

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM CINZAS DE CARVÃO SINTERIZADAS
PARA HIDROLISE DE SACAROSE: PROPRIEDADES E APLICAÇÃO EM
BIORREATORES**

Alessandro Victor Patrício de Albertini

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

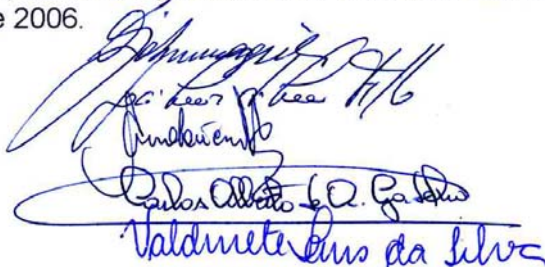
Co-orientadores: Prof. Dr. Cosme Rafael Salinas Martinez

Prof^ª. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife, fevereiro 2006.

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Alessandro Victor Patrício de Albertini**, realizada em 23 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:55 horas, do dia 23 de fevereiro de 2006, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação do mestrando **Alessandro Victor Patrício de Albertini**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, fez a apresentação do aluno, de seu orientador ele próprio, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Ele próprio, na qualidade de Presidente, do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, Valdinete Lins da Silva, do Depto. de Engenharia Química/UFPE, Carlos Alberto de Almeida Gadêlha, do Depto. de Biologia Molecular/UFPB e Ana Lúcia Figueiredo Porto, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Imobilização de Invertase em Carvão Mineral Sinterizado para Obtenção de Açúcar Invertido: Propriedade e Aplicação em Biorreatores"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação do mestrando, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao o Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadêlha que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Daí o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar o candidato. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovado com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 23 de fevereiro de 2006.



Handwritten signatures of the examiners and the secretary. The signatures are in blue ink. The names visible are: Valdinete Lins da Silva, Carlos Alberto de Almeida Gadêlha, and Ana Lúcia Figueiredo Porto. There is also a signature of the secretary, José Luiz de Lima Filho, at the top.

Albertini, Alessandro Victor Patrício de
Imobilização de invertase em cinzas de carvão
sintetizadas para hidrólise de sacarose: propriedades e
aplicações em biorreatores / Alessandro Victor Patrício de
Albertini Recife : O Autor, 2006.

42 folhas. il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Imobilização 2. Invertase 3. Cinzas de Carvão Mineral
4. Biorreatores. I. Título.

577.1

CDU (2.ed.)

UFPE

572

CDD (22.ed.)

CCB 022

**IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM CINZAS DE CARVÃO SINTERIZADAS
PARA HIDROLISE DE SACAROSE: PROPRIEDADES E APLICAÇÃO EM
BIORREATORES**

Alessandro Victor Patrício de Albertini

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

(Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE).

Prof^a. Dr^a. Valdinete Lins e Silva

(Departamento de Engenharia Química – DEQ/UFPE)

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

(Departamento de Bioquímica - UFPB)

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

Membros Suplementares
Interno)

Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva (Suplente –

(Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof. Giovani Rota Bertani (Suplente – Externo)

(Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE)

SUMÁRIO

	Páginas
Agradecimentos	i,ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução	3
1.1 Hidrólise enzimática	4
1.2 Imobilização e suas aplicações	5
1.3 Suportes para imobilização	6
1.4 O uso do vidro como suporte para imobilização	7
1.5 Suportes cerâmicos	8
1.6 Carvão mineral	8
1.7 Glutaraldeído como agente fixador de enzimas no suporte	10
1.8 Características dos suportes cerâmicos	11
1.9 Fatores que interferem na escolha do sistema de reação enzimático	12
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Justificativa	13
4 Referências bibliográficas	14
5 Paper	19
Abstract	20
Introduction	(1) 21
Experimental	(2) 22
Materials	(2.1) 22
Preparation of porous glass-ceramic support	(2.2) 23
Chemical composition and structural investigation of SCFA	(2.3) 24
Immobilization of invertase	(2.4) 24
Immobilized invertase quantification	(2.5) 24
Enzymatic activity assays	(2.6) 25
Bioreactors' design and continuous flow system	(2.7) 25
Kinetic parameters K_m and V_{max}	(2.8) 27
Results and discussion	(3) 27
Physical properties of the ceramic	(3.1) 27
Chemical components of coal fly ashes after the sinterization by XRF and SEM	(3.2) 28
Immobilization of invertase	(3.3) 29
Effect of temperature and pH on enzymatic activity	(3.4) 30
Kinetic parameters	(3.5) 31
Studies of flow sucrose solution in packed bed with invertase immobilized	(3.6) 31
Conclusions	(4) 33
Figures and tables	(5) 34
References	(6) 39
6 Conclusão da dissertação	42

Agradecimentos

Aos meus Pais, pelo respeito e incentivo aos estudos e escolha acadêmica e ao amor. Ao Luiz Gomes Correia de Arruda, meu tio avô e ídolo, devido sua influência em minha educação.

Ao Prof^o Dr. José Luiz de Lima Filho, pela sua orientação, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof^o Dr. Cosme Rafael Salinas, responsável pela minha vinda ao LIKA e que devo eterno agradecimento.

À Dra. Danyelly Bruneska, pela sua enorme paciência na co-orientação, e também na bela amizade.

Ao Professor Dr. Walter Mendes de Azevedo do Departamento de Química Fundamental (CCEN) por ceder seu laboratório para desenvolver os ensaios na mufla para a sinterização das pastilhas de cerâmica.

Ao colega Alexandre Libânio pela amizade a partir do comum trabalho realizado.

Aos Professores José Lins Rolim Filho e Júlio César de Sousa do Departamento de Engenharia de Minas pelas suas orientações nos experimentos às propriedades físicas da cerâmica.

Aos Professores do Ceará: Ricardo Santos; Válder Nogueira e Benildo Cavada pelo apoio e material cedido para o desenvolvimento da cerâmica.

Às Professoras Ana Lúcia Figueiredo Porto Maria do Carmo Pimentel, Luiz de Carvalho, Maria Tereza dos Santos Correia, Maria da Paz Carvalho da Silva, Nícácio, Eduardo Magalhães, Paulo Andrade pelo apoio inicial.

