrave da isomerização enzimática está no caráter reversível da reação de isomerização de glicose a frutose, a qual é limitada pelo equilíbrio químico, não permitindo conversões maiores que 55%.

Neste sentido a presente dissertação buscou alcançar maiores valores de produção de frutose através da aplicação da enzima glicose isomerase imobilizada em um biorreator de leito fixo, alimentado continuamente. O trabalho encontra-se estruturado da seguinte forma: inicia-se com uma breve apresentação sobre os princípios da Química Verde e sobre enzimas, com foco em enzimas imobilizadas e reatores enzimáticos; também estão apresentadas características relevantes do substrato e do produto envolvidos na isomerização enzimática. Em seguida, estão apresentados os objetivos geral e específicos. Na seção intitulada Materiais & Métodos estão descritas as metodologias experimentais e analíticas utilizadas para a realização desta pesquisa. Na sequencia, estão apresentados os resultados obtidos experimentalmente e as discussões relevantes referentes aos mesmos. Finalmente, chega-se às conclusões, onde é destacada a contribuição da autora à pesquisa. Também neste capítulo são apresentadas sugestões para o prosseguimento desta pesquisa e o desenvolvimento de trabalhos futuros.

O desenvolvimento desta dissertação de mestrado possibilitou ao grupo LADEBIO EQ/UFRJ a seguinte produção bibliográfica:

Resumo internacional

LEMOS, J. L. S.; **FABER, M. O.**; WASHINGTON, M. P. L.; SANTOS, T. E.; PEREIRA JR., N. Enzymatic isomerization of glucose to fructose for production of 5-hydroxymethylfurfural. In: 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2011, Seattle, WA.

Trabalhos Completos Nacionais

FABER, M. O.; LEMOS, J. L. S.; COIMBRA, R.; PEREIRA JR., N. Isomerização Enzimática de Glicose a Frutose em Biorreator de Bancada Alimentado Continuamente. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul, RS. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

WASHINGTON, M. P. L.; SANTOS, T. E.; **FABER, M. O**.; LEMOS, J. L. S.; COIMBRA, R.; PEREIRA JR., N. Isomerização de Glicose a Frutose Empregando Glicose Isomerase de *Streptomyces murinus*. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul, RS. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

II Justificativa & Objetivos

Este capítulo apresenta os objetivos específicos que foram cumpridos para que se alcançasse o objetivo geral, que consiste em isomerizar enzimaticamente glicose a frutose.

II.1 Justificativa

A crescente demanda pela substituição de polímeros de origem petroquímica por polímeros "verdes", leva à busca por novas matérias-primas, renováveis, para produzi-los. Neste cenário, tem-se como exemplo, o emprego de frutose como matéria-prima na produção de ácido 2-5, furanodicarboxílico (FDCA), monômero para a produção de um plástico verde substituto ao polietileno tereftalato (PET).

A frutose, açúcar presente em frutas, cereais, vegetais e mel, é obtida, principalmente, pela isomerização de glicose; seja esta isomerização através de uma reação enzimática catalisada pela enzima glicose isomerase, seja através de isomerização química catalisada por resinas, zeólitas ou hidrocalcitas.

Na isomerização química, a conversão é geralmente menor que 40%. Esta reação ocorre sob alta temperatura e possui especificidade reduzida, visto que outros açúcares são produzidos (manose, por exemplo). Além disso, problemas ambientais e de segurança podem ocorrer devido às características químicas e às severas condições impostas para a realização do processo.

Desta forma, a isomerização enzimática possui vantagens frente à isomerização química, tais como: condições de operação mais brandas, maior conversão de glicose a frutose e especificidade da reação. A enzima glicose isomerase, catalisador da reação de isomerização enzimática, pode ser encontrada tanto na forma livre quanto na forma imobilizada, de modo que as vantagens de se utilizar a enzima imobilizada são inúmeras, podendo-se citar: reaproveitamento do catalisador, possibilidade de condução contínua do processo e estabilidade.

O grupo de pesquisa dos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos, da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tem se destacado na utilização de matérias-primas renováveis visando a obtenção de bioprodutos, como o etanol de segunda geração, o etanol de terceira geração e os ácidos orgânicos. Aplicando esta experiência e o comprometimento com a questão ambiental, este grupo vem investindo na obtenção de frutose pela via enzimática, para o emprego desta como matéria-prima na produção de plástico verde.

II.2 Objetivo Geral

O objetivo desta dissertação de mestrado foi promover a isomerização enzimática de glicose a frutose, em biorreator de bancada com leito fixo e alimentado continuamente.

II.3 Objetivos Específicos

- Caracterizar a enzima comercial glicose isomerase de *Streptomyces murinus*.
- Selecionar os parâmetros estatisticamente importantes para a isomerização enzimática de glicose a frutose;
- Determinar as condições apropriadas para a isomerização enzimática;
- Verificar a imprescindibilidade dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Co^{2+} para a enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, na isomerização de glicose a frutose;
- Determinar o tempo de residência para a isomerização enzimática em biorreator;
- Determinar a estabilidade e o tempo de meia vida da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus;*
- Avaliar a influência da concentração inicial de substrato (glicose) na conversão a frutose, em reator de leito fixo sob regime de alimentação contínua.

III Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão apresentadas as bases desta pesquisa: uma breve teoria sobre enzimas, com foco sobre a enzima de interesse (glicose isomerase) seguida por uma comparação entre a isomerização química e a enzimática. Finalizando, serão apresentadas as características importantes do substrato e do produto estudados.

III.1 O Desenvolvimento Sustentável e os Princípios da Química Verde

A necessidade de preservação do meio ambiente, com práticas menos agressivas, redução dos resíduos e utilização de matérias-primas de fontes renováveis, vem sendo discutida no mundo todo há décadas. A primeira conferência mundial realizada a fim de se discutir os problemas ambientais foi realizada em Estocolmo, Suécia, em 1972, pela Organização das Nações Unidas (ONU). Nesta conferência discutiram-se problemas ambientais como a chuva ácida e o controle da poluição do ar (DIAS, 1992). Em 1989 entrou em vigor o Protocolo de Montreal, que previa metas de redução da produção de gases CFC (clorofluorocarbono), halons e brometo de metila, cuja presença na atmosfera é considerada a principal causa do estreitamento da camada de ozônio. Em 1992, foi realizada a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, no Rio de Janeiro (ECO-92) com a participação de 179 chefes de Estado. Nesta reunião foi elaborado um documento chamado Agenda 21, onde os países se comprometiam em adotar práticas em prol do desenvolvimento sustentável (SILVA *et al*, 2005).

Mais recentemente, em 2002, aconteceu o encontro da Cúpula Mundial sobre o Desenvolvimento Sustentável, em Joanesburgo, África do Sul. Nesta cúpula, foram examinados os progressos obtidos nos dez anos que se seguiram à Rio-92 e foram estabelecidos meios mais eficazes de implementação da Agenda 21 (UNITED NATIONS: JOHANNESBURG SUMMIT 2002).

III.1.1 O Desenvolvimento Sustentável

Desenvolvimento Sustentável é aquele que atende às necessidades do presente, sem comprometer a habilidade das gerações futuras de atender às suas próprias necessidades.

O conceito de Desenvolvimento Sustentável não se baseia apenas no crescimento ou na produção, mas na melhoria de padrões para a economia, a sociedade e também para

o meio ambiente. No princípio, as empresas preocupavam-se com a segurança do trabalhador e das comunidades ao redor de suas fábricas, posteriormente a preocupação com a poluição aumentou levando à preocupação quanto à toxicidade e agressividade ambiental dos produtos finais. Finalmente, as empresas iniciaram a chamada "gestão de sustentabilidade", onde a gestão de saúde, meio ambiente e segurança deram lugar ao foco em padrões sustentáveis de produção e consumo, que engloba tanto o caráter ambiental quanto o social e o econômico (CAMPOS, 2010).

Nos últimos anos, inúmeros artigos, livros e conferências têm focado sobre redução dos impactos negativos das atividades humanas no planeta. Muitas vezes, a partir dessas discussões, objetivos específicos têm surgido, como a minimização de resíduos, o aumento da reciclagem, e a prática da sustentabilidade. Neste sentido, a Química Verde se concentra em alcançar a sustentabilidade através da ciência e da tecnologia, através de doze princípios básicos.

III.1.2 Os Princípios da Química Verde

O movimento relacionado com o desenvolvimento da Química Verde começou no início dos anos 1990, principalmente nos Estados Unidos, Inglaterra e Itália, com a introdução de novos conceitos e valores para as diversas atividades fundamentais da química, bem como, para os diversos setores da atividade industrial e econômica correlatos. Esta proposta logo se ampliou para envolver a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) no estabelecimento de diretrizes para o desenvolvimento da Química Verde em nível mundial (Química Verde no Brasil 2010 – 2030, 2010).

Química Verde, Química Ambiental ou Química para o Desenvolvimento Sustentável é um campo emergente que tem como objetivo final conduzir as ações científicas e/ou processos industriais ambientalmente amigáveis. A Química Verde baseia-se no desenvolvimento de produtos e processos químicos que reduzam ou eliminem o uso e/ou

geração de substâncias perigosas. Química Verde se aplica em todo o ciclo de vida de um produto químico, desde sua concepção, fabricação até seu uso. Neste sentido, foram definidos 12 princípios para o estabelecimento da Química Verde no mundo. São estes (EPA, 2011; ANASTAS & ZIMMERMAN, 2003; LENARDÃO *et al.*, 2003):

1. Prevenção. Evitar a produção do resíduo é melhor do que remediá-lo após sua geração.

2. Economia de Átomos. Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida, no produto final.

3. Síntese de Produtos Menos Perigosos. Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.

4. Desenho de Produtos Seguros. Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.

5. Solventes e Auxiliares mais Seguros. O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.

6. Busca pela Eficiência de Energia. A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.

Em geral, o suprimento de energia para estas necessidades vem da queima de combustível fóssil, não renovável.

7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima. Sempre que técnica e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não-renováveis.

8. Evitar a Formação de Derivados. A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e

químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.

9. Catálise. Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.

10. Desenho para a Degradação. Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.

11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição. Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.

12. Processo e Reagentes Intrinsecamente Seguros para a Prevenção de Acidentes. As substâncias e as condições dos processos químicos, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Estima-se que, em 2020, haverá uma participação da Química Verde de, pelo menos, 10% no conjunto da oferta de produtos petroquímicos (que poderá alcançar, no caso específico das resinas termoplásticas, 240 milhões de toneladas). O Brasil poderá deter, se forem viabilizados os investimentos necessários, uma fatia relevante da oferta total. Existem, ademais, inúmeros produtos químicos que podem ser produzidos (e alguns já o são) a partir de fontes renováveis, como biocombustíveis, ácidos orgânicos e bioplásticos (ABIQUIM, 2010).

Dentro do contexto de Desenvolvimento Sustentável, os processos enzimáticos podem ser inseridos nos princípios #1, #2, #3, #4, #7, #8, #9, #10 e #12 da Química Verde, visto que enzimas são biocatalisadores seguros, de alta especificidade, que possibilitam condições brandas de operação, reduzindo a demanda energética do processo, são seguros, de baixa ou nenhuma toxicidade e vastamente aplicados na utilização de fontes renováveis de matérias-primas. Desta forma, a inserção de uma planta industrial nos princípios da

Química Verde pode ser realizada através da substituição de processos químicos por processos enzimáticos, sempre que possível.

Segundo estudo da McKinsey (BACHMANN, 2003), os produtos baseados em processos fermentativos e enzimáticos devem crescer na faixa de 8% ao ano nos próximos cinco anos. Crescimentos expressivos, acima de 10% ao ano, são também projetados para os bioplásticos.

III.2 Enzimas

São diversos os processos biotecnológicos que fazem uso de enzimas, pois enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e, sendo proteínas, são 100% biodegradáveis, o que as torna ambientalmente interessantes. Assim, possibilitam que as indústrias utilizem processos mais econômicos e menos poluentes, além de serem altamente eficientes. Atualmente, as enzimas podem substituir muitos produtos químicos nocivos ou até perigosos e permitem uma produção segura e ambientalmente correta, decorrente de "tecnologia limpa" (Novozymes, 2010).

A versatilidade das enzimas como catalisadores é ressaltada pelo fato de existirem reações enzimáticas equivalentes a várias reações químicas clássicas (LEHMKUL, 2006). O uso de enzimas para fins tecnológicos consiste em fazer destes catalisadores biológicos, catalisadores de processo, capazes de transformar matérias-primas em produtos com valor agregado. Tendo em vista a labilidade das enzimas, como conseqüência de sua estrutura protéica, esta etapa representa um desafio tecnológico, o que de alguma forma explica o número relativamente reduzido de processos enzimáticos operados em escala industrial (COELHO, SALGADO & RIBEIRO, 2008).

As vantagens das enzimas na produção industrial são evidentes. Principalmente, porque criam soluções efetiva e ambientalmente mais favoráveis que outras formas de produção. Atualmente, as enzimas substituem, com frequência, os agentes químicos e

contribuem para reduzir a quantidade de água, matéria prima e energia de processos industriais (Novozymes, 2010).

Hoje em dia, as enzimas produzidas industrialmente são usadas na produção de detergentes, bebidas alcoólicas destiladas, ração animal, panificação, cerveja, gordura e óleos, combustíveis (álcool), couro, papel, xarope, têxteis, vinho e suco (Novozymes, 2010). Também são usadas amplamente em reativos analíticos e encontram várias aplicações na área médica.

Frente às variadas alternativas de biotransformação, os processos enzimáticos oferecem vantagens, entretanto, estas vantagens devem se destacar frente ao custo de obtenção da enzima.

III.2.1 Estabilidade enzimática

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica. Além de sua parte protéica, a molécula enzimática pode estar interligada a outras macromoléculas, por ligações covalentes (carboidratos) e não-covalentes (ácidos nucléicos, lipídios). Para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a presença de moléculas de baixa massa molecular e de natureza não protéica (co-fatores), que podem ser íons ou moléculas orgânicas (coenzimas) (SANT'ANNA JR, 2001).

A atividade das enzimas depende da conformação enzimática ideal, diretamente relacionada às estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, envolvidas no "enovelamento" da enzima.

Estrutura primária: É dada pela seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. São específicas para cada proteína, sendo determinados geneticamente (SANT'ANNA Jr, 2001). A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de aminoácidos, com uma extremidade "amino terminal" e uma extremidade "carboxi terminal" (STRYER, 2004).

Estrutura secundária: Estrutura resultante da interação entre os resíduos de aminoácidos adjacentes, por meio de ligações hidrogênio. Ocorre devido à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos α dos aminoácidos e seus grupamentos amina e carboxila (STRYER, 2004).

Estrutura terciária: Enquanto a estrutura secundária é determinada pelo relacionamento estrutural de curta distância, a terciária é caracterizada pelas interações de longa distância entre aminoácidos. A estrutura terciária é resultante da interação entre os resíduos de aminoácidos da estrutura secundária por meio de ligações hidrogênio, interações iônicas e forças hidrofóbicas, podendo a cadeia polipeptídica na proteína ser arranjada como uma mistura de várias estruturas em diferentes partes da cadeia de aminoácidos, levando a uma estrutura compacta e retorcida (COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008). Sua estrutura configurará o sítio catalítico ativo da enzima, que tem sua preservação essencial para a funcionalidade biológica (SANT'ANNA Jr, 2001).

Estrutura quaternária: Representa a interação de cadeias polipeptídicas e subunidades distintas, que frequentemente possuem seus próprios sítios catalíticos. Presente em enzimas complexas, como as do sistema regulatório de seres humanos (COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008).

O centro ativo, ou sítio catalítico, é uma pequena porção da enzima, composta por um restrito número de resíduos de aminoácidos próximos na estrutura tridimensional (mesmo que distantes na estrutura primária). É uma estrutura complexa cuja configuração permite localizar a molécula de substrato na posição correta à reação, sendo assim responsável pela atividade catalítica da enzima. Devido à grande importância do sítio catalítico para a enzima e para o sucesso da reação, a configuração deste deve ser mantida na sua forma ótima (COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008).

A propriedade essencial de uma enzima é sua capacidade catalítica, mas a estabilidade e a especificidade são propriedades muito importantes, de grande interesse e que, assim como a atividade catalítica, são determinadas por sua estrutura protéica.

A atividade de uma enzima depende da manutenção de uma configuração particular, denominada estrutura nativa. A configuração nativa de uma enzima é resultante

de muitas forças de interação, como as descritas anteriormente. As mudanças ambientais, inclusive as mais suaves, podem enfraquecer estas interações, alterando a estrutura tridimensional nativa e provocando a perda total ou parcial de sua funcionalidade biológica.

Entende-se por desnaturação qualquer processo que altere a estrutura tridimensional nativa da enzima. De um modo geral, esta alteração encontra-se associada à perda de atividade. A alteração da estrutura quaternária é frequentemente reversível, por outro lado, a alteração da estrutura terciária é frequentemente irreversível e está associada à perda total ou parcial da atividade. A alteração da estrutura secundária também é irreversível, provocando um efeito de coagulação e inativação total da enzima (COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008).

Fatores ambientais como temperatura, pH e força iônica interferem diretamente sobre a atividade de enzimas (SANT'ANNA Jr, 2001). Adicionalmente, algumas enzimas são dependentes de íons específicos ou sensíveis a determinados agentes desnaturantes. A manutenção deste ambiente ótimo é essencial para a atividade enzimática desejada.