A Dras. Keila Moreira (em especial), Maria Taciana Cavalcante, Laura Bruno por toda ajuda nas orientações informais.

A fantástica ajuda do doutorando Fernando Teles nas correções do inglês.

Aos secretários do Departamento de Bioquímica: Miron, Neidinha e Djalma.

Às Secretárias: Ilma, Conceição e Isabel pelo profissionalismo e amizade.

Ao companheiro Moisés pelo profissionalismo, amizade e troca de idéias nos momentos de descontração como “as belas paisagens” do LIKA.

Aos vigilantes do Aggeu Magalhães: Maurício Gondim e João Alves pela simpatia e apoio ao sair à noite do LIKA nos dias de experimentos.

Aos técnicos do Setor de Microscopia Eletrônica: Rafael Padilha e Sérgio, respectivamente UFPE/LIKA e Aggeu Magalhães.

Ao ótimo profissional, Sr. Otaviano, por toda ajuda que disponibilizou em consertar os aparelhos para realização dos experimentos (ele é Macgayver mesmo).

Ao Oscar pela ajuda nos problemas com computadores do setor de biotecnologia.

Ao apoio de Dona Celeste e Cleide pela ajuda nos mais variados momentos.

Vera muito obrigado pela amizade e ser minha “secretária” de assuntos aleatórios.

Felipe, pela simpatia e mesmo que não ajudasse em algum conhecimento técnico, sempre tive tempo de ouvir qualquer pedido de ajuda.

À Central Analítica do Dep. Química Fundamental – CCEN.

Ao técnico Antônio Rodrigues de Brito e Francisco Carlos Alves Moura do Centro de Tecnologia e Geociências (Solos) pela assistência durante alguns ensaios de prensagem do material cerâmico.

Ao meu inesquecível colega de turma Braz Júnior, principalmente pela força dada nas apresentações de seminários. A Carolina, Eduardo e Sérgio, saudades nos estudos na salinha.

Aos meus inesquecíveis colegas de laboratório da biotecnologia: Daniela Viana, Giuliana Schirato, Tatiana, Paula Ferdinanda, Andréa Pacheco, Amanda, Fernanda Borba, Raquel, Michele Roberto, Mauro, Rivaldo, Pabyton, Edney, Marcelo Moura, Maíra, Eduardo, André Nunes, Lucas e Rafael. Jorge, Alessandra, Renata, Gabriela, Juliana (Biosensores), Eduardo Alécio, Ian Porto (Bioquímica), Conceição (Imunologia), Luiz e Fábio (Microscopia Eletrônica).

Ao camarada Roberto Lucena e Tadeu da P & T LTDA pelo apoio e incentivo.

À P & T LTDA pelo apoio ao Projeto Sacarose e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Lista de abreviaturas

MEV	microscópio eletrônico de varredura
SEM	scannig electronic microscope
K_m	Constante de Michaelis
$V_{\max}$	Velocidade máxima
M	Molar
Há	Hectare
Da	Dalton
PET	tereftalato de etileno
APTES	3-aminopropyltriethoxysilane
U/mg	Unidades por miligrama
RS	Rio Grande do Sul
PVA	Polyvinylalcohol
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Mm	Milímetro
MPa	Megapascal
SCFA	sinterizing coal fly ashes

Resumo

Suportes cerâmicos a partir de cinzas de carvão mineral foram desenvolvidos como matriz para imobilização de invertase. A obtenção de um suporte insolúvel com propriedades físico-químicas adequadas para imobilização de invertase em cinzas de carvão mineral é uma alternativa para diminuição da poluição ambiental proporcionada pelo seu armazenamento e disseminação através de usinas termoelétricas. Um importante fator relacionado a este processo é o desenvolvimento do setor açucareiro da região, devido à carência do mercado em produzir açúcar invertido através de biocatalizador imobilizado. Foram realizados experimentos para verificar a porosidade, absorção aquosa, densidade aparente e resistência mecânica do suporte. O suporte foi analisado morfológicamente e quimicamente em microscopia eletrônica de varredura e espectrofotometria de raios-X, respectivamente. O processo de imobilização da invertase foi iniciada com a silanização, modificação química com uma solução 2% 3-aminopropiltrietilhexano em tolueno, através da imobilização ligação covalente do grupo amina com carbonila do glutaraldeído e subsequente ligação covalente da molécula enzimática ao mesmo via base de Schiff. Os dados obtidos demonstraram uma retenção de proteína de 1,37 mg/0,25 g por partículas e 0,67 U /mg de proteína (19,89 %) em relação à atividade da enzima livre. O K_m aparente da invertase imobilizada foi aproximadamente 10 vezes menor que a livre. A inversão da sacarose foi de 100% em 16h de reação com injeção alternada do fluxo.

Palavras-chave: imobilização; invertase; cinzas de carvão mineral; biorreatores.

Abstract

Ceramic sinterized proceeding from coal fly ashes was used as a support for immobilization of invertase. The attainment of an insoluble support with chemical physical properties to bind invertase into sinterized coal fly ashes is an alternative to decrease environmental pollution with the storage and dissemination through thermal power plants. Of point view, it will be development of sugar market of region due absent invert sugar production from immobilized biocatalyst. The immobilization of enzyme was started with chemical modification of silane groups present with 2% 3-aminopropyltriethoxysilane solution in toluene, through covalent binding immobilization of the alkyl amine to glutaraldehyde and subsequent attachment of the enzyme molecule to glutaraldehyde via Schiff's base linkage. The protein amount and specific activity of the immobilized enzyme on 0.438 M sucrose (pH 5.0 at 45°C) were 1.37 mg/ 0.25g of particles and 0.67 U/mg protein (19.89 %) of that estimated for the free enzyme, respectively. The apparent K_m for immobilized invertase was approximately 10-fold lower than free enzyme. Moreover, the results in bioreactor the effect of continuous flow injection (inffluent, effluent and alternated) showed obtained 100% of sucrose inversion at 16h of reaction with alternated flow injection.

Key words: immobilization; invertase; ashes; bioreactors.

1. Introdução

Uma das atividades agrícolas mais importantes do Brasil é o cultivo da cana-de-açúcar, explorada desde 1532, atualmente, ocupa uma área de 5.415.090 ha do território brasileiro, com produção estimada em 436,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2005/2006, utilizando-se como matéria-prima na produção do álcool, açúcar, papel e energia elétrica (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB/2006). A sacarose (*O*- α -D-glicopiranosil – (1 $\rightarrow$ 2) β -D-fructofuranosídeo) é o dissacarídeo mais abundante da natureza sendo encontrado principalmente na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), planta pertencente à família das gramíneas (Nogueira *et al.*, 2005).

A sacarose possui relevância sócio-econômica e cultural pelo seu alto valor calórico, baixo preço e pela acentuada presença na alimentação regional. Em virtude da produção mundial de cana-de-açúcar está diretamente relacionada com a produção de açúcar, na qual encontra no açúcar da beterraba seu grande competidor mundial. Atualmente, os países da Comunidade Econômica Européia subsidiam fortemente a produção do açúcar da beterraba para atenuar os custos com as importações do açúcar da cana-de-açúcar produzido nos trópicos. O Brasil possui o primeiro lugar quanto à produção mundial de açúcar proveniente da cana de açúcar. Entretanto, há uma crescente demanda na obtenção de glicose e frutose a partir da hidrólise da sacarose para atender a indústria alimentícia e farmacêutica, devido a algumas vantagens proporcionadas pelo seu uso (Sanjay & Sugunan, 2005).

O açúcar invertido em solução líquida é largamente empregado na produção de alimentos devido à coloração desta solução não interferir no padrão de qualidade dos mesmos. É o caso das indústrias de panificação laticínio, bebida carbonatadas, sucos, recheios, licores, biscoitos, balas, chocolates (Cirpan *et al.*, 2003). Um de seus principais benefícios é a capacidade de redução da atividade da água, fator determinante no prazo de validade dos produtos. Outras vantagens podem ser citadas com relação a seu emprego, por evitar processos dispendiosos de diluição, armazenagem e transporte de açúcares sólidos, o que reduz custos de energia e minimiza a produção de dejetos industriais. O açúcar invertido possui 20% a mais de poder edulcorante em comparação à sacarose pura; apresenta alta afinidade com a água diminuindo o ponto de congelamento, propriedade útil para matéria prima de subprodutos para a conservação (Gratão *et al.*, 2004). Os produtos misturados (D-glucose e D-frutose) são vantajosos devido à possibilidade de baixa cristalização quando apresentados em maneira concentrada (Erginer *et al.*, 2000).

Entretanto, o procedimento mais utilizado para inversão da sacarose é o emprego da hidrólise ácida. Este processo resulta num produto com coloração escura, com alta quantidade de resíduos tóxicos (remanescente da hidrólise ácida), e de alto custo devido à adição de neutralizantes e clarificantes (Baratti & Ettalibi, 2001). O açúcar invertido pode ser obtido também através da hidrólise enzimática pelo processo de enzima e de células livres (figura 1). Estes procedimentos para hidrólise da sacarose têm sido estudados nas últimas décadas, numa incansável busca pelo aprimoramento de técnicas que se referem a aumentar o rendimento e a rapidez na obtenção de produtos em escala industrial (Martinez, 2000).

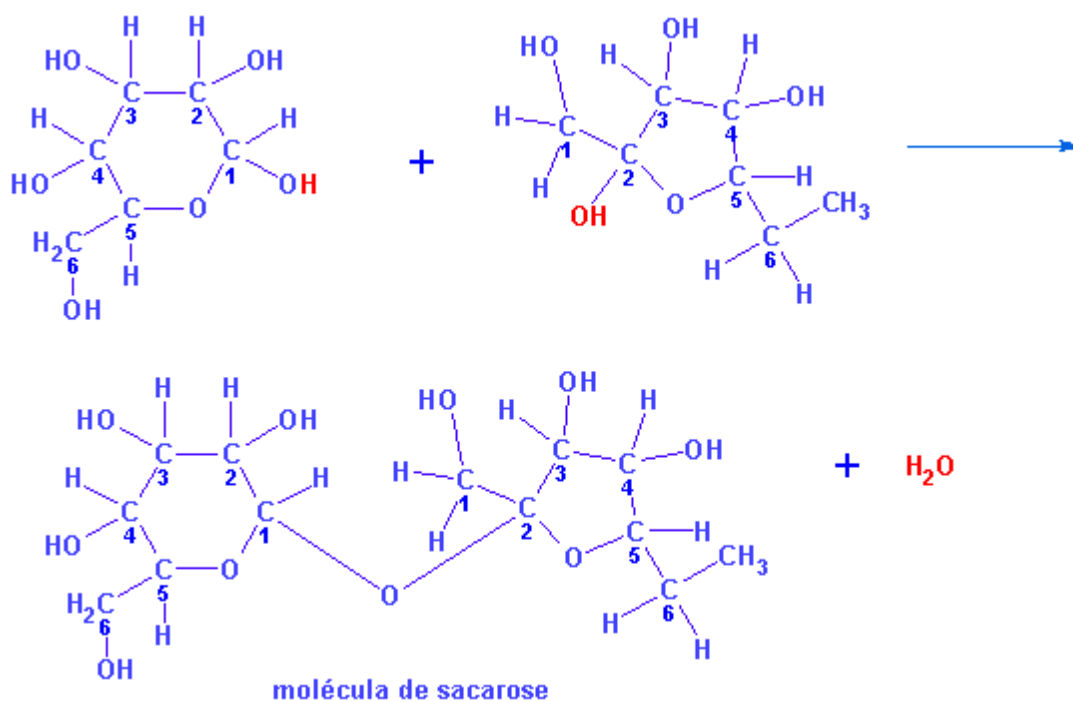


Figura 1. A sacarose é um dissacarídeo formado pelo hidrogênio do carbono 1 da α -glucose e o grupo OH do carbono 2 da β -furanose. Reação química da molécula de sacarose através de uma condensação da α -glucose e β -furanose com a perda de uma molécula de água.

1.1. Hidrólise enzimática da sacarose

A substituição da hidrólise ácida da sacarose pela enzimática pelo emprego enzima ou células livres é uma alternativa mais aceitável por não gerar resíduos tóxicos ao produto final

(Danisman *et al.*, 2004). No entanto, resíduos protéicos associados a esta alternativa de hidrólise podem ser restritivos quanto à aplicação desses açúcares obtidos na formulação e na qualidade dos alimentos. O emprego de células pode acarretar ainda, um baixo rendimento de açúcares, pois estes podem ser metabolizados pelas células até a formação de álcool (Voet, 2002).