III.2.2 Enzimas imobilizadas

Desde a década de 1960, enzimas imobilizadas têm sido utilizadas em processos industriais. O uso de enzimas imobilizadas se faz nas mais diversas áreas, como química, bioquímica, farmacêutica e médica. Muitos avanços e melhorias de processo são atribuídos ao uso de enzimas imobilizadas (MOSBACH, 1980; KLIBANOV, 1983; RUBIO *et al*., 1996; TISCHER & WEDEKIND, 1999; LIANG *et al*., 2000). Na tabela 1 são apresentadas as vantagens e desvantagens da utilização de enzimas imobilizadas.

Entende-se por enzimas imobilizadas aquelas que se encontram confinadas ou localizadas, através de métodos químicos e/ou físicos, em uma região definida do espaço, e que podem ser utilizadas repetida ou continuamente (COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens das enzimas imobilizadas frente às enzimas livres.
Fonte: VITOLO, 2001a; COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008.

Vantagens	Desvantagens
Reaproveitamento do catalisador	**Custo adicional de suportes, reagentes e da operação de imobilização**
Aplicabilidade em processos contínuos	**Redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais**
Maior versatilidade na etapa de separação	**Possíveis exigências adicionais de purificação**
Estabilidade (a variações de pH e temperatura)	**Pouco adequadas a substratos insolúveis ou de alta massa molecular**
Reprodutibilidade analítica aumentada	**Inexistência de um método geral de imobilização**
Diversificação das aplicações de enzimas (ex. eletrodos enzimáticos, sensores enzimáticos)	**Aleatoriedade da interação suporte-enzima**

Apesar do grande volume de publicações acerca do tema “enzimas imobilizadas”, a aplicação desta tecnologia em escala industrial é restrita. A aplicação mais clássica, e de alto interesse econômico, de enzimas imobilizadas é na produção de xaropes de frutose através da glicose isomerase imobilizada. Outros processos industriais que fazem uso de enzimas imobilizadas, a maioria deles cujo produto é de alto valor agregado, estão presentes na tabela 2.

Os métodos mais clássicos de imobilização enzimática são: separação por membranas, entrelaçamento em polímeros, adsorção e formação de ligações covalentes.

Existe uma variedade de materiais inertes passíveis de utilização para a imobilização enzimática. A seleção do método de imobilização e do suporte a ser utilizado depende

basicamente das características da enzima e das condições em que a mesma será empregada (VITOLO, 2001a).

Tabela 2. Processos industriais que utilizam enzima imobilizada

Fonte: COELHO & SANTA BRIGIDA, 2008

Tipo de reação	Enzima imobilizada	Processo
Oxidação-Redução	L-amino ácido oxidase	**Produção de D-aminoácidos**
	B-tirosinase	**Produção de L-DOPA e L-tirosina**
	hidrogenase	**Produção de prednisolona**
	Flavoproteína oxidase	**oxidação de drogas contendo grupos amino ou hidrazina**
Hidrólise	Ribonuclease	**Síntese de trinucleotídeos**
	α-amilase	**Produção de glicose**
	Celulase	**Produção de glicose**
	Invertase	**Produção de açúcar**
Isomerização	**Glicose Isomerase**	**Produção de frutose**

III.2.3 Reatores com Enzimas Imobilizadas

Nos primeiros processos enzimáticos, quando se dispunha apenas de enzimas livres, o único tipo de reator utilizável era o de batelada. No entanto, com a tecnologia de imobilização de enzimas, tornou-se possível a utilização de outros tipos de reatores e, consequentemente, outras formas de condução de processos enzimáticos.

Os processos que utilizam enzimas imobilizadas podem ser conduzidos de forma contínua ou em batelada e os reatores utilizados podem ser de quatro tipos: reator de batelada, reator agitado contínuo, reator de leito fixo e reator de leito fluidizado. Nos dois primeiros casos, pode haver a necessidade de separação da enzima (por filtração, por exemplo) (VITOLO, 2001b). As escolhas do modo de condução e do tipo de reator utilizados dependem das características do processo e das características cinéticas. Por exemplo: em processos cujo meio reacional é viscoso ou que dependem de um rígido controle de pH o reator de tanque agitado é o mais indicado; suportes frágeis não devem ser utilizados em tanques agitados sob pena de rompimento dos mesmos, e em reatores de leito fixo não devem ser empregados suportes compressíveis ou muito pequenos (COELHO, SALGADO & RIBEIRO, 2008).

Processos em batelada são mais indicados para produção em pequena escala, por outro lado, processos contínuos são mais aplicáveis a maiores produções, por representarem ganho em produtividade e controle mais rígido (PEREIRA JR, BON & FERRARA, 2008).

Com o passar do tempo, diversas configurações de reatores foram desenvolvidas para diferentes formas de condução, pode-se citar os reatores batelada com leito fixo, reatores contínuos com agitação, reatores com membranas, reatores com reciclo e reatores tubulares com paredes enzimaticamente ativas, todos aplicados ao processo de isomerização enzimática. Após 30 anos de experiência, as indústrias apontam os reatores de leito fixo como os mais apropriados para a isomerização enzimática (KALILPOUR & ROOSTAAZAD, 2008).

Um dos principais objetivos do reator de leito fixo é promover o contato íntimo entre as fases envolvidas no processo. A utilização deste tipo de reator permite o emprego de enzima de modo contínuo, sem necessidade de uma etapa de recuperação do catalisador, e melhor controle da temperatura. Pode-se destacar também, que o emprego de um sistema impactado em enzima permite o emprego de maiores concentrações de substrato e pode reduzir o tempo de reação.

III.3 Glicose Isomerase

Segundo Sant'Anna Jr. (2001), isomerases são enzimas que catalisam reações de mudança intramolecular em que um substrato é transformado em um produto isômero.

A enzima glicose isomerase (ou xilose isomerase, se considerarmos sua função *in vivo*) é uma enzima intramolecular de origem microbiana, que catalisa as conversões de xilose a xilulose, *in vivo* (figura 1), e de glicose em frutose, *in vitro* (figura 2).

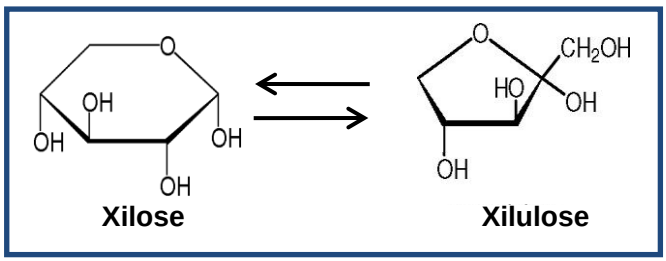

Figura 1. Reação catalisada por glicose isomerase *in vivo*

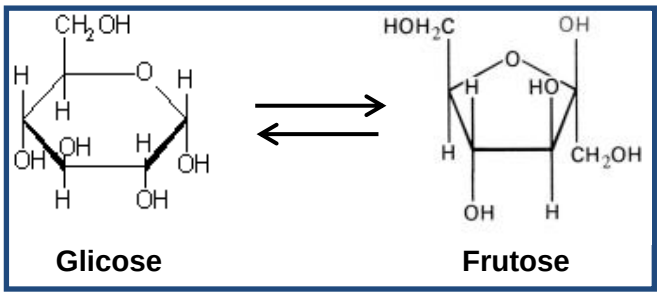

Figura 2. Reação catalisada por glicose isomerase *in vitro*

Esta enzima possui massa molecular entre 52 e 191 kDa. Para sua atividade máxima, podem ser requeridos íons divalentes, como Mg^{2+} e Co^{2+}. Enquanto Mg^{2+} atua como ativador e estabilizador, Co^{2+} atua como estabilizador, principalmente sobre a estrutura quaternária da enzima. Glicose isomerase pode ser inibida por íons cobre, zinco, níquel, mercúrio e prata, além de xilitol, arabinol, manito e sorbitol (BHOSALE et al, 1996; VITOLO, 2001b).

Um dímero, a partir do tetrâmero, é encontrado por unidade assimétrica de glicose isomerase de *Streptomyces murinus*. O sítio ativo da xilose isomerase apresenta dois íons metálicos ligados e duas moléculas de água por monômero, com um total de sete cadeias de aminoácidos. Esses resíduos são conservados em todas as glicose-isomerases conhecidas (Rasmussen *et al.,* 1994; Lavie *et al.,* 1994). Os monômeros são formados por cadeias polipeptídicas de aproximadamente 370 a 470 aminoácidos.

Uma representação da estrutura tridimensional de glicose isomerase de *Streptomyces murinus* está apresentada na figura 3.

A primeira forma de glicose isomerase foi produzida em 1974, a partir de *Pseudomonas hydrophila* (KALILPOUR & ROOSTAAZAD, 2008; HARTLEY et al., 2000). Um grande salto no consumo de xarope de alta frutose se deu em 1978, com o enriquecimento de teor de frutose através de técnicas cromatográficas. Em 1988 a produção de xarope de alta frutose (HFCS) superou a marca de 7 milhões de toneladas (VITOLO, 2001b).

Atualmente, a isomerização enzimática de glicose a frutose é executada em escala industrial no mundo inteiro, devido à sua aplicação na produção de xarope de alta frutose, porém a condução desta reação em biorreator de leito fixo alimentado continuamente pode oferecer vantagens em relação aos métodos clássicos de isomerização, como aumento da concentração inicial de glicose, que permite a maior produção de frutose (em concentração); e redução do tempo de reação, por se tratar de um sistema impactado.

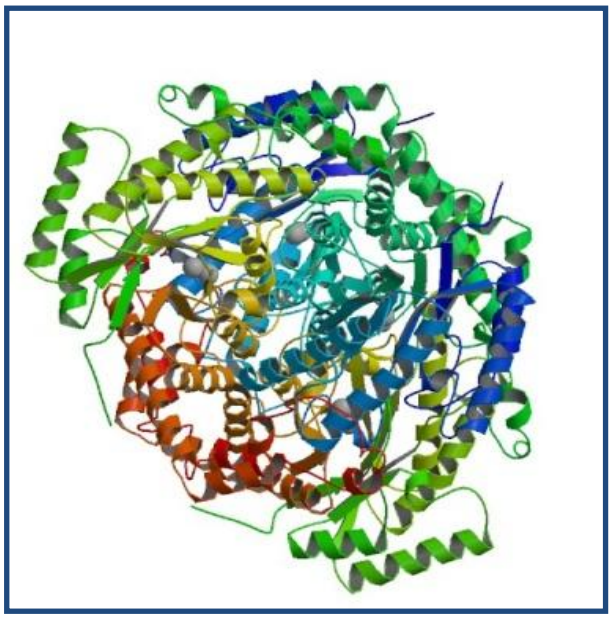

Figura 3. Estrutura tridimensional de glicose isomerase de *Streptomyces murinus*
Fonte: Rasmussen et al. (1994)

III.3.1 Microrganismos Produtores de Glicose Isomerase

Diversos microrganismos são apontados como produtores de glicose isomerase, principalmente os seguintes: *Streptomyces spp., Bacillus spp., Acetobacter cloacae, Lactobacillus brevis* e *Escherichia coli* (Vongsuvanlert e Tani, 1988). Na tabela 3 estão apresentados os principais microrganismos produtores de glicose isomerase.

Os produtores mais comuns de glicose isomerase são dos gêneros *Streptomyces spp.* e *Actinoplanes spp.* (HARTLEY et al., 2000). Na tabela 4 estão presentes informações sobre a produção da enzima glicose isomerase, por diferentes microrganismos.

Tabela 3 Microrganismos produtores de Glicose Isomerase.

Espécies
Actinomyces olivocinereus, *A. phaeochromogenes*
Actinoplanes missouriensis
Aerobacter aerogenes, *A. cloacae*, *A. levanicum*
Arthrobacter spp.
Bacillus stearothermophilus, *B. megabacterium*, *B. coagulans*
Bifidobacterium spp.
Brevibacterium incertum, *B. pentosoaminoacidicum*
Chainia spp.
Corynebacterium spp.
Cortobacterium helvolum
Escherichia freundii, *E. intermedia*, *E. coli*
Flavobacterium arborescens, *F. devorans*
Lactobacillus brevis, *L. buchneri*, *L. fermenti*, *L. mannitopoeus*, *L. gayonii*, *L. fermenti*, *L. plantarum*, *L. lycopersici, L. pentosus*
Leuconostoc mesenteroides
Microbispora rosea
Microellobosporia flavea
Micromonospora coerula
Mycobacterium spp.
Nocardia asteroides, *N. corallia*, *N. dassonvillei*
Paracolobacterium aerogenoides
Pseudonocardia spp.
Pseudomonas hydrophila
Sarcina spp.
Staphylococcus bibila, *S. flavovirens*, *S. echinatus*
Streptococcus achromogenes, *S. phaeochromogenes*, *S. fracliae*, *S. roseochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. californicos*, *S. venuceus*, *S. virginial*
Streptomyces olivochromogenes, *S. venezaelie*, *S. wedmorensis*, *S. griseolus*, *S. glaucescens*, *S. bikiniensis*, *S. rubiginosus*, *S. achinatus*, *S. cinnamonensis*, *S. fradiae*, *S. albus*, *S. griseus*, *S. hivens*, *S. matensis*, *S. nivens*, *S. platensis*
Streptosporangium album, *S. oulgare*
Thermopolyspora spp.
Thermus spp.
Xanthomonas spp.
Zymomonas mobilis

Fonte: Bohsale *et al*., 1996.

Tabela 4. Produção de glicose isomerase por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Rendimento (U/l)	Temperatura (^{o}C)	pH
Actinoplanes missouriensis	2.500 – 35.200	75	7,0
Bacillus licheniformis	10.500	70	NE
Streptomyces wedmorensis	560 – 2500	70	7,2
Streptomyces olivochromogenes	4.800 – 11.440	60	7,5

*NE: não especificado

LOBANOK *et al.* (1998) investigaram 74 linhagens de bactérias e actinomicetos, das quais linhagens dos gêneros *Arthrobacter* e *Streptomyces* expressaram atividade glicose isomerásica com maior atividade catalítica. A tabela 5 apresenta os principais produtores de glicose isomerase e os respectivos fatores de conversão massa celular em produto avaliados por LOBANOK *et al*. (1998).

Apesar de diversos gêneros de bactérias, fungos e actinomicetos produzirem esta enzima, muitas vezes a glicose isomerase possui características indesejáveis, como instabilidade a pH ácido e a altas temperaturas e produção intracelular (BHOSALE *et al*., 1996; LOBANOK *et al*., 1998). Comercialmente, a Novozymes® produz uma glicose isomerase produzida por actinomiceto, mais especificamente *Streptomyces murinus*.

As enzimas glicose isomerases de actinomicetos, como *Streptomyces murinus*, possuem propriedades catalíticas e físico-químicas diferentes das de outros microrganismos, como termoestabilidade e valores de pH ótimos mais elevados que as dos outros microrganismos (Vangrysperre *et al*., 1990).

Tabela 5. Microrganismos produtores de glicose isomerase e seus respectivos fatores de conversão de massa celular em produto.

Microrganismo	$Y_{P/X}$ (U/mg cels.)
Arthrobacter sp.	**0,008**
Streptomyces viridobrunneus	**0,005**
Streptomyces sp. 1	**0,005**
Streptomyces sp. 2	**0,002**
Streptomyces sp.11	**0,003**
Streptomyces sp. 12	**0,003**
Streptomyces sp. 13	**0,003**
Streptomyces sp. 20	**0,003**
Streptomyces sp. 23	**0,002**
Streptomyces sp. 27	**0,003**
Streptomyces sp. 28	**0,001**
Streptomyces sp. 30	**0,002**
Streptomyces sp. 32	**0,005**
Streptomyces sp. 34	**0,001**

Fonte: Adaptado de Lobanok *et al*. (1998)

Alguns gêneros de *Streptomyces sp.* são de grande interesse para a produção de glicose isomerase, visto que produzem esta enzima extracelularmente. É atribuída à glicose isomerase de *Streptomyces sp.* a capacidade de alterar a permeabilidade da parede celular destes, facilitando a expressão extracelular da enzima (BHOSALE *et al*., 1996). A maior parte da glicose isomerase disponível no mercado é obtida a partir de microrganismos mesófilos, incluindo *Streptomyces, Actinoplanes* e *Flavobacterium*. Essas enzimas são geralmente termoestáveis e são utilizadas sob a forma imobilizada para melhorar a meia vida das mesmas.

No início da produção de glicose isomerase era necessária a adição de xilose ao meio de crescimento para estimular a sua produção, incrementada na presença de arseniato. Mais tarde, foi encontrada em *Escherichia intermedia* (Natake e Yoshimura, 1964)

a atividade de isomerase, independente do uso de xilose. A enzima era uma glicose isomerase (CE 5.3.1.9), capaz de isomerizar o açúcar não fosforilado na presença de arseniato. Por outro lado, uma glicose isomerase que catalisava a isomerização de glicose e de manose em frutose, foi isolada de *Paracolobacterium aerogenoides* (Takasaki e Tanabe, 1964; Takasaki e Tanabe, 1966). Ainda, glicose isomerase produzida por bactérias heteroláticas requeria xilose como indutor e era instável em temperaturas elevadas. Dentre as isomerases acima comentadas, xilose isomerase, produzida por *E. intermedia*, era a mais adequada para aplicações comerciais, pois era estável ao calor e dispensava o uso de coenzimas como NAD^+ e de moléculas como ATP (Bhosale *et al*., 1996).

Dentre os microrganismos produtores de glicose isomerase existem algumas estirpes patogênicas. Tendo em vista a vasta aplicação desta enzima para fins alimentícios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou uma relação dos microrganismos que podem ser aplicados à produção de glicose isomerases destinadas ao consumo humano (tabela 6).

Tabela 6. Microrganismos produtores de glicose isomerase permitidos pela ANVISA à produção de enzimas destinadas ao consumo humano.

Microrganismo
Actinoplanes missourienses
Bacillus coagulans
Klebsiella aerogenes
Microbacterium arborensens
***Streptomyces olivochromogenes* (ou *S. diastaticus*)**
Streptomyces murinus
***Streptomyces rubiginosus* (ou *S. rochei*)**
***Streptomyces violaceoniger* (ou *S. hygroscopicus*)**

Fonte: www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B13128-1-0%5D.PDF.

III.4 Isomerização Química *versus* Isomerização Enzimática

A isomerização de glicose a frutose pode ser realizada tanto química quanto enzimaticamente.

No caso da isomerização química, esta reação ocorre a elevadas temperaturas e não é específica, levando à formação de outros açúcares e de cor; sendo assim, a concentração de frutose é geralmente menor que 40%; outro fator importante é que a frutose produzida por isomerização química tem o sabor e o teor dulcificante reduzidos (BHOSALE et al., 1996).

Na isomerização química, frequentemente são utilizadas bases fracas para converter glicose a frutose, porém manose também é formada neste processo. Esta reação de isomerização em meio alcalino tem sido operada em sistemas homogêneos, porém esse tipo de processo apresenta problemas com relação à operação, segurança e meio ambiente, o que fomenta a busca por catálises heterogêneas onde faz-se uso de resinas, zeólitas, hidrocalcitas ou outros catalisadores para promover o aumento da conversão e/ou seletividade (VALENTE et al. 2008; MOREAU et al., 2000). Desta forma, o custo do processo aumenta significativamente, representando um entrave econômico.

Por outro lado, a isomerização enzimática apresenta vantagens como condições mais brandas de reação; especificidade, com conseqüência de não geração de subprodutos e reutilização do catalisador (VITOLO, 2001a). Um inconveniente da isomerização enzimática é o caráter reversível da reação, gerando limitação na formação de frutose, devido ao equilíbrio químico (ZHANG et al., 2004), de modo que a conversão de glicose a frutose fica limitada a aproximadamente 50%.

Para que se alcance elevados teores de frutose necessita-se de uma etapa de separação/purificação. Geralmente utiliza-se a cromatografia industrial para enriquecer esta mistura equimolar de glicose e frutose, aumentando seu teor de frutose (VITOLO, 2001b). A tabela 7, a seguir, mostra um comparativo de processos químicos e enzimáticos para isomerização de glicose a frutose, com suas conversões e condições experimentais.

Tabela 7. Tabela comparativa entre processos de isomerização química e enzimática

Tipo de Isomerização	Catalisador	Condução do Processo	Condições Experimentais	Volume Reacional	So	Conversão Glicose a Frutose	Observações	Referência
Química	Zeólitas	Batelada	95°C; 8 bar; 700 rpm	0,1 L	50g/L (glicose)	7% - 42%	alta seletividade em frutose (60% - 86%)	MOREAU *et al.*, 2000
Química	Silicatos	Batelada	100°C; 600 rpm	1 mL	50g/L (glicose)	27% - 56%	alta seletividade em frutose (62% - 84%)	VALENTE *et al.*, 2008
Enzimática	Glicose isomerase	Contínuo	60°C; pH 7,5	5,4 mL	100g/L (glicose)	45%	adição de Co^{2+} e Mg^{2+}; reator leito fixo	KALIPOUR & ROOSTAAZAD (2008)
Enzimática	Glicose isomerase	Batelada	70°C; pH 7,5; 150 rpm; 480 W (microondas)	100 mL	144g/L (glicose)	45%	assistido por microondas	YU *et al.* (2011)

III.5 Glicose

A glicose é um açúcar de seis carbonos, que possui fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e fórmulas estruturais tanto cíclica quanto acíclica. Em solução, a tendência das formas acíclicas da glicose é ciclizar, formando anéis piranosídicos.

O aldeído em C-1, na forma em cadeia aberta, reage com a hidroxila em C-5, formando m hemiacetal intramolecular, também referenciado como anel piranose. Desta reação podem resultar duas formas anômeras designadas α-D-glicopiranose e β-D-glicopiranose, esta última é a mais comum em solução (firgura 4) (STRYER *et al*., 2004).

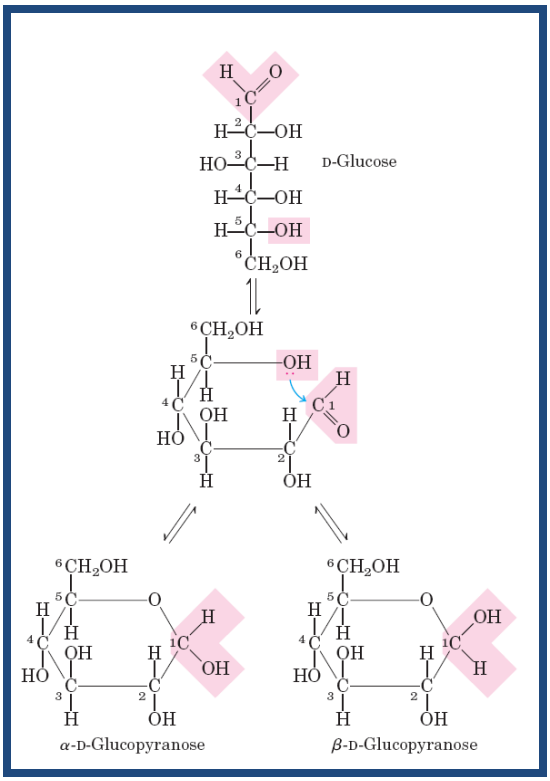

Figura 4. Ciclização de glicose em anéis piranosídicos
Fonte: Stryer et al. (2004)

A glicose é vastamente encontrada na natureza, pois é o principal constituinte da celulose, da sacarose e do amido (PEREIRA JR. *et al*., 2008). Na indústria, a glicose pode ser aplicada para os mais variados fins, que vão desde a clássica fermentação alcoólica até a

produção de biopolímeros. Podem ser produzidos produtos finais ou intermediários químicos, a partir da glicose, como pode-se observar na figura 5.

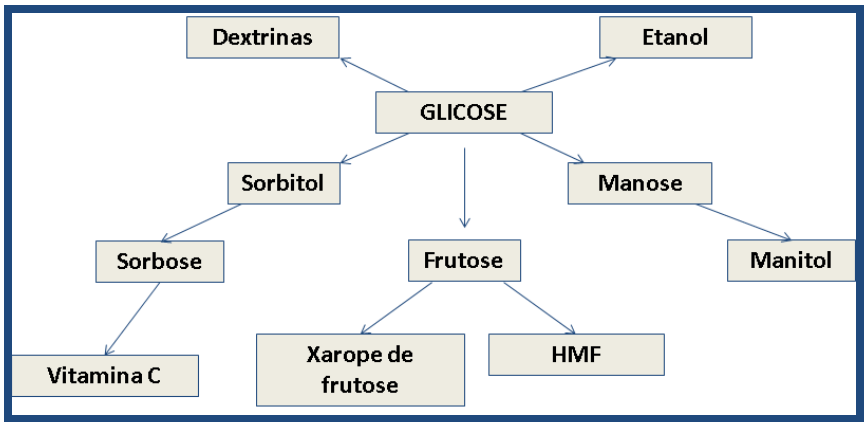

Figura 5. Alguns produtos obtidos a partir de glicose

A glicose oferece a possibilidade de transformação em substâncias acíclicas, furanosídicas ou piranosídicas. Esta característica é o que torna a glicose tão atrativa industrialmente. A partir destes produtos, uma gama de outros produtos pode ser obtida, através de reações simples como oxidação, redução, glicosilação e isomerização (ROPER & KOCH, 1988). Por exemplo, a partir da reação de isomerização, frutose pode ser obtida, e a partir de frutose pose-se produzir HMF (intermediário de grande interesse industrial).

III.6 Frutose

A Frutose é um monossacarídeo de seis carbonos, isômero da glicose, que pode ser encontrado em frutas, cereais, vegetais, mel e cana-de-açúcar. Quando pura é branca, higroscópica e cristalina; na forma sólida é bastante solúvel em água e pouco solúvel na maioria dos alcoóis (SILVA, 2010).

Assim como a glicose, possui fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e fórmulas estruturais acíclica e cíclica (Figura 6). Sua estrutura cíclica apresenta-se como um anel furanosídico.

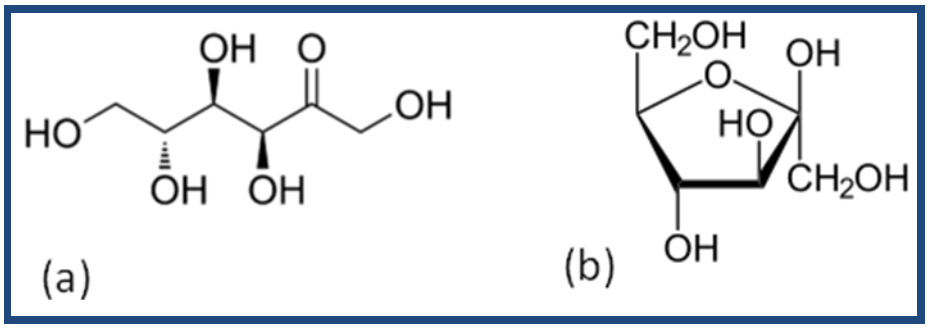

Figura 6. Estruturas (a) acíclica e (b) cíclica da frutose

Por possuir seis carbonos e um grupamento cetona como grupo característico, a frutose é classificada como cetohexose. A cetona em C-2 na forma aberta de uma ceto-hexose, como a frutose, reage: com a hidroxila em C-6, formando um hemiacetal intramolecular hexagonal; ou com a hidroxila em C-5, formando um hemiacetal cíclico de cinco membros (figura 7) (STRYER *et al.*, 2004).

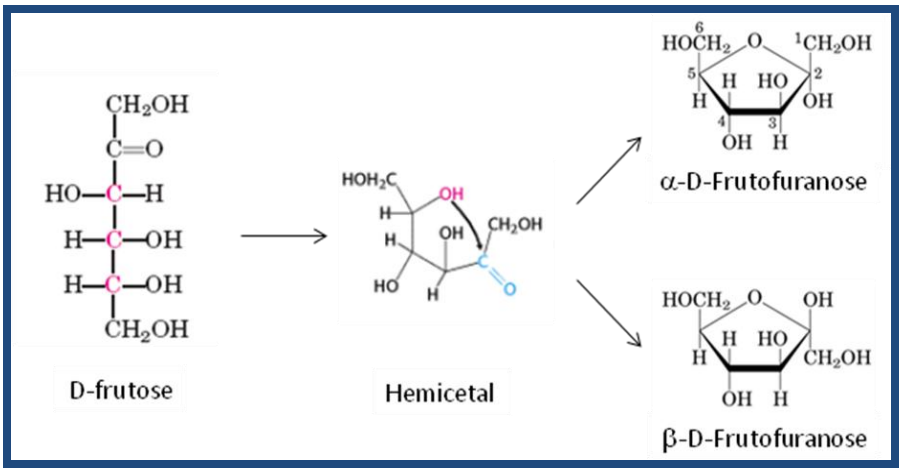

Figura 7. Formação de furanose a partir de D-frutose
Fonte: adaptado de STRYER *et al.* (2004)

Uma solução aquosa de D-frutose consiste em uma mistura de quarto tautômeros cíclicos (Figura 8) onde a forma β-D-frutopiranose é a mais comum, α-D-frutofuranose e β-D-frutofuranose estão presentes em quantidades importantes, enquanto a forma α-D-frutopiranose encontra-se em pequenas quantidades, assim como sua forma aberta (FLOOD *et al.,* 1996).

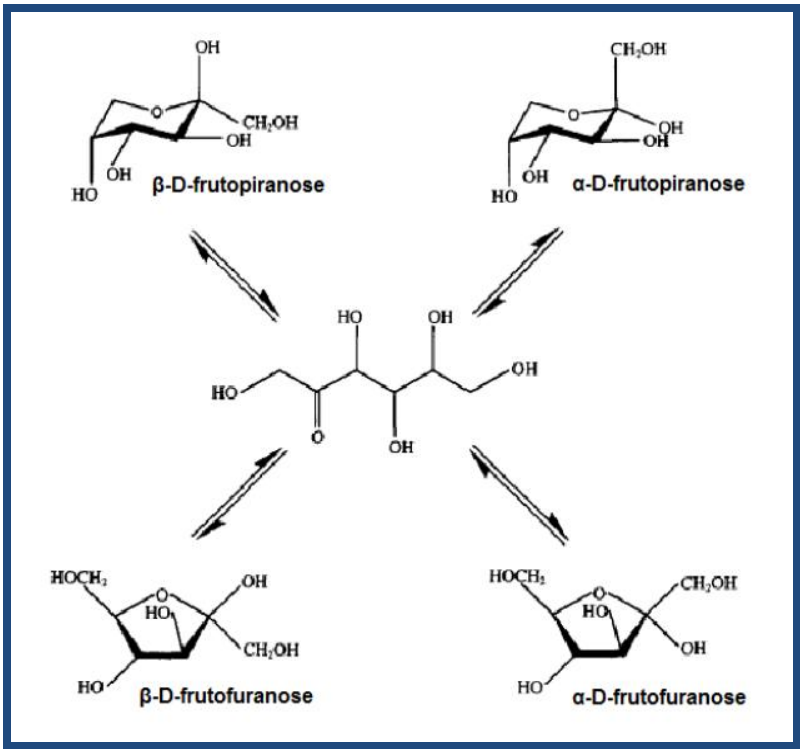

Figura 8. Formas tautoméricas da frutose
Fonte: FLOOD *et al.,* 1996

A frutose é um açúcar de grande interesse industrial e que pode ser aplicado em diversos processos e produtos, principalmente nas indústrias de alimentos e de bebidas. Por ser saudável, existe uma diversidade de alimentos que fazem uso das características desse açúcar, tornando estes produtos com teores calóricos menores, com o mesmo poder dulcificante. No entanto, a ingestão de frutose deve ser feita com parcimônia, principalmente em se tratando de produtos industrializados, visto que este açúcar é precursor de lipídeos.

Sendo utilizado especialmente em produtos dietéticos, apresenta-se cerca de 1,3 a 1,8 vezes mais doce que os outros açúcares, dependendo de sua forma tautomérica em solução. Além disso, não requer o uso de insulina em seu processo metabólico, como a glicose, possibilitando seu uso em produtos destinados aos diabéticos (SILVA, 2010).

A frutose tem sido incorporada com sucesso a formulações no preparo de frutas enlatadas, geléias, doces em pasta, bolos, pudins, tabletes, pó para bebidas, refrigerantes, bebidas espumantes, vinhos, alimentos assados, condimentos, *ketchup*, salsichas, produtos de laticínios (sorvetes, chocolate ao leite, iogurte), conservas, picles, tabacos, etc (SILVA, 2010; FERREIRA *et al.,* 2009).

Um dos principais produtos obtidos a partir de frutose é o xarope de glicose e frutose, composto por 42 a 49% de frutose, devido a limitações de equilíbrio químico (ASIF & ABASEED, 1998). O mercado mundial de xaropes com alto teor de frutose (HFCS) gira em torno de 10 milhões de toneladas/ano em base seca (BUCHOLZ & SIBEL, 2008), sendo a maior parte dessa quantidade produzida a partir de amido, cuja hidrólise fornece glicose, seguida de isomerização de glicose em frutose. Segundo Buchholz & Seibel (2008), para produção do xarope de glicose-frutose são empregadas 1.500 toneladas de enzimas imobilizadas por ano.

Recentemente, verificou-se a possibilidade de produção de energia elétrica a partir de carboidratos, dentre eles a frutose, utilizando células combustíveis, apresentando-se como uma fonte de energia renovável a partir de biomassas e que futuramente pode se apresentar como uma boa alternativa à utilização de combustíveis fósseis, dentro do conceito de Química Verde (FERRERA *et al.*, 2009).

As principais aplicações da frutose fora do contexto alimentar correspondem à produção de hidroximetilfurfural (HMF) e ácido levulínico. Os derivados do HMF (Figura 9) são intermediários de elevado potencial industrial, os quais possuem síntese adaptável para larga escala. Destes, o ácido 5-hidroximetilfuróico, ácido 2,5-dicarboxílico, 1,6-diamina e o respectivo 1,6-diol são os intermediários mais versáteis e de elevado potencial industrial, uma vez que são monômeros de seis carbonos que podem substituir o ácido adípico, ou alquildióis, ou hexametilenodiamina na produção de poliamidas e poliésteres (FERREIRA *et*

al., 2009). O HMF também possui grande potencial como intermediário a um monômero para polímero verde, o ácido 2,5-furanodicarboxílico.