No processo de hidrólise enzimática, há uma perda do material biocatalítico que esta dissolvida na solução final de açúcar invertido. Para Erginer *et al.* (2000), a utilização de técnicas que possibilitem a imobilização do biocatalizador em suporte fixo, permite o reuso em novos processos, e que proporcionem a obtenção de soluções de açúcar invertido de melhor qualidade. Considera-se também como vantagem a automação do processo para escala industrial, a reação em biorreatores de fluxo contínuo.

É sabido, que a atividade catalítica das enzimas livres é superior do que as células livres em contato com a solução de sacarose, por isso, há anos vêm sendo aprimoradas técnicas para a imobilização da invertase (β -frutofuranosidase frutohidrolase – E.C. 3.2.1.2.6.), que é específica para hidrolisar a sacarose (Sanjay & Sugunan, 2005). A invertase é específica à catálise da sacarose convertendo-a em D-glucose e D-frutose. É considerada uma glicoproteína que contém em torno de 50% de carboidratos e possui um peso molecular de 270.000 Da (Tanriseven & Doğan, 2001).

1.2. Imobilização e suas aplicações

A imobilização de enzimas em suportes insolúveis torna-se a maneira mais eficaz, viável e econômica para produção de açúcares redutores em escala industrial, devido à estabilidade conformacional obtida e uso continuado das enzimas e conseqüentemente a redução significativa de contaminantes nos produtos finais (Sanjay & Sugunan, 2005).

As enzimas são imobilizadas de acordo com a estrutura química do suporte. Os métodos de imobilização de enzimas mais usados são: adsorção; ligação covalente (Limbut *et al.*, 2004, Sanjay & Sugunan, 2005) e covalente cruzada (Mateo *et al.*, 2000, Emregul *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2005); troca aniônica (Godbole *et al.*, 1990) e enclausuramento (Tanriseven & Dogan, 2001, Bagal *et al.*, 2006). A imobilização de enzimas através de ligação covalente tem mostrado ser freqüentemente resistente à ação mecânica, a altas temperaturas, a desnaturação por íons metálicos e, a ação de solventes orgânicos. (Chen *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2000; Kovalenko *et al.*, 2002). E

também, estende-se ao melhoramento nas condições do sistema, a natureza da enzima, tipo de suporte e os elementos químicos a serem escolhidos para a imobilização (Hasain & Saleemudidin, 1998).

A vantagem a ser ressaltada na imobilização covalente é a combinação de propriedades biocatalíticas únicas das enzimas com a possibilidade de ser reusadas várias vezes em reator com fluxo contínuo ou em batelada. Na produção em escala industrial, o emprego das enzimas imobilizadas é indiscutivelmente justificado pelo fator de redução dos custos operacionais no processo (Farag & Hassan, 2004).

Um grande número de enzimas imobilizadas, em vários suportes, tem sido usado em aplicações práticas como produção de biomateriais, biossensores, biosseparadores, entre outros. A imobilização covalente das enzimas se torna viável, quando o suporte contém os grupos funcionais de ligação relevantes. Uma série de grupos funcionais que podem ser usadas em imobilização covalente das enzimas são: o amino, hidroxil, carbonil, carboxil e os fenólicos. A estrutura física e química dos suportes pode também influenciar o microambiente das espécies imobilizadas e conseqüentemente nas suas propriedades bioquímicas (Chen *et al.*, 2000).

A principal aplicação de enzima imobilizada é na indústria alimentícia, especificamente com a produção de xarope de frutose pelo uso de glucose oxidase e da glicose isomerase imobilizada e, na indústria farmacêutica com a produção do ácido 6-amino penicilina pelo uso da penicilina-acilase imobilizada. Enzimas imobilizadas em biossensores têm sido amplamente usadas para análises na indústria de fermentação e no monitoramento/diagnoses clínicas. Biossensores para glucose e sacarose têm sido usados para análises de alimento. A vantagem é principalmente a estabilidade conferida a enzima pelo processo de imobilização devido minimização da desnaturação (Bayramoğlu *et al.*, 2003).

1.3. Suportes para imobilização

A maioria dos suportes orgânicos usados para imobilização de biocatalizadores é à base de celulose (Sankpal *et al.* 2001); algodão (Godbole *et al.* 1990); quitosana (Gómez *et al.*, 2000; Farag & Hassan, 2004); lectina (Ahmad *et al.* 2001); biopolímeros (Bagal *et al.* 2006). Diante do número de alternativas disponíveis para imobilização, todavia, há o risco eminente de

contaminação dos produtos obtidos nos processos de biotransformação pela degradação e/ou erosão mecânica desses suportes (Hasain & Saleemudidin, 1998; Godbole, *et al.*, 1990; Kovalenko *et al.*, 2002).

Neste sentido, pesquisas estão sendo direcionadas para o emprego de suportes inorgânicos, que vem mostrando maior eficiência em termo custo/benefício. Alguns exemplos desses suportes para imobilização são também referenciados: copolímeros (Erginer *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000, Cirpan *et al.*, 2003); polivinil-álcool (Akgöl *et al.*, 2001); sílica-gel (Park *et al.*, 2002, Limbut *et al.*, 2004); vitreocerâmico (Ida *et al.*, 2000, Kovalenko *et al.*, 2002, Magnan *et al.*, 2004); epoxi (Mateo *et al.*, 2000), vidro poroso e não poroso (Ikediobi *et al.*, 1997); minerais que apresentem resistência mecânica e grupos após tratamento ou não para processo de imobilização como resíduo da construção civil, termoeletrica (carvão mineral), materiais recicláveis, como vidro e PET - tereftalato de etileno (Amaral *et al.*, 2006) Park *et al.*, (2002), podem ser uma alternativa sócio-econômico viável.