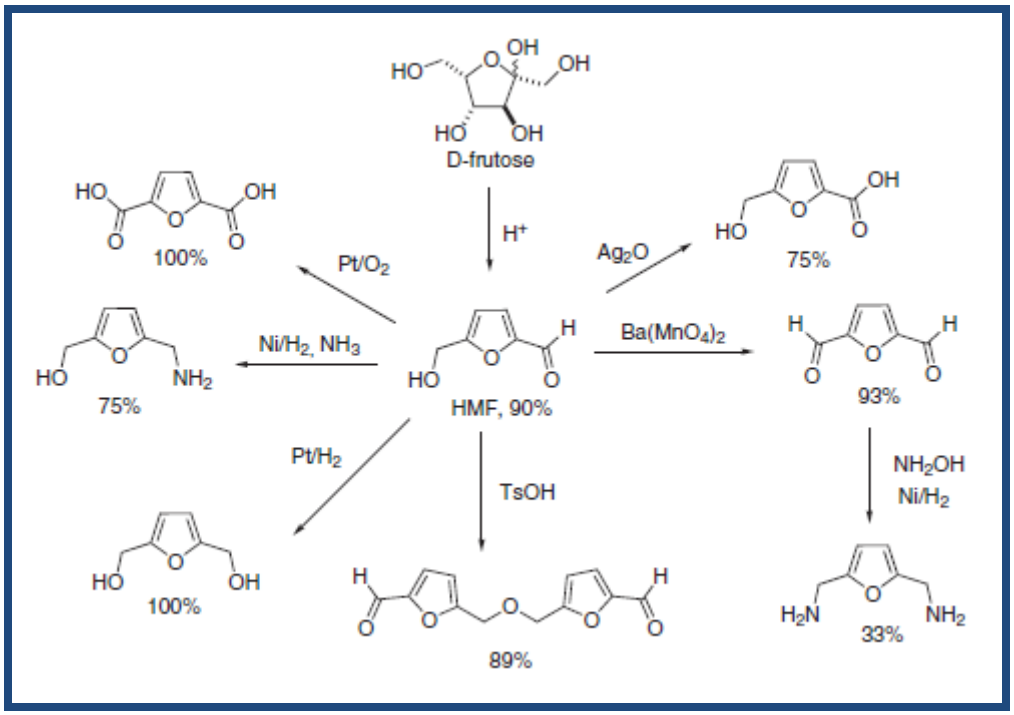

Figura 9. Síntese de Produtos Furânicos a partir de Frutose
Fonte: FERREIRA *et al.*, 2009

A produção de ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA- $C_6H_4O_5$) através da frutose é uma alternativa interessante, pois o FDCA pode ser um potencial substituto do ácido tereftálico, obtido a partir da cadeia de refino de petróleo, na síntese do polietileno tereftalato (PET), polímero altamente utilizado na manufatura de diferentes materiais. Além disso, o FDCA foi identificado pelo Departamento de Energia do EUA como um dos 12 produtos químicos prioritários para o estabelecimento da indústria Química Verde do futuro.

A obtenção de HMF por desidratação pode ser realizada partindo-se de glicose ou frutose, porém frutose é o açúcar mais interessante para este processo por apresentar maior seletividade a HMF, em relação à glicose. Román-Leshkov *et al*. (2007) mostraram que a seletividade de frutose a HMF pode ser cerca de duas vezes maior que a seletividade de glicose a HMF. Tanto frutose quanto HMF possuem anel furanosídico, porém glicose possui

anel piranosídico, desta forma entende-se que a estrutura do anel furanosídico pode facilitar a reação de desidratação de frutose a HMF.

Segundo dados encontrados na literatura, a oxidação do HMF ao FDCA se dá preferencialmente em meio aquoso na presença de um metal que pode ser platina, paládio, rutênio ou cobalto. Quando a reação ocorre *in situ* (primeiramente se faz a desidratação da frutose e depois a oxidação do HMF ao FDCA), deve-se adicionar um modificador de fase ao meio, que pode ser MIBK, DMF, benzeno, tolueno, 2-butanol ou DMSO para a extração do HMF da fase aquosa (CARLINI *et al*., 2005; RIBEIRO & SCHUCHARDT, 2003; KROGER *et al*., 2000).

Segundo LICHTENTHALER (2007), embora seja de grande utilidade, o HMF ainda não é produzido industrialmente uma vez que seu preço de mercado gira em torno de US$ 3.200 por tonelada, um valor bastante elevado quando comparado com matérias-primas de uso industrial derivadas do petróleo, como a nafta e etileno (US$ 190-500 por tonelada).

As principais formas de obtenção de frutose são isomerização – química ou enzimática – de glicose e hidrólise de inulina (polímero de frutose presente na raiz de vegetais, como a chicória).

A produção de frutose a partir de inulina é realizada a partir da hidrólise enzimática deste polímero de frutose, catalisada pela enzima inulinase. As vantagens deste método de obtenção de frutose são irreversibilidade da reação e rendimentos elevados (cerca de 95%), porém desvantagens como necessidade de extração da inulina a partir de sua fonte vegetal e competição da produção de frutose com a produção de vegetais com fins alimentícios podem ser apontadas (RICCA et al., 2010).

O método de obtenção mais comum industrialmente é o de isomerização enzimática de glicose, em uma reação catalisada pela enzima glicose isomerase. Na isomerização química, geralmente são utilizadas bases fracas para promover a isomerização de glicose a frutose. Existem vantagens e desvantagens para cada método de isomerização, como foi discutido na seção III.4.

III.6.1 Aspectos do Mercado Brasileiro de Frutose

O Brasil ainda não está entre os grandes produtores mundiais de frutose. Das empresas sócias da Associação Brasileira da Indústria Química apenas a **CORN PRODUCTS BRASIL** (SP) é apontada com produtora deste açúcar (ABIQUIM, 2011).

Segundo o Radar Comercial (site de análises de mercados e produtos, do governo brasileiro), em 2010, o Brasil exportou US$16.000 (FOB) (cerca de 20 toneladas) referentes à Frutose, no estado sólido, e xarope de frutose contendo, em massa, no estado seco, mais de 50% de frutose; e US$105.000 (FOB) (cerca de 70 toneladas) referentes à Frutose quimicamente pura, no estado sólido, como mostrado na figura 10. Os principais compradores da frutose brasileira são Estados Unidos, França e Paraguai.

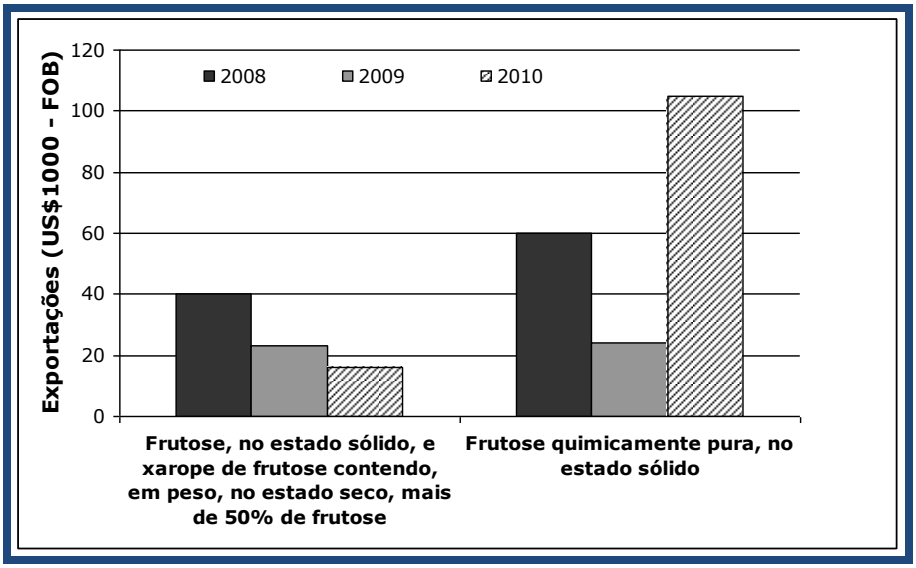

Figura 10. Exportação Brasileira de Frutose no triênio 2008/2009/2010.
Fonte: Radar Comercial (2011).

No último triênio, observou-se a queda das exportações de frutose no estado sólido e xarope de frutose contendo em massa, no estado seco, mais de 50% de frutose. Em contraponto, a exportação de frutose quimicamente pura, no estado sólido teve um aumento de 75% neste mesmo período.

III.7 Considerações Gerais

A utilização de enzimas em processos industriais é de grande importância ambiental, visto que estas atuam em reações conduzidas em condições brandas de temperatura, pressão e pH e são altamente específicas, gerando pouco ou nenhum resíduo.

A substituição de processos químicos por processos biotecnológicos e a substituição de matérias-primas não renováveis por matérias-primas renováveis, podem tornar um produto mais verde. Neste contexto, a produção de polímeros verdes que contêm uma etapa enzimática, é de grande importância para o meio ambiente no âmbito mundial. Este é o caso do polímero verde substituto ao polietileno tereftalato, que possui como monômero o FDCA.

Uma das etapas de produção deste monômero é a obtenção de frutose a partir de glicose, que pode ser feita pela via enzimática, onde a isomerização da glicose à frutose é catalisada pela enzima glicose isomerase.

Esta enzima, vastamente aplicada na indústria de xarope de glicose/frutose, pode ser produzida tanto intra quanto extracelularmente e sua utilização pode se dar na forma livre ou na forma imobilizada. Existem inúmeras vantagens em se utilizar enzimas imobilizadas, incluindo a possibilidade de operar o processo continuamente.

Na presente pesquisa utilizou-se uma enzima comercial glicose isomerase imobilizada, em processo alimentado continuamente e realizado em biorreator de leito fixo.

IV Materiais & Métodos

Neste capítulo serão descritas as metodologias utilizadas para a realização dos experimentos e para as análises dos resultados nestes obtidos.

IV.1 Enzima

Em todos os experimentos enzimáticos utilizou-se a enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus,* imobilizada, produzida pela Novozymes® e comercializada pela Sigma-Aldrich®. Esta enzima comercial possui formato cilíndrico e tamanho variando de 0,3mm a 1,0mm. Segundo Bhosale *et al.* (1996), a ligação do suporte de imobilização à enzima foi feita por ligações cruzadas com glutaraldeído. O fabricante não revelou maiores dados sobre a imobilização da enzima glicose isomerase.

A enzima comercial utilizada neste trabalho possuía carga enzimática de $350U.g^{-1}$, determinada pelo fabricante. Uma unidade de glicose isomerase imobilizada (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para a conversão de glicose a frutose, com taxa inicial de $1\mu mol.min^{-1}$, sob as seguintes condições: glicose 45% (m/m); pH 7,5; temperatura de $60^{o}C$; 1,0g.l+ Mg^{2+}; concentração de Ca^{2+} abaixo de 2ppm; 100ppm de metabissulfito de sódio; tampão carbonato 2,0mM e conversão entre 40% e 45%.

IV.2 Biorreator

Nos experimentos de isomerização conduzidos em biorreator de bancada utilizou-se um biorreator de vidro com 54 ml de volume total, dos quais 30 ml correspondiam ao leito recheado com glicose isomerase. A temperatura do biorreator foi mantida pela circulação de água aquecida, na camisa trocadora de calor, que possuia 100 ml de volume. A alimentação de solução de glicose foi controlada por bomba peristáltica e operada continuamente. A carga enzimática empregada neste biorreator de leito fixo foi de $350U.g^{-1}$, correspondentes à atividade global de 3.250U.

O leito possuía porosidade igual a 0,8; calculada segundo a seguinte relação:

$$Porosidade = \frac{Volume\ total - Volume\ das\ partículas}{Volume\ total}$$

Na figura 11 são apresentados um esquema representativo (a) e uma imagem real (b) do sistema utilizado no processo de isomerização enzimática em biorreator de bancada alimentado continuamente, constituído de uma bomba peristáltica *Masterflex U/S*, reator com geometria cilíndrica e relação altura diâmetro igual a 2,8, dotado de camisa trocadora de calor para controle da temperatura. O controle da temperatura foi realizado através da conexão de banho de recirculação de água (*HAAKE C 10*) ao reator.

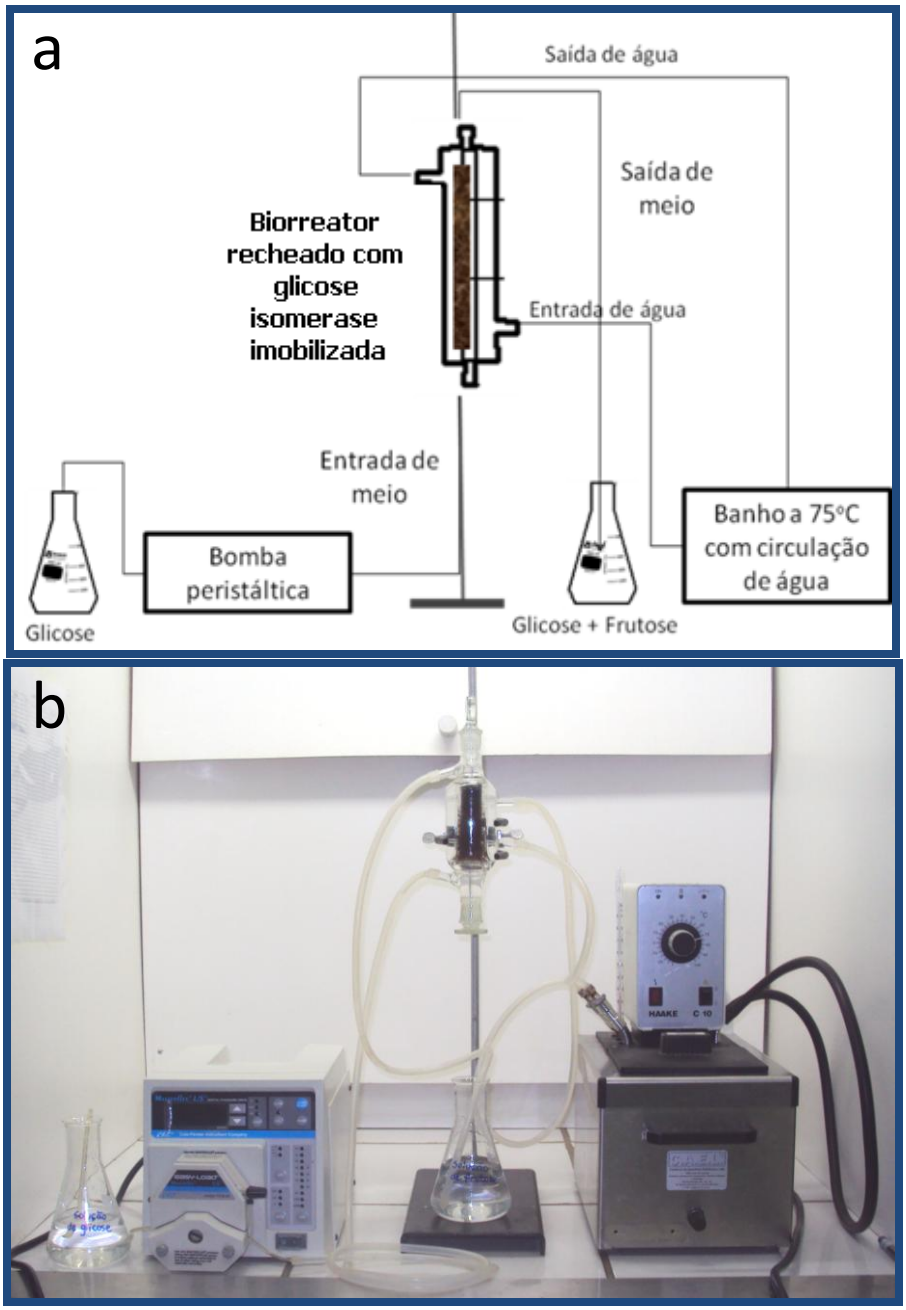

Figura 11. Esquema representativo (a) e imagem real (b) do processo de isomerização de glicose a frutose em biorreator de bancada.

IV.3 Fontes iônicas

Como fonte de Mg^{2+} utilizou-se $MgSO_4.7H_2O$; como fonte de Co^{2+} utilizou-se $CoSO_4.7H_2O$ e como fonte de Mn^{2+} utilizou-se $MnSO_4.H_2O$.

IV.4 Determinação da massa molar da enzima comercial Glicose isomerase de *Streptomyces murinus*

Com o objetivo de identificar a massa molar da enzima comercial glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, foi realizada a eletroforese desta enzima em condições desnaturantes.

Por se tratar de uma enzima imobilizada, foi necessário promover a dessorção desta, de sua matriz de imobilização. Para a dessorção foram utilizadas soluções de cloreto de sódio em concentrações iguais a 0,1M; 0,5M e 1,0M.

Em tubos de 2,0 ml colocou-se 0,1g de enzima imobilizada em contato com 1,0 ml de solução de cloreto de sódio. Este sistema foi mantido sob agitação constante durante 24h. Após a verificação da presença de proteína no extrato bruto obtido, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), fez-se a dessalinização e concentração do mesmo, em tubos *Vivaspin* com membrana com corte de 10 kDa (GE Healthcare) por centrifugação a 3000 g, obtendo-se o extrato protéico.

A eletroforese SDS-PAGE em condições nativas, do extrato protéico, foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % usando sistema de cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra system, marca Bio-Rad). A corrida eletroforética foi conduzida em temperatura ambiente (25°C), aplicando-se uma corrente de 20 mA/gel. Como marcador de massa molecular foi utilizado um padrão composto por uma mistura de seis proteínas, nativas, com massa molecular aparente de 20kDa a 120kDa (referência #SM0441 – http://www.fermenta.com)

Após eletroforese, o gel SDS-PAGE foi imerso em solução corante (metanol 45%, ácido acético 10 % e *coomasie* brilhante R-250 0,1 %) por 3 horas e em seguida descorado com solução fixadora descorante (ácido acético 7%).

As massas molares das proteínas purificadas foram determinadas após eletroforese SDS-PAGE utilizando o software Gel-Pro Analyser 4.0. O gel foi digitalizado e a imagem tratada pelo software, o qual identifica as bandas de proteínas dos padrões de massa molar e das amostras.

IV.5 Seleção dos parâmetros importantes para a isomerização enzimática de glicose a frutose

Para a seleção de parâmetros importantes na isomerização de glicose a frutose, como concentração de íons divalentes (Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}), temperatura e pH, utilizou-se o planejamento experimental Plackett & Burman.

Os parâmetros e os intervalos selecionados para realizar o planejamento Plackett & Burman estão expressos na tabela 8. Os parâmetros e seus níveis intermediários foram sugeridos pelo fabricante da enzima, em protocolo próprio. A variável dependente, ou seja, a variável de resposta escolhida foi conversão de glicose a frutose, calculada segundo a relação:

$$Conversão\,(\%) = \frac{Concentração\ de\ Frutose * 100\%}{Concentração\ de\ Glicose + Concentração\ de\ Frutose}$$

Os experimentos deste planejamento foram realizados em tubos de ensaio, com 3,0 ml de meio reacional. O tempo reacional foi fixado em 5 h.

Tabela 8. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o planejamento segundo a metodologia Plackett & Burman. So: concentração inicial de glicose

Parâmetros	Níveis		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (°C)	55	60	65
pH	6,5	7	7,5
Carga Enzimática (g/L)	5	10	15
Mg^{2+}(mM)	0,4	1,2	2
Co^{2+}(mM)	0,4	1,2	2
Mn^{2+}(mM)	0,4	1,2	2
Na_2CO_3 (mM)	0,2	0,4	0,6
$CaCl_2$ (mM)	0,2	0,4	0,6
$Na_2S_2O_5$ (mg/L)	90	180	270
So (g/L)	15	30	45

IV.6 Determinação das condições apropriadas para a isomerização enzimática de glicose a frutose

Após a seleção dos parâmetros estatisticamente importantes para a isomerização enzimática de glicose a frutose (seção IV.5), investigou-se em que níveis estes parâmetros devem ser fixados para que a conversão de glicose a frutose oferecesse valores maiores.

Para isso, foram investigados dois níveis de cada variável estatisticamente importante para o processo de isomerização enzimática de glicose a frutose, selecionadas anteriormente (seção IV.5), de acordo com a tabela 9. Para a melhoria deste processo empregou-se um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}, onde foram investigados cinco parâmetros em dois níveis, com três repetições do ponto central.

Tabela 9. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o planejamento fatorial fracionado. S_0: concentração inicial de glicose.

Parâmetros	Níveis		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (°C)	55	65	75
pH	5,5	6,5	7,5
Carga Enzimática (g/L)	10	15	20
$Na_2S_2O_5$ (ppm)	30	60	90
S_0 (g/L)	10	15	20

Todos os experimentos deste planejamento foram realizados em tubos de ensaio, com 3,0 ml de meio reacional, em 5 h de reação. O pH foi controlado por tampão carbonato 2mM e ajustado com H_2SO_4/NaOH.

IV.7 Verificação da imprescindibilidade dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Co^{2+} para a enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, na isomerização de glicose a frutose

Foram realizados oito experimentos, de acordo com a tabela 10, na presença e na ausência de todos os íons avaliados, e na presença de apenas um ou na combinação de dois dos íons avaliados.

Estes experimentos foram realizados em tubos de ensaio, com volume reacional de 3,0 ml, e 5 h de reação. As demais condições dos experimentos foram: temperatura de 75°C ± 1,0; pH 6,5 ± 0,5; concentração inicial de glicose igual a 6 g.l^{-1}; carga enzimática de 20 g.l^{-1}; tampão carbonato 2mM e concentração de metabissulfito de sódio de 60ppm.

Tabela 10. Experimentos realizados para investigar a imprescindibilidade dos íons para a isomerização enzimática

experimentos	Mg^{2+}(mM)	Co^{2+}(mM)	Mn^{2+}(mM)
1	0	0	0
2	0,8	0	0
3	0	0,8	0
4	0,8	0,8	0
5	0	0	0,8
6	0,8	0	0,8
7	0	0,8	0,8
8	0,8	0,8	0,8

IV.8 Determinação do tempo de residência para a isomerização enzimática em biorreator

Foram realizados nove experimentos em duplicata. Para cada ensaio variou-se o tempo de residência, do meio contendo glicose no reator, com o objetivo de fixar a vazão mais adequada para a realização dos experimentos posteriores.

Por *tempo de residência* entende-se: *o tempo que o meio reacional leva para percorrer todo o volume útil do biorreator*. Desta forma, quanto maior a vazão menor será o tempo de residência.

A tabela 11 apresenta a relação entre tempo de residência e vazão, para o reator empregado neste experimento.

Tabela 11. Tempos de residência e vazões empregadas em cada ensaio

teste	tempo de residência (h)	vazão (mL/h)
1	1	24,0
2	1,25	19,2
3	1,5	16,0
4	1,75	13,7
5	2	12,0
6	2,25	10,7
7	2,5	9,6
8	2,75	8,7
9	3	8,0

As condições destes experimentos foram determinadas em experimentos anteriores e consistem em:

- Temperatura= 75°C ± 1°C
- pH= 6,5 ± 0,5
- Concentração inicial de glicose= 35g.L^{-1}
- Concentração de metabissulfito de sódio= 0,06g.L^{-1}
- Concentração de íon magnésio= 0,197g.L^{-1}

Estes experimentos foram realizados sem adição de tampão, desta forma o ajuste do pH foi feito apenas com H_2SO_4/NaOH; o tempo reacional foi fixado em 8 h; e a atividade enzimática global presente no reator era de 3250U.

O biorretor de leito fixo utilizado neste trabalho possuia porosidade igual a 0,8. Um dos principais objetivos do leito fixo é promover o contato íntimo entre as fases envolvidas no processo, neste caso a enzima imobilizada (fase sólida) e o meio de isomerização (fase líquida. Conforme citado acima, o leito utilizado possuia alta porosidade (0,8) de modo a permitir que houvesse uma quantidade elevada de líquido entre as partículas de enzima imobilizada, dificultado o empacotamento e a perda de carga no biorreator.

IV.9 Determinação da estabilidade e do tempo de meia vida da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*

O ensaio de estabilidade e determinação do tempo de meia vida da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, foi realizado em biorreator de bancada, com leito fixo e alimentado continuamente com meio contendo glicose (35g.l^{-1}), $Na_2S_2O_5$ (0,06 g.l^{-1}) e $MgSO_4.7H_2O$ (0,197 g.l^{-1}). Adotou-se temperatura de 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; tempo de residência de 2h e carga enzimática de 350U.g^{-1}. A reação de isomerização foi conduzida continuamente durante 35 dias. Para o acompanhamento da ação da enzima sobre o substrato (glicose), monitorou-se a conversão de glicose a frutose.

IV.10 Avaliação da influência da concentração inicial de substrato (glicose) na conversão a frutose

Para promover o aumento da concentração de glicose na alimentação utilizou-se a técnica de planejamentos experimentais sequenciais. Os parâmetros avaliados foram tempo de residência e concentração inicial de glicose. As variáveis dependentes, ou seja, as variáveis de resposta escolhidas foram conversão de glicose a frutose e concentração final de frutose.

Todos os experimentos foram realizados em biorreator de leito fixo a 75°C ± 1°C e pH 6,5 ± 0,5; em meio composto por 0,06g.L^{-1} de metabissulfito de sódio, 0,197g.L^{-1} de sulfato de magnésio heptahidratado. O ajuste de pH foi feito sob adição de hidróxido de sódio e/ou ácido sulfúrico. O tempo reacional foi fixado em 8 h.

O primeiro planejamento realizado foi um fatorial com dois níveis e duas variáveis (2^2), descritos na tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o primeiro planejamento fatorial 2^2

Parâmetros	Níveis		
	-1	**0**	**1**
Tempo de Residência (h)	1	2	3
Conc. Inicial de Glicose (g.L-1)	100	250	400

Em seguida, realizou-se um novo planejamento fatorial 2^2, com a faixa de concentração inicial de glicose ampliada. Os parâmetros e intervalos adotados nestes experimentos estão relacionados na tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros e intervalos utilizados para construir o segundo planejamento fatorial 2^2

Parâmetros	Níveis		
	-1	**0**	**1**
Tempo de Residência (h)	1	2	3
Conc. Inicial de Glicose (g.L-1)	400	500	600

IV.11 Quantificações de Glicose e Frutose

As análises de concentração de glicose e concentração de frutose foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters® Corporation. Foi utilizada a coluna de troca iônica Aminex® HPX 87P (BioRad) e detector de índice de refração modelo 2484 (Waters®). Como fase móvel foi utilizada água "MiliQ" a uma vazão de 0,6 $ml.min^{-1}$. O volume de amostra injetada foi de 20 µl. As temperaturas do forno e do detector foram mantidas em 85°C e 40°C, respectivamente.

Para o cálculo das concentrações foi utilizada a seguinte relação:

$$Concentração\ da\ amostra = \frac{Área\ da\ amostra * concentração\ do\ padrão}{Área\ do\ padrão} * diluição$$

Na figura 12 está apresentado um cromatograma típico da separação e quantificação dos analitos de interesse.

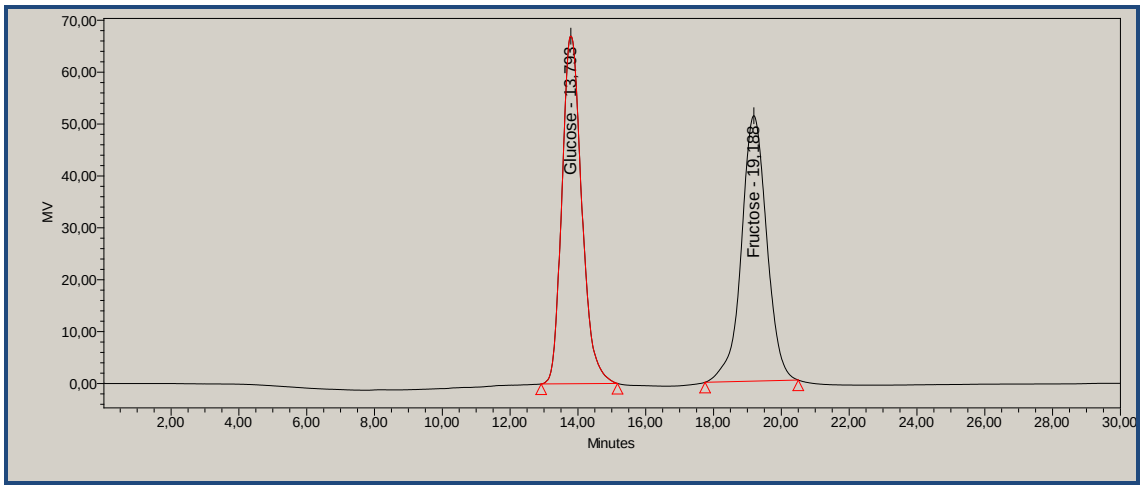

Figura 12. Cromatograma típico da quantificação de glicose e frutose.

V Resultados & Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos descritos na seção IV. Estes resultados serão devidamente discutidos, e serão apontados os avanços conquistados nesta pesquisa.

V.1 Determinação da massa molar da enzima comercial Glicose isomerase de *Streptomyces murinus*

Além da identificação das proteínas contidas no extrato enzimático, o SDS-Page tem como objetivo quantificar a massa molar da proteína/enzima de interesse. Com auxílio do software Gel-Pro Analyser 4.0 foi possível determinar a massa molar da enzima comercial glicose isomerase, utilizada nesta pesquisa.

Para localização das bandas, o software se baseia na intensidade de cor por coluna. É indicada ao software a coluna cujas bandas são as dos marcadores de massa molecular e indicados os respectivos valores de massa (fornecidos pelo fabricante). As massas moleculares das amostras são determinadas com base na migração dos padrões de massa molecular. O software calcula a massa molecular da enzima com base no logarítimo da massa molecular versus mobilidade relativa dos padrões e gera a imagem a seguir (figura 13).

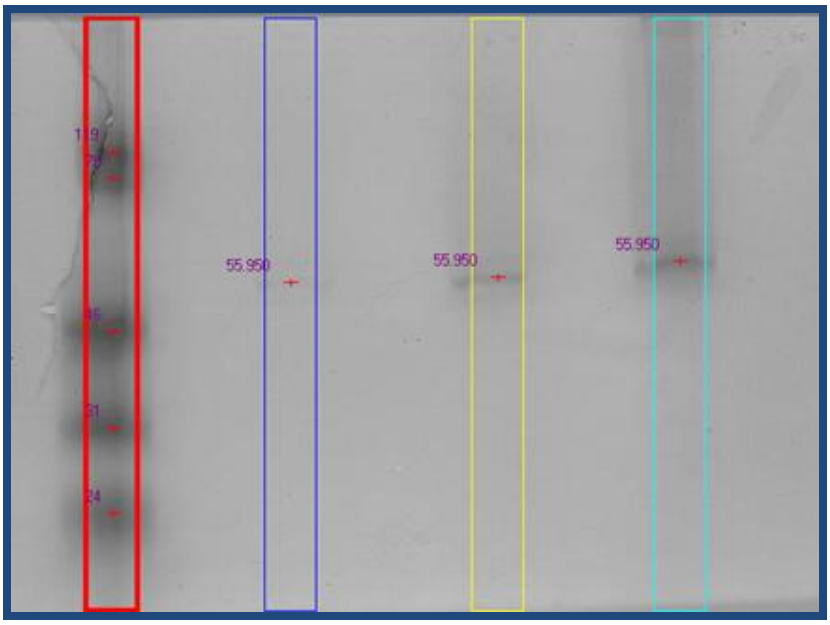

Figura 13. Imagem gerada pelo software Gel-Pro Analyser 4.0, com a determinação da massa molecular da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus.*
À esquerda: padrão de massa molecular; à direita: amostras contendo a enzima glicose isomerase analisada em diferentes diluições, sejam elas, 1:32; 1:16 e 1:8 (da esquerda para a direita).

Na figura 13 observa-se o padrão de massa molecular à esquerda, com as massas moleculares das respectivas proteínas-padrão. À direita tem-se amostras, com diferentes diluições, da enzima de interesse. Como pode-se observar na figura 13, a massa molecular da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, calculada pelo software foi de 55.95kDa, coerente com os dados apontados pela literatura - de 52kDa a 191kDa, segundo VITOLO (2001b). Segundo Vangrysperre et al. (1990) a massa molar média de enzimas glicose isomerase de actinomicetos, como a utilizada neste trabalho, é de 50kDa.

V.2 Seleção dos parâmetros importantes para a isomerização enzimática de glicose a frutose

São muitos os fatores que podem alterar positiva ou negativamente a atividade de enzimas, como temperatura, pH e presença de substâncias ativadoras ou inibidoras.

Segundo Bhosale *et al.* (1996), no caso da enzima em estudo, glicose isomerase, alguns íons são necessários para sua atividade ótima. O íon Mg^{2+} é relatado como ativador desta enzima e Co^{2+} é apontado como responsável pela estabilização conformacional de glicose isomerase, enquanto os íons Ag^{+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+} podem inibir a atividade desta enzima. A necessidade do íon Mn^{2+}é apontada na literatura, porém não se conhece claramente o papel desempenhado por este íon na estabilidade/atividade da enzima glicose isomerase (HARTLEY, *et al*., 2000).

Neste primeiro planejamento avaliou-se a influência dos parâmetros concentração dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} e Ca^{2+}; concentração de carbonato de sódio (como tampão); concentração de metabissulfito de sódio (como ativador) e também temperatura, pH, carga enzimática e concentração de substrato inicial (glicose). Para esta avaliação utilizou-se a metodologia proposta por Plackett & Burman (P&B), indicada para a seleção prévia das variáveis de um processo, reduzindo o número de experimentos sem comprometer os resultados e a análise estatística (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A tabela 14 apresenta as conversões obtidas em cada ensaio do planejamento P&B 16. De acordo com os dados presentes nesta tabela as maiores conversões, cerca de 40% (experimentos 4,6 e 8), foram alcançadas nos experimentos realizados sob maior temperatura (65°C), carga enzimática mais elevada e menor concentração de metabissulfito de sódio. As menores conversões, de 11% a 14%, foram obtidas nos experimentos conduzidos em menores temperaturas e cargas enzimáticas e menores (experimentos 7, 13, 15 e 16).