1.4. O uso do vidro como suporte para imobilização

O vidro é um sólido amorfo com ausência completa de ordem e periodicidade, exibindo uma região de transição vítrea. Entretanto, quaisquer materiais inorgânicos ou metais formados, que possam exibir um fenômeno de transição, é considerado vidro (Gupta *et al.* 1996). Vale salientar que este composto após sinterizado, precisa conter o dióxido de silício (SiO_2) para ser silanizado. Na indústria, reações enzimáticas maximizadas em pH ácido ou alcalino são frequentemente mais vantajosas que em pH na região neutra, devido ao controle microbiológico que estas condições oferecem. Por outro lado, alguns autores afirmam que, a atividade catalítica das enzimas imobilizadas num composto a base de SiO_2 é comprometida rapidamente, porque o vidro (SiO_2) é instável tanto em soluções ácidas como em alcalinas. Nesse sentido, melhoramentos relacionados à estabilidade do suporte e, conseqüentemente na atividade enzimática, têm sido apresentados em estudos com revestimentos ou enriquecimento da formulação do vidro com materiais duráveis. Ainda é digno de nota, mencionar que em aplicações industriais os materiais inorgânicos para suportes enzimáticos são atrativos por serem resistentes à esterilização, com altas temperaturas e pressão e à abrasão mecânica (Suzuki *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de suportes cerâmico a partir da sinterização do SiO₂ com outros materiais duráveis, como cinzas resultantes da queima do carvão mineral, é uma tecnologia que possibilita a geração de materiais com maior valor agregado quanto à aplicação industrial. Esta tecnologia por sua vez, pode contribuir com a diminuição dos problemas ambientais associados à deposição de matérias residuais de certas indústrias (termoelétricas), e aos mesmos, reduzir os custos em termos de matérias primas necessárias ao processo de formulação de suportes convencionais (Kniess *et al.*, 2002).

1.5. Suportes cerâmicos

A cerâmica apresenta vantagens tais como: resistência ao ataque de produtos químicos, resistências à tração, compressão e dureza. Outra vantagem de utilizar suporte cerâmico para imobilização de enzimas é a disponibilidade de matéria prima na natureza, que ainda podem ser recicladas a partir dos resíduos, como construção civil e geração de energia (carvão mineral). Esses últimos são resíduos que podem se acumular e poluir drasticamente o meio ambiente. Desta forma, o estudo e confecção de um suporte insolúvel cerâmico oriundo de resíduos, totalmente reciclável e resistente a contaminações por microrganismos, podem contribuir para a diminuição da poluição com o auxílio na aquisição de suporte de alto valor agregado (Suzuki *et al.*, 1991; Ida *et al.*, 2000; Cimdins *et al.*, 2000).

1.6. Carvão mineral

O carvão é uma complexa e variada mistura de componentes orgânicos sólidos, fossilizados ao longo de milhões de anos, como ocorre com todos os combustíveis fósseis. Sua qualidade, determinada pelo conteúdo de carbono, varia de acordo com o tipo e o estágio dos componentes orgânicos. A turfa, de baixo conteúdo carbonífero, constitui um dos primeiros estágios do carvão, com teor de carbono na ordem de 45%; o linhito apresenta um índice que varia de 60% a 75%; o carvão betuminoso (hulha), mais utilizado como combustível, contém cerca de 75% a 85% de carbono, e o mais puro dos carvões; o antracito apresenta um conteúdo carbonífero superior a 90%. Da mesma forma, os depósitos variam de camadas relativamente simples e

próximas da superfície do solo e, portanto, de fácil extração e baixo custo, a complexas e profundas camadas, de difícil extração e custos elevados. Supõe-se a qualidade do teor de minerais variam de acordo com a vegetação que havia na região das minas. Em termos de participação na matriz energética mundial, segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica (2003), o carvão é atualmente responsável por cerca de 7,9% de todo o consumo mundial de energia e de 39,1% de toda a energia elétrica gerada. No âmbito mundial, apesar dos graves impactos sobre o meio ambiente, o carvão ainda é uma importante fonte de energia. As principais razões para isso são as seguintes: i) abundância das reservas; ii) distribuição geográfica das reservas; iii) baixos custos e estabilidade nos preços, relativamente a outros combustíveis.

No Brasil, as principais reservas de carvão mineral estão localizadas no Sul do País, notadamente no Estado do Rio Grande do Sul detém mais de 90% das reservas nacionais. No final de 2002, as reservas nacionais de carvão giravam em torno de 12 bilhões de toneladas, o que corresponde a mais de 50% das reservas sul-americanas e a 1,2% das reservas mundiais. No entanto, segundo o Balanço Energético Nacional (2003), o uso energético do carvão mineral ainda é bastante restrito, representando apenas 6,6% da matriz energética brasileira. Entre outras restrições, os altos teores de cinza e enxofre (da ordem de 50% e 2,5%, respectivamente) são os principais responsáveis pelo baixo índice de aproveitamento do carvão no Brasil. Espera-se, porém, que o desenvolvimento de tecnologias de remoção de impurezas e de combustão eficiente, como descrito no próximo item, proporcione maiores índices de aproveitamento desse recurso.

Ano a ano usinas termoeletricas são construídas no mundo para satisfazer o aumento da demanda das necessidades de energia. A combustão do carvão mineral apresenta rejeitos denominados cinzas volantes, produzido pelas usinas termoeletricas em enormes quantidades, casando problemas ambientais significativos. A China consome atualmente em torno de 305 milhões de toneladas de carvão, perfazendo 86 milhões de toneladas de resíduos devido à combustão (Peng *et al.*, 2004).

A reciclagem dos subprodutos e resíduos provenientes da construção representa um problema urgente para o futuro da humanidade. Dois maiores subprodutos são as cinzas volantes de carvão mineral e resíduo de boro silicato que são produzidos em amostras significantes. Entre os dois, atualmente, apenas pequena porcentagem de cinzas é utilizada, permanecendo disposta diretamente no ambiente, o que constitui uma má solução para ambos os pontos de vista ecológico

e econômico. Conseqüentemente, há a necessidade de estabelecer processos apropriados e eficientes ao reuso desses resíduos (Olgun *et al.*, 2005).

1.7. Glutaraldeído como agente fixador de enzimas no suporte

O glutaraldeído é empregado como agente fixador na preservação dos tecidos e das estruturas subcelulares nos estudos de microscopia. Também é empregado como agente esterilizante em material cirúrgico, entre outros. Atualmente, o glutaraldeído vem sendo usado como ativador da superfície de eletrodos para a imobilização de enzimas na aquisição de biossensores, tanto em ligação covalente (Sugunan & Sanjay, 2005) como covalente-cruzada (Ikediobi *et al.*, 1997; Magnan *et al.*, 2004). Na indústria de processamento de alimentos o glutaraldeído é recomendado, na imobilização de enzimas, em virtude da sua elevada polimerização e baixas concentrações usadas para possibilitar a obtenção de alimentos transformados com baixas concentrações residuais do glutaraldeído (Suzuki *et al.*, 1991).

O glutaraldeído (1,5 pentanedial – PM 100,12), em altas concentrações (superior a 25%) e sob condições ácidas, pode se apresentar em polímeros de múltiplas estruturas cíclicas hidratadas. Após as diluições em soluções aquosas, estes polímeros podem reverter-se à forma monomérica, devido a sua facilidade de hidratação. O glutaraldeído já vem sendo utilizado na imobilização de lactase, o que propicia sua utilização para outras enzimas. Além deste, podem ser usados para produtos alimentares: triacetato de celulose; dietilaminoetil celulose; polietileimina e 1,2 dicloroetano (Cimdins *et al.*, 2000).

O processo de imobilização de proteínas mais comumente usado em suporte contendo SiO₂ envolve três etapas. O processo dá-se pela reação de silanização da superfície do vidro com o APTES em sistema não aquoso (tolueno ou acetona), seguida, pela ligação de um grupo carbonil do glutaraldeído com o grupo amínico da superfície silanizada (ligação alquilamina, base de Schiff) e pela ancoragem das proteínas através das ligações covalentes entre os grupos aminicos dos resíduos de aminoácidos e o grupo carbonila disponível do glutaraldeído (Suzuki *et al.*, 1991, Walt & Agayn, 1994).

1.8. Características dos suportes cerâmicos

A estratégia para um bom desempenho de inversão da sacarose vem sendo fundamentada principalmente em aspectos físico-químicos do suporte para emprego em biorreatores. A porosidade do suporte é um aspecto físico de maior importância por determinar a área de superfície disponível para ser explorada. A ativação dessa superfície, do ponto de vista químico, deve proporcionar maior eficiência de ligação do componente desejado por aumentar a estabilidade por proteger através de processo intermolecular (proteólises, agregação) e a interação da enzima com a interface externa (ar; oxigênio; solventes orgânicos imiscíveis; etc) (Mateo *et al.*, 2000). Ambas as áreas de superfície e capacidade de ligações maximizadas são motivos de pesquisa na obtenção de métodos de imobilização mais apropriados.

Todavia, o efeito do fluxo em contato com o biocatalisador imobilizado pode influenciar significativamente a reação no biorreator, ou seja, tempo de residência (Kovalenko *et al.*, 2002).

Suportes inorgânicos para imobilização que tenham características mais competitivas e viáveis como a durabilidade e resistência mecânica (Villora *et al.*, 2004), podem ser usados em biorreatores em sistema de fluxo contínuo para favorecer um melhor desempenho da atividade enzimática (Azevedo *et al.*, 2004). Com isso, em suporte poroso e com alta retenção (absorção) são obviamente minimizadas as deficiências à difusão das limitações de substrato em contato internamente no suporte o que propicia uma maior área de superfície com o biocatalizador imobilizado.

O efeito da temperatura e da concentração do substrato em relação a estabilidade da atividade catalítica são variáveis bastantes significativas em relação ao custo de energia gasto (Akgöl *et al.*, 2001). Segundo Combes (1981), a atividade catalítica fica comprometida devido às concentrações de sacarose elevadas. O efeito na concentração de sacarose na reação de inversão é limitante à estrutura à associação molecular apresentadas em soluções aquosas em pequenas concentrações. A reação de inversão de sacarose é um consumidor de molécula de H₂O. Entretanto, deve-se observar uma estratégia nas condições operacionais em biorreator como temperatura e concentração de sacarose de acordo com o interesse de uso industrial.

Testes de resistividade e dureza do suporte também devem ser realizados para verificar sua resistência mecânica diante de seu uso contínuo com relação à temperatura e velocidades de fluxos (Kovalenko *et al.*, 2002).

1.9. Fatores que interferem na escolha do sistema de reação enzimático

A escolha do sistema a ser usado implicará vários fatores, tais como: proteína a ser imobilizada; tipo de ligação (covalente; adsorção; torça iônica; etc.); forma/densidade/porosidade do suporte; fluxo contínuo (Bayramoğlu, 2003) ou descontínuo (Martinez - US Patent 6,013,491/2000); em batelada (Sanjay & Sugunan, 2005); tamanho do reator; volume do substrato em relação ao biocatalizador imobilizado.

Estudos são propostos em relação ao “design” dos reatores e a porosidade do suporte pode influenciar significativamente no desempenho para a obtenção de produtos proveniente de catalises enzimáticas. Em suporte inorgânico, a imobilização de enzimas é de grande interesse devido sua durabilidade e alta resistência mecânica para usar em diversos “packed bed” ou “fluidized bed” e relativamente custo baixo (Stefuca *et al.*, 1988; Azevedo *et al.*, 2004).

A imobilização de enzimas em torno de membrana cerâmicas ou superfície filme oferece várias vantagens nos exemplares do suportes quando operado em sistema contínuo, tais como baixa pressão da vazão, pequeno tempo de residência e estabilidade operacional com baixas resistências difusionais externa e interna (Bayramoğlu *et al.*, 2003).

O tipo de imobilização (ligação por encapsulação), a interação com difusão pode levar a ruptura da membrana, se houver rápido acúmulo do produto e o biocatalizador imobilizado pode apresentar uma densidade razoavelmente similar aquela da solução, levando conseqüentemente a problemas na configuração do biorreator, dinâmica de fluido (Bicherstaff, 1997). Na ligação covalente cruzada, os agregados formados geralmente possuem uma natureza do tipo gelatina, o que impede seu uso em reatores tudo tipo “*packed bed*”, com isso, a atividade alcançada é limitada a problemas difusionais, uma vez que os biocatalizadores estão situados dentro do agregado, dificultando o acesso do substrato (Faber *et al.*, 1997). O tamanho do suporte e porosidade em relação a limitações difusionais são características muito importantes na reação enzimática em biorreatores (Chen *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 2004).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um suporte cerâmico para imobilização de invertase para hidrólise da sacarose em D-glucose e D-frutose e uso em biorreatores.