Ao se realizar a análise estatística dos resultados do planejamento experimental foi possível construir o diagrama de Pareto (Figura 14), o qual apresenta tanto gráfica quanto numericamente os efeitos de cada fator. No diagrama de Pareto são apresentados os fatores que possuem significância estatística *(p-level* < 0,1), assim como a magnitude do efeito estimado de cada variável. Nesse diagrama, o efeito é representado por barras, sendo que apenas as barras que ultrapassam a linha vertical do *p-level* apresentam significância estatística. Este valor do *p-level* (0,1) garante, com um nível de confiança de 90%, que um determinado fator influencia a variável de resposta analisada (CALADO & MONTGOMERY, 2003). O nível de segurança de 90% é indicado para a seleção de variáveis (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

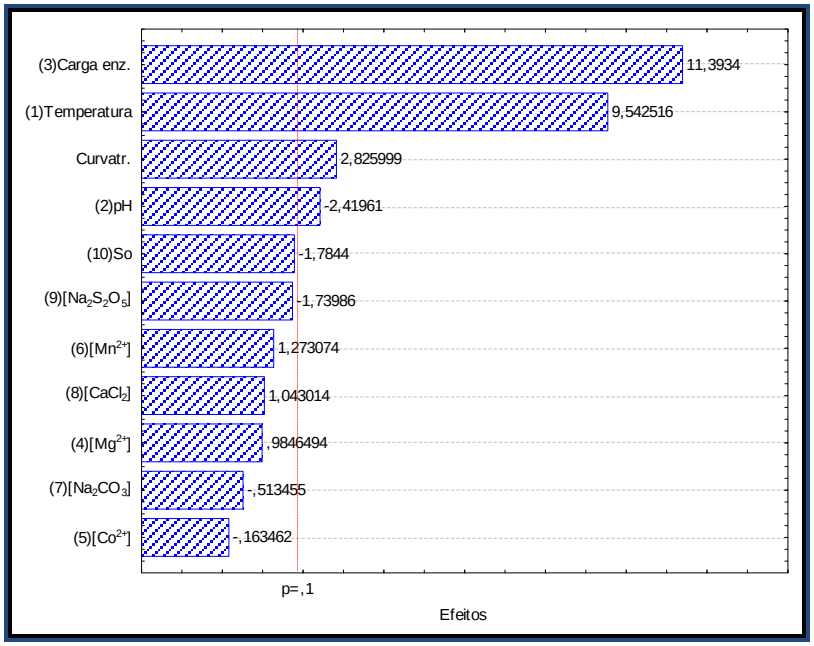

Figura 14. Diagrama de Pareto do planejamento P&B para a conversão de glicose a frutose por glicose isomerase.

Tabela 14. Condições e conversões de cada ensaio do planejamento P&B 16.

Experimentos	Temp.	pH	Carg.Enz	Mg^{2+}	Co^{2+}	Mn^{2+}	Na_2CO_3	$CaCl_2$	$Na_2S_2O_5$	So	Conversão (%)
1	65	6,5	5	0,4	2	0,4	0,2	0,6	270	15	24,77
2	65	7,5	5	0,4	0,4	2	0,2	0,2	270	45	21,89
3	65	7,5	15	0,4	0,4	0,4	0,6	0,2	90	45	32,22
4	65	7,5	15	2	0,4	0,4	0,2	0,6	90	15	42,85
5	55	7,5	15	2	2	0,4	0,2	0,2	270	15	22,78
6	65	6,5	15	2	2	2	0,2	0,2	90	45	40,97
7	55	7,5	5	2	2	2	0,6	0,2	90	15	14,24
8	65	6,5	15	0,4	2	2	0,6	0,6	90	15	41,86
9	65	7,5	5	2	0,4	2	0,6	0,6	270	15	23,03
10	55	7,5	15	0,4	2	0,4	0,6	0,6	270	45	23,16
11	55	6,5	15	2	0,4	2	0,2	0,6	270	45	27,19
12	65	6,5	5	2	2	0,4	0,6	0,2	270	45	23,50
13	55	7,5	5	0,4	2	2	0,2	0,6	90	45	11,98
14	55	6,5	15	0,4	0,4	2	0,6	0,2	270	15	29,17
15	55	6,5	5	2	0,4	0,4	0,6	0,6	90	45	14,36
16	55	6,5	5	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	90	15	14,16
17	60	7	10	1,2	1,2	1,2	0,4	0,4	180	30	29,45
18	60	7	10	1,2	1,2	1,2	0,4	0,4	180	30	32,54
19	60	7	10	1,2	1,2	1,2	0,4	0,4	180	30	27,68

Observa-se claramente o efeito dos parâmetros carga enzimática e temperatura sobre a conversão de glicose a frutose. Ambos os efeitos são positivos, ou seja, o aumento destes parâmetros possivelmente levará ao aumento da conversão. TÜKEL & ALAGÖZ (2008) mostraram que a temperatura ótima para a enzima glicose isomerase é aproximadamente 60°C; entretanto segundo STRANDBERG & SMILEY (1971) a temperatura ótima para glicose isomerase de *Streptomyces phaeochromogenesm* é 80°C; CHOU *et al.* (1976) indicam 80°C como a temperatura ótima para a enzima glicose isomerase, porém utilizam 70°C para realizar a reação de isomerização, evitando assim a degradação térmica da glicose. A utilização de temperaturas entre 60°C e 80°C corrobora com os dados da temperatura, porém cabe ressaltar que a estabilidade da enzima a altas temperatura depende do microrganismo que a produziu.

O parâmetro pH também mostrou-se significativo estatisticamente, porém com efeito cerca de 4 vezes menor. Concentração inicial de glicose e concentração de metabissulfito de sódio foram parâmetros marginalmente significativos, visto que apresentam-se muito próximos do *p-level*. Os demais parâmetros não foram significativos.

Seguindo o objetivo deste experimento, selecionou-se as variáveis temperatura, carga enzimática, pH, concentração inicial de glicose e concentração de metabissulfito de sódio para o próximo estudo. Como as demais variáveis não foram estatisticamente significativas, optou-se por mantê-las em seus níveis mínimos nos experimentos posteriores.

V.3 Determinação das condições apropriadas para a isomerização enzimática de glicose a frutose

Os planejamentos fatoriais fracionados estão entre os tipos mais usados de planejamento para projeto de produtos e processos e para melhoria de processos (CALADO & MONTGOMERY, 2003), por indicarem os parâmetros estatisticamente significativos de forma confiável, com número reduzido de experimentos. Neste planejamento foram

avaliados dois níveis de cinco parâmetros, além de três repetições do ponto central, gerando dezenove experimentos apresentados na tabela 15.

Como pode-se observar na tabela 15, as maiores conversões obtidas estão entre 51% e 53% (experimentos 6, 8, 14 e 16), conferindo um aumento de 23% em relação ao melhor resultado obtido no planejamento P&B (seção V.2). Os melhores resultados foram obtidos em experimentos realizados a 75°C, enquanto as conversões mais baixas foram obtidas em experimentos a 55°C (experimentos 1 e 3), indicando a forte influência da temperatura sobre o processo de isomerização enzimática.

Tabela 15. Condições e conversões de cada ensaio do planejamento fatorial fracionado.

Exp.	T(°C)	pH	C.E (g/L)	$Na_2S_2O_5$ (ppm)	So (g/L)	Conv. (%)
1	55	5,5	10	30	20	25,36
2	75	5,5	10	30	10	48,14
3	55	7,5	10	30	10	25,52
4	75	7,5	10	30	20	46,62
5	55	5,5	20	30	10	34,02
6	75	5,5	20	30	20	51,12
7	55	7,5	20	30	20	36,76
8	75	7,5	20	30	10	51,9
9	55	5,5	10	90	10	28,25
10	75	5,5	10	90	20	49,19
11	55	7,5	10	90	20	28,76
12	75	7,5	10	90	10	45,7
13	55	5,5	20	90	20	41,33
14	75	5,5	20	90	10	52,68
15	55	7,5	20	90	10	43,5
16	75	7,5	20	90	20	51,01
17	65	6,5	15	60	15	44,69
18	65	6,5	15	60	15	44,54
19	65	6,5	15	60	15	44,84

*Exp: experimentos; T: temperatura; C.E: carga enzimática; S_0: concentração inicial de glicose; Conv.: conversão de glicose a frutose.

As conversões mais elevadas foram obtidas em experimentos onde a carga enzimática era máxima, porém altas conversões foram alcançadas tanto com concentração máxima de glicose quanto com concentração mínima deste substrato. Todavia, concentrações maiores de glicose fornecem maiores quantidades de frutose ao final do processo, fator importante para a viabilidade do processo.

Corroborando com as observações mencionadas anteriormente, o diagrama de Pareto (Figura 15) aponta a temperatura como o parâmetro mais importante estatisticamente, com efeito positivo e igual a 11,21. A carga enzimática também é um fator estatisticamente significativo, porém com efeito menor e igual a 5,47.

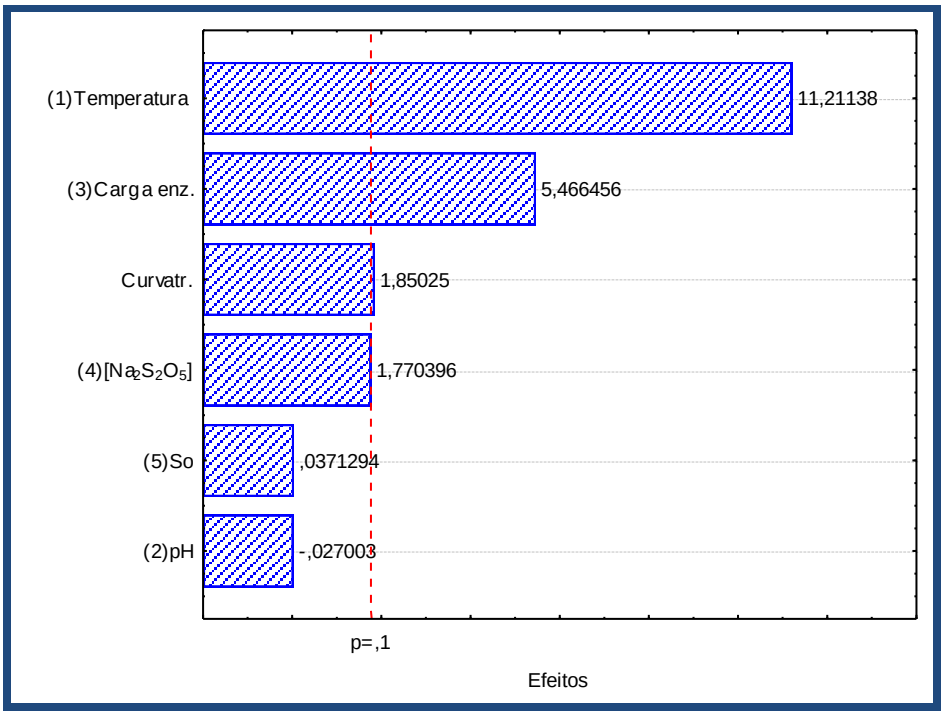

Figura 15. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial fracionado para a conversão de glicose a frutose por glicose isomerase.

A concentração de metabissulfito de sódio apresentou-se, novamente, marginalmente significativa, enquanto os parâmetros pH e concentração inicial de glicose não foram estatisticamente significativos. Desta forma, para os experimentos seguintes

foram utilizados, na sequência, o nível máximo de temperatura e os níveis intermediários de concentração de metabissulfito de sódio e de pH.

A literatura aponta a conversão de 55% como o valor máximo para o processo de isomerização enzimática de glicose a frutose, devido à reversibilidade desta reação (BUCHOLZ & SIBEL, 2008; CONVERTI *et. al*., 1997; HARTLEY *et. al*., 2000; KOCHHAR *et. al*., 1999; RICCA *et. al*., 2010; ZHANG, *et. al*., 2004). Considerando que os resultados obtidos aproximaram-se do limite de reversibilidade da reação enzimática, pôde-se definir as condições experimentais para os experimentos posteriores, os quais foram realizados em biorreator de bancada.

V.4 Verificação da imprescindibilidade dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Co^{2+} para a enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, na isomerização de glicose a frutose

Como mencionado na seção V.2 a enzima glicose isomerase necessita de alguns íons para que alcance sua atividade ótima, como por exemplo Mg^{2+}, Mn^{2+} e Co^{2+}. A presença destes íons torna o meio de isomerização mais complexo, além de encarecer o processo de isomerização como um todo.

Buscando a simplificação e a diminuição de custos do meio de isomerização, foi realizado um estudo com a finalidade de verificar a imprescindibilidade dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Co^{2+} para a enzima glicose isomerase utilizada na isomerização de glicose a frutose. Os experimentos realizados nesta etapa estão dispostos na tabela 16, a seguir.

A observação dos resultados presentes na tabela 16 indica uma pequena diferença entre os resultados dos experimentos 1, 2 e 8, os quais apresentaram as maiores conversões (49,89%, 51,42% e 52,91%, respectivamente). No ensaio 1 nenhum dos íons avaliados foi adicionado ao meio reacional, no ensaio 2 a isomerização ocorreu na presença de Mg^{2+} e ausência de Mn^{2+} e Co^{2+}, o ensaio 8 foi realizado na presença dos três íons avaliados.

Tabela 16. Condições e conversões de cada ensaio do planejamento fatorial 2^3.

Experimentos	Mg^{2+}(mM)	Co^{2+}(mM)	Mn^{2+}(mM)	Conversão (%)
1	0	0	0	49,89
2	0,8	0	0	51,42
3	0	0,8	0	45,30
4	0,8	0,8	0	48,29
5	0	0	0,8	42,89
6	0,8	0	0,8	45,10
7	0	0,8	0,8	47,61
8	0,8	0,8	0,8	52,91

Segundo HARTLEY *et al*. (2000) os íons Mg^{2+}, Co^{2+} e Mn^{2+} são importantes para a glicose isomerases de genêros de *Streptomyces sp*. No entanto, com os resultados obtidos no presente trabalho (tabela 16), percebe-se a reduzida influência dos íons divalentes sobre a conversão de glicose a frutose.

Baseando-se no resultado obtido no experimento 2 e no método de determinação de atividade enzimática de glicose isomerase, fornecido pela Novozymes®, fabricante da enzima utilizada nesta pesquisa, optou-se por adicionar apenas Mg^{2+} no meio reacional dos experimentos posteriores. Visto que os melhores resultados de conversão variaram de 49,89% a 52,91%, sendo que o experimento realizado apenas em presença de Mg^{2+} apresentou o valor de conversão intermediário de 51,42%. E ainda, o piore resultado se deu na ausência de Mg^{2+} (experimento 5), reforçando a necessidade da presença deste íon no meio de isomerização.

Desta forma, foi possível simplificar a composição do meio de isomerização com a retirada dos íons Mn^{2+} e Co^{2+}, sem comprometer a conversão de glicose a frutose. Focalizando o escalonamento deste processo, a simplificação do meio constitui um passo importante no sentido da maior economicidade do processo como um todo.

V.5 Determinação do tempo de residência para a isomerização enzimática em biorreator

Os resultados apresentados anteriormente correspondem a experimentos realizados em tubos de ensaio, e volume reacional igual a 3mL. No entanto, o desempenho de um processo pode variar com a escala em que é realizado, visto que mudanças na escala influenciam os fênomenos de transporte. O aumento da escala do processo é importante para que avalie o desempenho do processo em volumes maiores, até que chegue à escala industrial.

Nos experimentos seguintes utilizou-se biorreator de bancada para promover a isomerização enzimática de glicose a frutose. A utilização deste reator permitiu a investigação do processo em volume cerca de dez vezes maior, o emprego de enzima de modo contínuo, sem necessidade de uma etapa de recuperação do catalisador, e melhor controle da temperatura.

O gráfico a seguir (figura 16) mostra as conversões alcançadas em cada ensaio, ao final de 8h de processo.

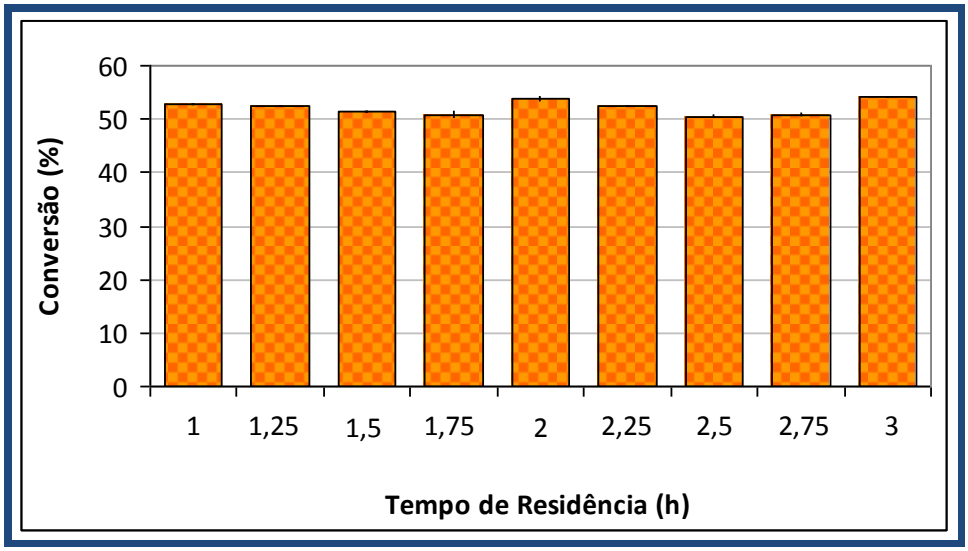

Figura 16. Conversão de glicose a frutose após 8h de isomerização enzimática em reator de bancada, para diferentes tempos de residência. Temperatura= 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; Concentração inicial de glicose= 35g.L^{-1}; Concentração de metabissulfito de sódio= 0,06g.L^{-1}; Concentração de íon magnésio= 0,197g.L^{-1}; carga enzimática: 350U.g^{-1}.

A isomerização enzimática de glicose a frutose em biorreator foi satisfatória, tendo aumentado cerca de 3 pontos percentuais em relação aos planejamentos realizados anteriormente. A conversão máxima alcançada foi de 54% ± 0,1; um valor expressivo levando-se em consideração a reversibilidade do processo enzimático. KALILPOUR & ROOSTAAZAD (2008) obtiveram 45% de conversão de glicose a frutose em um processo similar, com reator de leito fixo, a 60°C, porém com alimentação de 100 g/L.

Estes experimentos foram realizados sem o emprego de tampão, de modo que o pH foi ajustado apenas com H_2SO_4/NaOH. Pode-se afirmar, então, que a ausência de tampão não alterou o processo de isomerização. A retirada do tampão constitui uma melhoria de processo, tendo em vista a redução dos componentes do meio de isomerização.

Todos os experimentos, operados em diferentes tempos de residência, forneceram respostas similares, indicando a possibilidade de que a reação de isomerização seja instantânea. Tanto sob maior tempo de residência quanto sob menor tempo de residência, a conversão estabilizou-se (cerca de 50%) após 1h de processo.

Um novo estudo acerca do tempo de residência será apresentado ao longo desta dissertação, mas por hora o objetivo era definir um tempo de residência adequado à reação de isomerização em biorreator. O tempo de residência de 2h, por ser o valor médio do intervalo analisado foi selecionado para os próximos estudos.

A figura 17 apresenta o perfil de conversão em processo contínuo de isomerização de glicose em frutose, com tempo de residência de 2h. Observa-se que as conversões se mantêm ao longo do processo, evidenciando a confiabilidade dos dados.

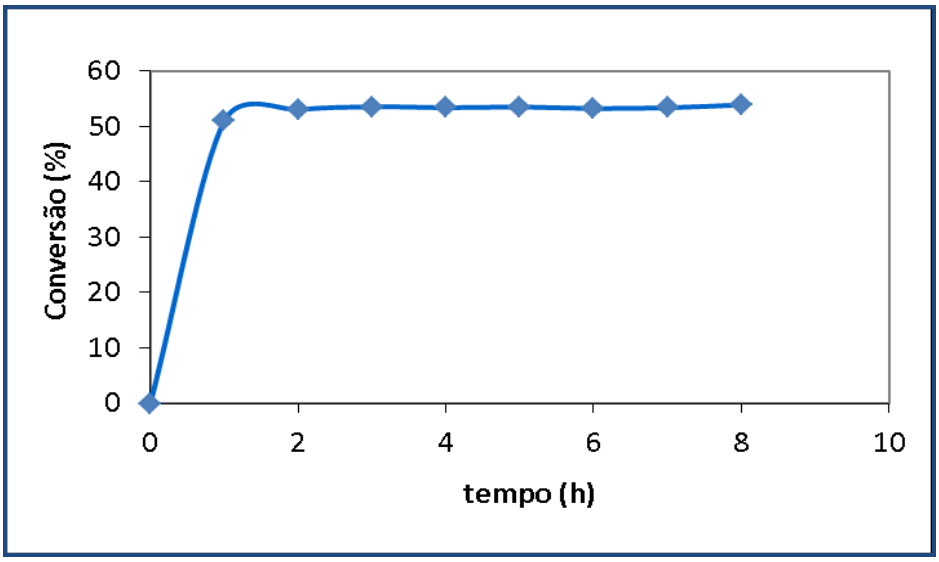

Figura 17. Perfil de conversão de glicose a frutose em processo enzimático contínuo, para tempos de residência de 2 h. Temperatura= 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; Concentração inicial de glicose= 35g.L^{-1}; Concentração de metabissulfito de sódio= 0,06g.L^{-1}; Concentração de íon magnésio= 0,197g.L^{-1}; carga enzimática: 350U.g^{-1}.

Perfis similares ao apresentado na figura 17 foram obtidos nas reações conduzidas nos diferentes tempos de residência, por este motivo não seria interessante a apresentação de todos os perfis de isomerização sob diferentes tempos de residência de meio contendo glicose, no biorreator. O desvio padrão médio obtido nestes experimentos foi de 0,5%.

V.6 Determinação da estabilidade e do tempo de meia vida da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*

Adotando-se o tempo de residência de 2h, realizou-se um estudo acerca da estabilidade da enzima glicose isomerase no sistema, ao longo do tempo. Foi gerado um perfil de isomerização, ao longo de 35 dias de processo contínuo (figura 18).

Neste estudo, durante os primeiros sete dias, as conversões de glicose a frutose mantiveram-se próximas de 54%, com pequeno decréscimo ao longo dos sete dias seguintes, atingindo 52,9% de conversão. A partir do vigésimo primeiro dia de isomerização

contínua, observou-se um decréscimo vertiginoso na conversão apontando uma possível perda de atividade da enzima utilizada.

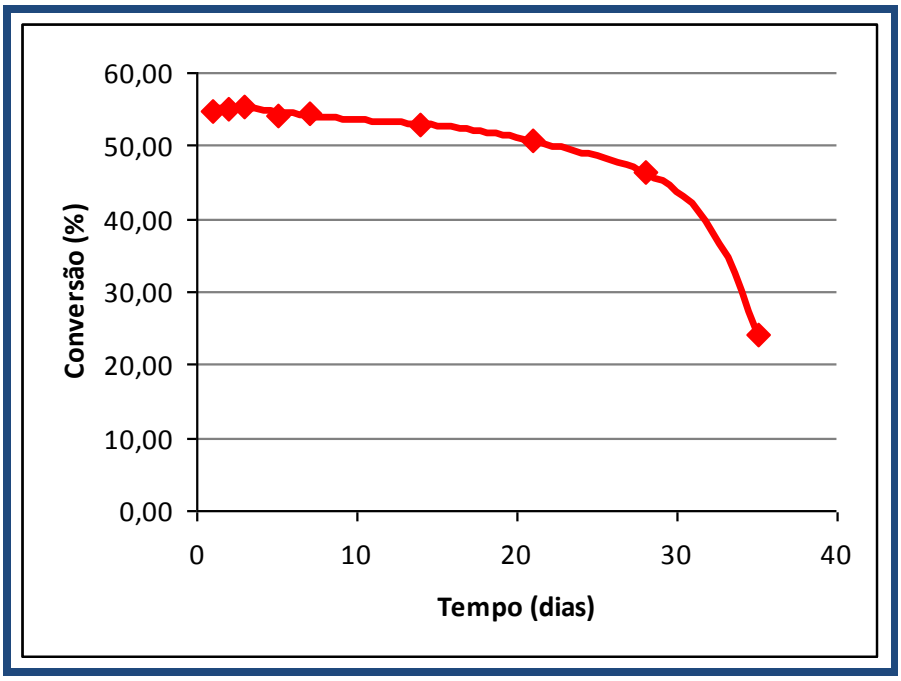

Figura 18. Perfil de isomerização em processo contínuo ao longo de 35 dias. Temperatura= 75°C ± 1°C; pH= 6,5 ± 0,5; tempo de residência= 2h; alimentação contínua de meio composto por 35g/L de glicose, 60 ppm de metabissulfito de sódio e 0,8 mM de $MgSO_4.7H_2O$; carga enzimática: $350U.g^{-1}$.

Pode-se afirmar que o processo contínuo se mantém estável no período de 21 dias, nas condições descritas. Cabe ressaltar que a estabilidade da enzima depende das condições às quais ela é exposta.

No que tange ao tempo de meia vida da enzima empregada, adimitindo-se a conversão máxima associada à atividade máxima, o tempo de meia vida é aquele necessário para que a conversão seja reduzida à metade. A conversão máxima alcançada ao longo deste processo foi de 55,4%, logo, a metade desta conversão é 27,7%. Considerando o comportamento polinomial de 3ª ordem, esta conversão foi alcançada após 33 dias.

V.7 Avaliação da influência da concentração inicial de substrato (glicose) na conversão a frutose

A estratégia de planejamentos experimentais sequenciais permite selecionar a região onde o ponto de ótimo se encontra, ou seja, as condições que fornecem a resposta mais elevada. Com o intuito de se aumentar a concentração de frutose ao fim do processo e levando em consideração a limitação da conversão a níveis próximos de 50%, adotou-se a estratégia de aumentar a concentração de glicose na alimentação. Desta forma, realizou-se dois planejamentos experimentais sequenciais tendo como variáveis independentes tempo de residência e concentração inicial de glicose, e como variáveis de resposta conversão e concentração final de frutose.

Optou-se por avaliar o tempo de residência, visto que este parâmetro apresentou respostas muito similares no estudo preliminar (seção V.5), onde a concentração inicial de glicose era 35g/l e os tempos de residência variavam de 1 a 3. O aumento da concentração de glicose poderia exigir mais tempo pra que a enzima realizasse a isomerização.

O aumento da concentração final de frutose é o objetivo deste planejamento, porém esta variável está intimamente ligada à alimentação, de modo que concentrações elevadas de glicose na alimentação podem gerar concentrações elevadas de frutose na saída, mesmo com conversões menores que as desejadas (>50%). A conversão de glicose em frutose foi calculada para que se assegurasse níveis satisfatórios de isomerização, e não somente altas concentrações de frutose ao final do processo.

O primeiro planejamento experimental realizado foi do tipo fatorial com dois níveis e duas variáveis. Os níveis adotados para a variável tempo de residência foram baseados em experimentos anteriores. O nível mínimo de concentração inicial de glicose foi fixado de acordo com o trabalho de KALILPOUR & ROOSTAAZAD (2008). Na tabela a seguir (tabela 17) são apresentados os experimentos realizados neste planejamento e suas respectivas respostas.

Tabela 17. Condições e respostas de cada ensaio do primeiro planejamento fatorial 2^2.

Experimentos	Tempo de Residência (h)	Conc. Inicial de Glicose ($g.L^{-1}$)	Conversão (%)	Conc. Final de Frutose ($g.L^{-1}$)
1	1,0	100,0	52,55	52,55
2	1,0	400,0	53,96	215,84
3	3,0	100,0	52,29	52,29
4	3,0	400,0	51,96	207,84
5 (C)	2,0	250,0	52,23	130,58
6 (C)	2,0	250,0	52,50	131,24
7 (C)	2,0	250,0	52,23	130,58

Para todos os experimentos realizados obteve-se conversões maiores que 50%, como é desejado. Observa-se que não há diferença significativa entre as respostas, em conversão, para os experimentos deste planejamento, logo, a análise estatística deve basear-se na variável de resposta concentração final de frutose.

Os experimentos 2 e 4 apontaram para a possibilidade de aumento da concentração de glicose na alimentação, sem declínio nos níveis de conversão. A análise do diagrama de Pareto (figura 19) mostra claramente a influência da concentração inicial de glicose para respostas elevadas em concentração final de frutose. Quanto ao fator tempo de residência, este se mostrou marginalmente significativo e com efeito negativo.

Baseando-se neste primeiro planejamento, optou-se por manter os níveis para a variável tempo de residência (o qual apresentou efeito marginalmente significativo) e aumentar a faixa de estudo para concentração inicial de glicose (a qual apresentou efeito significativo e positivo). Desta forma, para o segundo planejamento fatorial 2^2, realizou-se os experimentos relatados na tabela 18.

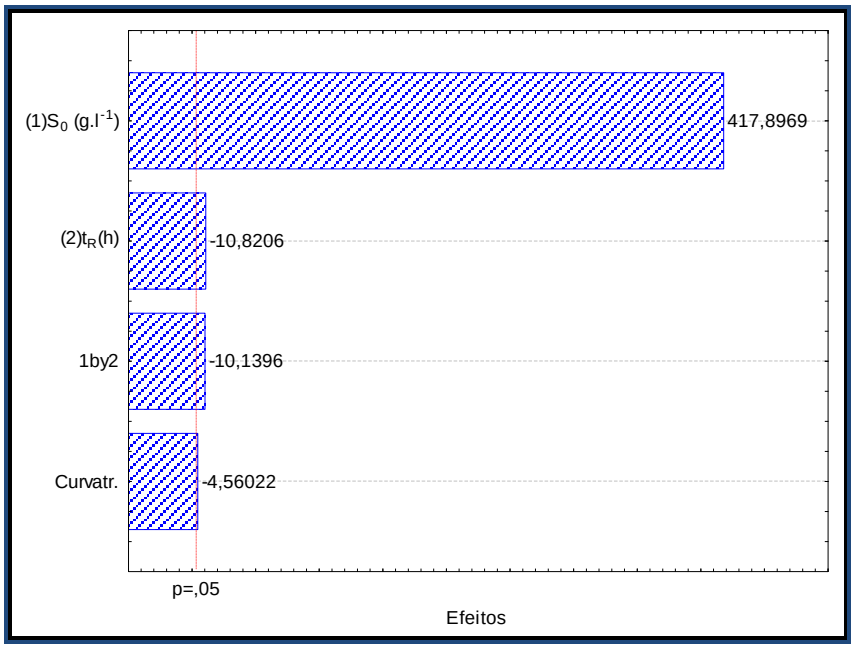

Figura 19. Diagrama de Pareto para a variável de resposta Concentração Final de Frutose. S_0: concentração inicial de glicose; t_R: tempo de residência. Planejamento1

Tabela 18. Condições e respostas de cada ensaio do segundo planejamento fatorial 2^2.

Experimentos	Tempo de Residência (h)	Conc. Inicial de Glicose ($g.L^{-1}$)	Conversão (%)	Conc. Final de Frutose ($g.L^{-1}$)
1	1	400	53,96	215,47
2	3	400	51,96	207,84
3	1	600	52,61	315,68
4	3	600	51,85	311,09
5 (C)	2	500	52,49	262,44
6 (C)	2	500	52,38	261,90
7 (C)	2	500	51,74	258,69

Novamente, todos os experimentos apresentaram conversões desejáveis e similares, logo, os experimentos com maior concentração de glicose na alimentação possibilitaram maiores concentrações de frutose na saída. Pode-se afirmar que a enzima manteve seu desempenho independente da concentração de substrato.

No diagrama de Pareto (figura 20), houve uma modificação em relação ao planejamento anterior. Além da concentração inicial de glicose, a variável tempo de residência também mostrou-se significativa, porém com efeito negativo.

Cabe ressaltar que, para a faixa estudada, a interação entre os dois parâmetros avaliados foi significativa.

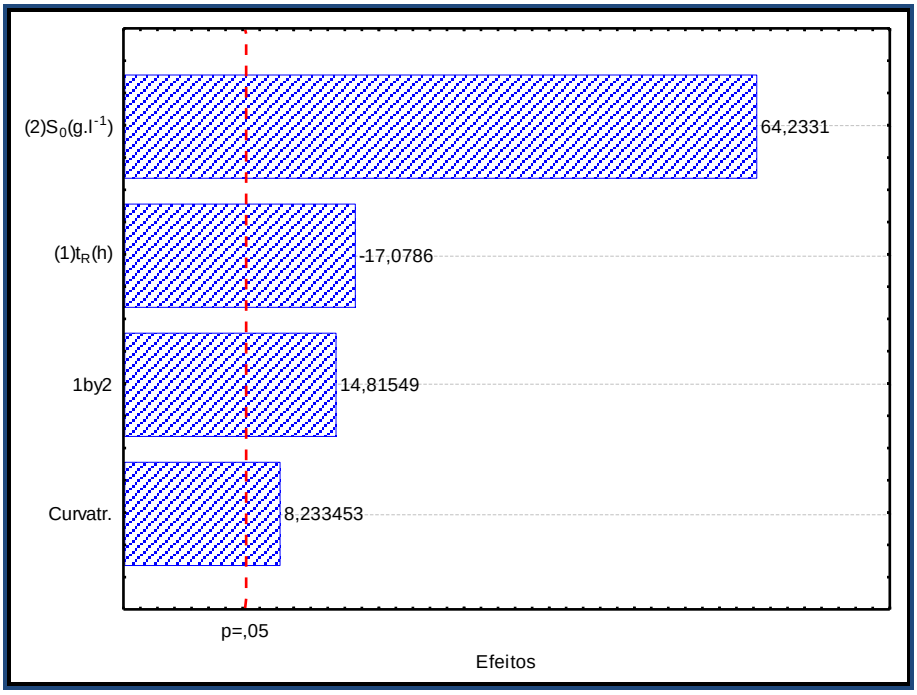

Figura 20. Diagrama de Pareto para a variável de resposta Concentração Final de Frutose. S_0: concentração inicial de glicose; t_R: tempo de residência. Planejamento2

Seria interessante realizar um novo planejamento fatorial 2^2 com níveis menores de tempo de residência e níveis maiores de concentração de glicose, porém não foi possível preparar uma solução de glicose tão concentrada. A diminuição do tempo de residência pode ser um modo de "driblar" a reversibilidade da reação, levando à otimização do processo de isomerização enzimática.