2.2. Objetivos específicos

Preparar um suporte cerâmico resistente e poroso;

Analisar as propriedades físico-químicas e morfológicas da cerâmica;

Avaliar as propriedades físico-químicas e cinéticas da invertase livre e imobilizada;

Analisar os resultados visando determinar a melhor condição do processo visando à utilização do biocatalizador em escala industrial.

3. Justificativa

Técnicas de imobilização de enzimas há muitos anos vêm sendo aprimoradas, sobretudo em invertase. Entretanto, os altos custos dos insumos para reação em escala industrial ainda não foram verificados. Desta forma, a obtenção de um suporte insolúvel através sinterização a partir de cinzas de carvão mineral é uma alternativa para diminuição da poluição ambiental proporcionada pelo seu armazenamento e disseminação através de usinas termoeletricas. Com isso, teremos um suporte com propriedades físico-químicas resistentes e viáveis para imobilização de invertase e, sobretudo com a aquisição de um açúcar invertido livre de contaminantes químicos ou orgânicos é importante à indústria alimentícia, farmacêutica e de bebidas. Esta proposta é estrategicamente importante para nosso país, considerado maior produtor mundial de sacarose proveniente da cana-de-açúcar (estimativas em 2004/2005 – Instituto Brasileiro Geográfico e Estatístico), uma vez que deverá permitir a produção tanto do açúcar invertido como dos subprodutos puros (D-glucose e D-frutose).

4. Referências bibliográficas

1. Ahamad, S.; Anwar, A.; Saleemuddin, M. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin. *Bioresource Technology*, 2001, **79** 121-127.
2. Akgöl, S.; Kaçar Y.; Denizli, A. and Arica, M.Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*, 2001, **74** 281-288.
3. Amaral, I. P. G.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Carvalho Júnior, L. B.; Bezerra R. S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, 2006, Article in press.
4. Azevedo, A.M.; Cabral, J.M.S.; Gibson, T.D.; Fonseca, L.P. Operation and performance of analytical packed-bed reactors with an immobilised alcohol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **28** 45-53.
5. Baratti, J.C. and Ettalibi, M. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **28** 596-601. Limbut, W., Thavarungkul, P.; Kanatharana, P.; Asawatreratanakul, P.; Limsakul, C.; Wongkittisuksa, B. Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver[®] for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, **19** 813-821.
6. Bagal, D.; Karve, M. S. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose–guar gum biopolymer membrane. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **555** 316–321.
7. Bayramoğlu, G.; Akgöl, S.; M.Y.; Bulut, A.; Denizli, A. and Arica M.Y. Covalent Immobilisation of Invertase onto Reative Film composed of 2-hydroxyethyl Methacrylate and Glycidyl Merthacrylate: Properties and Application in a Continuos Flow System. *Biochemical Enginnering Journal*, 2003, **14** 117-126.
8. Bickerrstaff, G.F. Immobilization of enzymes and cells. *Methods in biotechnology*, 1997, **1** 1-11.
9. Carmona, N.; Garc'ya-Heras, M.; Gilc; C.; Villegas, M.A. Chemical degradation of glasses under simulated marine medium. *Materials Chemistry and Physics*, 2005, **94** 92–102.

10. Chen, Y.; Kang, E. T.; Neoh, K.G. and Tan K.L. Covalent immobilization of invertase onto the surface modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. *European Polymer Journal*, 2000, **36** 2095-2103.
11. Cimdins, R. Rozenstrauba; Berzina, L.; Bossert, J. and Bucker, M. Glassceramic obtained from industrial waste. *Resources Conservation & Recycling*, 2000, **29** 285-290.
12. Cirpan, A.; Alkan, S.; Toppare, L.; Hepuzer, Y.; Yagci, Y. Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate. *Bioelectrochemistry*, 2003, **59** 29-33.
13. Combes, D.; Monsan, P.; Moathlouth, M. Enzymatic hydrolysis of sucrose. *Carbohydrate Research*, 1981, **93** 312 – 316.
14. Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, Empresa Pública Federal vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2006.
15. Danisman, T.; Tan, S.; Kacar, Y.; Ergene, A. Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver[®] for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductmetric biosensor system. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, **19** 813-821.
16. Erginer, R., Toppare, L., Alkan S., Bakir, U. Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. *Reactive & Functional Polymers*, 2000, **45** 227-233.
17. Emregul, E.; Sungur, S; Akbulut, U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization *Food Chemistry*; 2005, Article in press.
18. Faber, K. Biotransformation in organic chemistry: a textbook. 3rd. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 402p.
19. Farag, A. M.; and Hassan, M. A . Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microbial Technology*, 2004, **34** 85-93.
20. Godbole, S.S.; Kubal, B.S. and D'Souza, S.F. Hydrolysis of concentrated sucrose syrups by invertase immobilized on anion exchanger waste cotton thread. *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, **12** 214-217.
21. Gómez, L.; Ramírez, H. L.; Villalonga, M. L.; Hernández, J.; Villalonga, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **38** 22–27.