A carga enzimática aplicada a estes experimentos foi fixa e igual a $350U.g^{-1}$, valor este correspondente à atividade enzimática global de 3250U. O leito fixo era composto por

15g de enzima e a alteração deste levaria à redução do volume do leito com consequente aumento do volume útil do reator. Mediante a impossibilidade de diminuição da atividade enzimática global, a redução do tempo de residência apresenta-se como uma questão importante para a economicidade do processo e deve ser investigada posteriormente. Tendo em vista a elevada atividade enzimática presente no leito fixo, a reação de isomerização ocorre quase que instantaneamente, por isso a redução do tempo de residência deve ser avaliada.

Os resultados de conversão máxima de glicose a frutose (54%) obtidos nesta pesquisa mostraram-se superiores aos reportados na literatura. Em trabalho, sob condições similares, KALILPOUR & ROOSTAAZAD (2008) obtiveram conversões máximas de 45%, 42% e 38%, quando foram empregadas concentrações de glicose na alimentação de $100g.l^{-1}$, $300g.l^{-1}$ e $580g.l^{-1}$, respectivamente. A reação de isomerização foi conduzida em biorreator de leito fixo, alimentado continuamente, sob temperatura de 60 ◦C, pH: 7,5 e tempo de residência de 1000s (0,28h).

Conversões mais elevadas permitiram uma produção de frutose maior. Nesta pesquisa foi possível produzir $315,7g.l^{-1}$ de frutose a partir de $600g.l^{-1}$ de glicose, valor correspondente à conversão de 52,6% enquanto que KALILPOUR & ROOSTAAZAD (2008), ao utilizarem $580g.l^{-1}$ de glicose na alimentação de reator leito fixo conduzido continuamente, obtiveram a produção de aproximadamente $220g.l^{-1}$ de frutose (38% de conversão de glicose a frutose).

Na tabela 19 estão apresentados alguns resultados reportados na literatura. Comparando-se os resultados presentes na literatura com aqueles obtidos nesta pesquisa, observa-se a grande contribuição deste trabalho para as pesquisas de isomerização enzimática de glicose a frutose. A concentração inicial de glicose aplicada neste processo foi superior àquelas apontadas na literatura, mantendo-se a conversão acima de 50%. Desta forma foi possível a produção de frutose em maiores concentrações ($315g.l^{-1}$).

Tabela 19. Tabela comparativa entre os resultados da literatura e os obtidos nesta pesquisa.

Tipo de Isomerização	Catalisador	Condução do Processo	Condições Experimentais	Volume Reacional	So	Conversão Glicose a Frutose	Observações	Referência
Química	Zeólitas	Batelada	95°C; 8 bar; 700 rpm	100 mL	50g/L (glicose)	7% - 42%	alta seletividade em frutose (60% - 86%)	MOREAU *et al.*, 2000
Química	Silicatos	Batelada	100°C; 600 rpm	1 mL	50g/L (glicose)	27% - 56%	alta seletividade em frutose (62% - 84%)	VALENTE *et al.*, 2008
Enzimática	Glicose isomerase	Contínuo	60°C; pH 7,5	5,4 mL	100g/L (glicose)	45%	adição de Co^{2+} e Mg^{2+}; reator leito fixo	KALIPOUR & ROOSTAAZAD (2008)
Enzimática	Glicose isomerase	Batelada	70°C; pH 7,5; 150 rpm; 480 W (microondas)	100 mL	144g/L (glicose)	45%	assistido por microondas	YU *et al.* (2011)
Enzimática	Glicose Isomerase	Contínuo	75°C; pH 6,5; 21 dias; t_R=1h	54 mL	600g/L	52%	Adição de Mg^{2+}; leito fixo	Esta Pesquisa

V.8 Considerações Gerais

Neste trabalho estudou-se a composição do meio de isomerização de modo a simplificá-lo. Foi possível retirar o tampão carbonato e os íons Mn^{2+} e Co^{2+} do meio de isomerização, sem que houvesse redução na conversão em frutose.

A conversão obtida ao longo dos experimentos em biorreator foi de aproximadamente 52%, limitada pelo equilíbrio químico.

Com o aumento da concentração de glicose na alimentação do biorreator e mantendo-se a conversão acima de 50%, produziu-se 315,7g.l^{-1} de frutose, em processo contínuo com tempo de residência de 1h.

A produção de frutose obtida neste trabalho é expressiva frente aos valores encontrados na literatura e constitui um primeiro passo na direção da produção de um polímero verde que substitua o polietileno tereftalato (PET).

VI Conclusões & Sugestões

Neste capítulo serão apresentados as conclusões decorrentes da pesquisa realizada e dos resultados obtidos, bem como as sugestões para a continuidade desta pesquisa.

À luz dos resultados obtidos na presente dissertação de mestrado, pode-se concluir que:

- A massa molar da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, imobilizada, é de 55.95kDa;

- Foi possível realizar a simplificação do meio através da retirada dos íons Co^{2+} e Mn^{2+} e da retirada do tampão carbonato, substituindo-o por ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio para o ajuste do pH. A simplificação do meio de isomerização representa um fator importante para a economia e para o escalonamento do processo.

- As condições reacionais determinadas em tubo de ensaio foram: temperatura de $75^{o}C \pm 1^{o}C$; pH 6,5 ± 0,5; concentração de metabissulfito de sódio igual a $0{,}06 g.L^{-1}$ (60ppm) e concentração de íon magnésio de $0{,}197 g.L^{-1}$ (0,8mM);

- A estabilidade da enzima comercial empregada nesta pesquisa foi de 21 dias (oferecendo conversão de glicose a frutose acima de 50%);

- O tempo de meia-vida da enzima glicose isomerase de *Streptomyces murinus*, utilizada nesta pesquisa, foi de 33 dias;

- A conversão máxima alcançada em biorreator de bancada, de leito fixo e alimentado continuamente foi de 54%, valor este limitado pelo caráter reversível da reação de isomerização.

- Após a realização de dois planejamentos fatoriais 2^2, foi possível produzir $315{,}7 g.l^{-1}$ de frutose a partir de $600 g.l^{-1}$ de glicose, valor correspondente à conversão de 52,6% . Este resultado representa a grande contribuição deste trabalho na busca pela obtenção de um polímero de fonte renovável (plástico verde), substituto ao polietileno tereftalato (PET).

Sugestões:

- Realizar um estudo de redução do tempo de residência, para promover o aumento da produtividade volumétrica.
- Estudar uma maneira de se preparar soluções de glicose mais concentradas que $600 g.l^{-1}$ e investigar o emprego destas soluções na alimentação contínua do reator de leito fixo;
- Realizar um novo experimento de estabilidade enzimática com as condições otimizadas (tempo de residência reduzido e concentração de glicose aumentada);
- Avaliar a separação da glicose residual, através de uma coluna de separação glicose/frutose acoplada à saída do biorreator, permitindo a recirculação de glicose ao biorreator e promovendo o aumento do rendimento do processo de isomeização de glicose a frutose, como um todo.

Referências

ABIQUIM. **Pacto Nacional da Indústria Química.** Associação Brasileira da Indústria Química. São Paulo/SP, 2010. Disponível em: <www.abiquim.org.br/pacto/>. Acesso em 14 de julho de 2010.

ABIQUIM. **Produtos Químicos Brasileiros**. Associação Brasileira da indústria Química. Disponível em:. <http://www.abiquim.org.br/braz_new/Default.aspx>. Acesso em 10 de agosto de 2011.

ASIF, M.; ABASEED, A.E.: Modelling of glucose isomerization in a Huidized bed immobilized enzyme bioreactor. Bioresource Technology. V. 64, p. 229–235. 1998.

BACHMANN R. **Industrial biotech: new value creation opportunities.** McKinsey & Company. Presentation at the BIO Conference, New York, 2003.

BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. **Microbiological Reviews**, 60, N.2, p. 280–300, 1996.

BRADFORD, M. M. Anal. Biochem, 72, p. 248–254, 1976.

BRASKEM. **I´m green™**. Disponível em http://www.braskem.com.br/plasticoverde. Acesso em 10 de agosto/2011.

BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J.: Industrial carbohydrate biotransformations. Carbohydrate Research. V. 343, p. 1966–1979. 2008.

CAMPOS, Marcelo Kós Silveira. **A Lógica da Sustentabilidade na Indústria Química.** In: II Workshop: Inovação e Sustentabilidade na Indústria, 2010, Rio de Janeiro. Disponível em: www.abeq.org.br/palestras2010/11.pdf. Acesso em 13 de agosto de 2010.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.: **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed E-papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CARLINI C.; PATRONO P.; GALLETTI A.M.R.; SBRANA G.; ZIMA V.: Selective oxidation of HMF to FDCA by catalytic systems based on vanadyl phosphate. Applied Catalysis. V. 289, p. 197–204. 2005.

CHOU, C. C., LADISCH, M. R., & TSAO, G. T. Studies on glucose isomerase from Streptomyces species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 32, p. 489–493, 1976

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D.: **Tecnologia Enzimática**. 1. Ed. Ed. Epub, 2008. 288 p.

COELHO, M. A. Z.; SANTA BRIGIDA, A. I. **Apostila de Enzimologia**: Enzimologia (EQB 483), 2008.

CONVERTI, A., FISICHELLA, A., RISCOLO, A., DEL BORGHI, M., SCARINGI, A., CARBONE, D. Simulation of a reactor for glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase with continuous enzyme renewal. **Biotechnology Techniques,** v. 11, p. 99–103, 1997.

DIAS, G. F. **Educação ambiental: princípios e prática.** São. Paulo: Gaia, 1992.399p.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Green Chemistry.** Disponível em: <http://www.epa.gov/greenchemistry/>. Acesso em 20 de setembro de 2011.

FERREIRA, V. F; ROCHA, D. R; SILVA, F. C.: Potencialidades e Oportunidades na Química da Sacarose e Outros Açúcares. Química Nova. V. 32. N. 3, p. 623-638. 2009.

FLOOD, A.E; JOHNS, M. R; WHITE, E. T.: Mutarotation of D-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence on crystallization. Carbohydrate Research. V.288. p. 45-46. 1996.

HARTLEY, B. S., HANLON, N., JACKSON, R. J., RANGARAJAN, M. Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 294-335, 2000.

KALILPOUR, R.; ROOSTAAZAD, R.: Development and verification of a model to describe an immobilized glucose isomerase packed bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal,** 40, p. 328–336, 2008.

KLIBANOV, A. M. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. **Science**. v. 219 , n. 4585, p. 722-727, 1983.

KOCHHAR, A.; GUPTA A. K.; KAUR N. Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. **J. Sc. Food Agric.,** v. 79, p. 549–554, 1999.

KROGER M.; PRÜßE U.; VORLOP K.D.: A new approach for the production of 2,5-furandicarboxylic acid by in situ oxidation of 5-hydroxymethylfurfural starting from fructose. Topics in Catalysis. V. 13, p. 237–242. 2000.

LAVIE, A.; ALLEN, K. N.; PETSKO, G. A.; RINGE, D. X-ray Crystallographic Structures of D-Xylose Isomerase-Substrate Complexes Position the Substrate and Provide Evidence for Metal Movement during Catalysis. **Biochemistry.** v. 33, p. 5469-5480, 1994.

LEHMKUL, A. L. **Biorredução da 4-aminoacetofenona catalisada por células de Saccharomyces cerevisiae sp. em sistemas bifásicos.** 2006. 81 f.. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Fundação Universidade Regional de Blumenal, Blumenal, 2006.

LENARDÃO, E.J.; FEITAG, R. A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C .C. "Green Chemistry" – Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. **Química Nova.** v. 26, n. 1, p. 123 – 129, 2003.

LIANG, J. F.; LI, Y.T.; YANG, V. C. Biomedical application of immobilized enzymes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 89, p. 979–990, 2000.

LICHTENTHALER, F. W. Em Methods and Reagents for Green Chemistry: An Introduction; eds. Tundo, P.; Perosa, A.; Zecchini, F.; John Wiley & Sons. Inc., 2007, 23.

LOBANOK, A.G., SAPUNOVA L.I., DIKHTIEVSKI, Ya.O., KAZAKEVICH, I.O. Screening of glucose isomerase-producing microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 14, p. 259-262, 1998.

MOREAU, C.; DURAND, R.; ROUX, A.; TICHIT, D. Isomerization of glucose into fructose in the presence of cation-exchanged zeolites and hydrotalcites. **Applied Catalysis A: General**, v. 193, p. 257–264, 2000.

MOSBACH, K. Immobilized enzymes. **Trends in Biochemical Sciences** v. 5, p. 1-3, 1980.

Natake,M., S.Yoshimura. Studies on glucose isomerase of bacteria. Part III. The mode of action of glucose isomerase from Escherichia intermedia strain HN-500. **Agric. Biol.Chem.**, v. 28, p. 510-516, 1964.

Novozymes. **O que são enzimas.** Disponível em: <http://www.novozymes.com.br>. Acesso em: 10 de novembro de 2010.

PEREIRA Jr, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Séries em Biotecnologia:** Tecnologia de bioprocessos. 1. ed. Rio de Janeiro. 2008. 62 p.

Radar Comercial. **Valores Importados e Exportados.** Análises de Mercados e Produtos. Disponível em < http://radar.desenvolvimento.gov.br/ >. Acesso em 10 de agosto de 2010.

RASMUSSEN, H.; LACOUR, T.; NYBORG, J.; SCHULEIN, M. Structure Determination of Glucose-Isomerase from Streptomyces-Murinus at 2.6 Angstrom Resolution. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography,** 50, p. 124-131, 1994

RIBEIRO M.L.; SCHUCHARDT U. Cooperative effect of cobalt and silica in the catalytic cyclization and oxidation of fructose to FDCA. Catalysis Communications. V. 4, p. 83–86. 2003.

RICCA, E.; CALABRÒ, V.; CURCIO, S.; BASSO, A.; GARDOSSI, L.; IORIO, G. Fructose Production by Inulinase Covalently Immobilized on Sepabeads in Batch and Fluidized Bed Bioreactor. **Int. J. Mol. Sci.,** v.11, p. 1180-1189, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.: **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1. ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

ROMAN-LESHKOV, Y.; BARRETT, C. J.; LIU, Z. Y.; DUMESIC, J. A.: Production of dimethylfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates. **Nature.** v. 447, p. 982 – 986, 2007.

ROPER, VON H.; KOCH, H.; Starch-Starke 1988, 40, 121.

RUBIO, F. C.; ALAMEDA E. J.; TELLO, P. G.; GONZALEZ, G. L. A Comparative Study of the Activity of Free and Immobilized Enzymes and its Application to Glucose Isomerase. **Chemical Engineering Science**. v. 51, n. 17, p. 4159-4165, 1996.

SANT'ANNA Jr, G. L. Produção de Enzimas Micorbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1a ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 3, p. 351 – 354.

SILVA, A. T. C. R.: Estudo da Cristalização da Frutose em Diferentes Meios. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. 2010.

SILVA, F. M.; LACERDA, P.S.B.; JONES Jr, J. Desenvolvimento Sustentável e Química Verde. **Química Nova.** v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005

STRANDBERG, G. W., & SMILEY, K. L. Free and immobilized glucose isomerase from *Streptomyces phaechromogenes*. **Applied Microbiology**. v. 21, p. 588–593, 1971

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M.: Bioquímica. Guanabara Koogan S. A. 5a ed., p. 313. 2004.

Takasaki,Y., Tanabe, O. NAD-linked D-glucose isomerizing and D-mannose isomerizing enzyme from Paracolobacterium aerogenoides. **Agric.Biol.Chem.** v. 28, p. 740-741, 1964.

Takasaki,Y., Tanabe, O. Studies on isomerisation of sugars by bacteria. IX.NAD-linked D-glucose isomerizing and D-mannose isomerizing enzyme from Paracolobacterium aerogenoides. **Agric.Biol.Chem.** v. 30, p. 220-225, 1966.

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

TÜKEL, S.S; ALAGÖZ, D. Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose. **Food Chemistry**. v. 111, p. 658–662, 2008.

UNITED NATIONS: JOHANNESBURG SUMMIT 2002. Disponível em: <http://www.johannesburgsummit.org/>. Acesso em 20 de setembro de 2011.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Proteínas. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br>. Acesso em: 4 de novembro de 2010.

VALENTE, A. A.; LIMA, S.; DIAS, A. S.; LIN, Z.; BRANDÃO, P.; FERREIRA, P.; PILLINGER, M.; ROCHA, J.; CASILDA, V. C. Isomerization of D-glucose to D-fructose over metallosilicate solid bases. **Applied Catalysis A: General**, v. 339, p. 21–27, 2008.

VITOLO, M. Imobilização de Enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1a ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001a. v. 3, p. 391 – 404.

VITOLO, M. Imobilização de Enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1a ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001b. v. 2, p. 373 – 396.

YU, D.; WU, H.; ZHANG, A.; TIAN, L.; LIU, L.; WANG, C.; FAN, X. Microwave irradiation-assisted isomerization of glucose to fructose by immobilized glucose isomerase. **Process Biochemistry,** v. 46, p. 599-603, 2011.

ZHANG , Y., HIDAJAT , K., RAY, A. K. Modified reactive SMB for production of high concentrated fructose syrup by isomerization of glucose to fructose. **Biochemical Engineering Journal,** v. 35, p. 341–351, 2007.