22. Grato, A.C.A.; Berto, M. I.; Silveira Júnior, V. Reologia do açúcar líquido invertido: influência da temperatura na viscosidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2004, **24** 652-656.
23. Gupta T. C. Revisão sobre composição do vidro. *Química Nova* (1996)
24. Husain. S.; Jafri F. and Saleemuddin, M. Effects of chemical modification on the stability of invertase before and after immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **18** 275-280.
25. Ida, Jun-ichi; Matsuyama, T. and Yamamoto, H. Surface modification of a ceramic membrane by the SPCP-CVD method suitable for enzyme immobilization. *Journal of Electrostatics*, 2000, **29** 71-82.
26. Ikediobi, C.O.; Stevens. M.; Latinwo, L. Immobilization of linamarase on non-porous glass beads. *Process Biochemistry*, 1998, **33** 491-494.
27. Kleczkowski L.A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. *Plant Physiology*, 2004, **134** 912-918.
28. Kovalenko, G.A .; Komova, O.V.; Simakov, A .V. Khomov, V.V and Rudina, N.A. Macrostructured carbonized ceramics as adsorbents for immobilization of glucoamylase. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2002, 182-183, 73-80.
29. Kniess, C.T.; Kuhnen, C. N. e Riella, H. Gracher. Estudo do efeito da quantidade de óxido de ferro em cinzas pesadas de carvão mineral na obtenção de vitrocerâmicos. *Química Nova*, 2002, **25** 926-930.
30. Magnan, E.; Catarino, I.; Paolucci-Jeanjean. Preziosi-Belloy, L. and Belleville, M.P. *Journal of Membrane Science*, 2004, **241** 161-166.
31. Martinez, L. 10808 Lake Gardens, B, Dallas, Tex. 75218. US Patent 6,013,491 (2000).
32. Mateo, C.; Albani. O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated support by favouring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **26** 509-515.
33. Nogueira, E. M.; Olivares, F. L.; Japiassu, J. C.; Vilar, C.; Vinagre, F.; Baldani, J. I.; Hemerly, A. S. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. *Plant Science*, 2005, **169** 819-832.

34. Olgun. A.; Erdogan, Y.; Ayhan, Y.; Zeybek, B. Development of ceramic tiles from coal fly ash and tincal ore waste. *Ceramics International* 31 (2005) 153–158
35. Park, S. W.; Choi, S.Y.; Chung, K.H.; Hong, S. I. and Kim, S.W. Characteristics of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel through silanization. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, **11** 87-93.
36. Tanriseven, A.; Doğan, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 2002, **36** 1081-1083.
37. Sankpal, N. V.; Joshi A. P.; Kulkarni, B. D. Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: influence of morphology and fermenter conditions on productivity. *Process Biochemistry*, 2001, **36** 1129–1139.
38. Sanjay, G; Sugunan, S. Invertase Immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. *Catalysis Communications*, 2005, **6** 81-86.
39. Sowokinos J. R; Vigdorovich V. and Abrahamsen M. Molecular cloning and sequence variation of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNAs from potatoes sensitive and resistant to cold sweetening. *Journal of Plant Physiology*, 2004, **161** 947-955.
40. Stefuca, V.; Gemeiner, P.; Bales V. Study of cellulose beads as an enzyme carrier via simple mathematical models for the hydrolysis of saccharose using immobilized invertase reactors. *Enzyme Microb. Technol.*, 1988, **10** 306 – 311.
41. Suzuki, T.; Toriyama, M.; Hosono, H. and Yoshihiro Abe. Application of a Microporous Glass-Ceramics with a Skeleton of $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ to Carriers for Immobilization of Enzymes –; *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, **72** 384-391.
42. Villora, J.M.; Callejas, P.; Barba, M.F. and Baudín. Statistical analysis of the fracture behaviour of porous ceramic rasching rings. *Journal of European Ceramic Society*, 2004, **24** 589-594.
43. Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. *Fundamentos de bioquímica*. Artmed Editora Porto Alegre, 2002.
44. Weber, G.; Strivay, D.; Martinot, L.; Garnir, H.P. Use of PIXE–PIGE under variable incident angle for ancient glass corrosion measurements. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2002, **189** 350–357.

45. Walt, D.R. and Agayn, I. V. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. Trends Analytical Chemistry, 1994, **13** 10.

5. Paper

Immobilization of invertase into sinterized coal fly ashes for hydrolysis of sucrose: stability, properties and application in bioreactors

Albertini, A.V.P.¹; Reis, A.L.S.¹; Teles F.R.R.¹; Souza, J.C.²; Rolim Filho, J.L.²; Martins D. B. G.¹; ²Salinas, C.R.M.³; Nogueira, V.⁴; Cavada, B.S.⁴; LIMA Filho, J.L.¹.

1. Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Universidade Federal de Pernambuco.
2. Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
3. Departamento de Biofísica, Universidade Federal da Paraíba.
4. Universidade Federal do Ceará

Author's address E-mail: alessandro.albertini@gmail.com

Este trabalho será submetido à revista "Process Biochemistry"

Immobilization of invertase into sinterized coal fly ashes for hydrolysis of sucrose: stability, properties and application in bioreactors

Albertini, A.V.P.¹; Reis, A.L.S.¹; Teles F.R.R.¹; Souza, J.C.²; Rolim Filho, J.L.²; Martins D. B. G.¹; ²Salinas, C.R.M.³; Nogueira, V.⁴; Cavada, B.S.⁴; LIMA Filho, J.L.¹.

5. Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami Universidade Federal de Pernambuco.

6. Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

7. Departamento de Biofísica, Universidade Federal da Paraíba.

8. Universidade Federal do Ceará

Author's address E-mail: alessandro.albertini@gmail.com

Abstract

Ceramic sinterized proceeding from coal fly ashes was used as a support for immobilization of invertase. The attainment of an insoluble support with chemical physical properties to bind invertase into sinterized coal fly ashes is an alternative to decrease environmental pollution with the storage and dissemination through thermal power plants. Of point view, it will be development of sugar market of region due absent invert sugar production from immobilized biocatalyst. The immobilization of enzyme was started with chemical modification of silane groups present with 2% 3-aminopropyltriethoxysilane solution in toluene, through covalent binding immobilization of the alkyl amine to glutaraldehyde and subsequent attachment of the enzyme molecule to glutaraldehyde via Schiff's base linkage. The protein amount and specific activity of the immobilized enzyme on 0.438 M sucrose (pH 5.0 at 45°C) were 1.37 mg/ 0.25g of particles and 0.67 U/mg protein (19.89 %) of that estimated for the free enzyme, respectively. The apparent K_m for immobilized invertase was approximately 10-fold lower than free enzyme. Moreover, the results in bioreactor the effect of continuous flow injection (inffluent, effluent and alternated) showed obtained 100% of sucrose inversion at 16h of reaction with alternated flow injection.

Key words: immobilization; invertase; ashes; bioreactors.

1. Introduction

Invertase (β -fructofuranosidase; E.C. 3.2.1.26) is specific for hydrolysis sucrose into D-glucose and D-fructose. Invertase is a glycoprotein molecular weight 270.000 Da. The hydrolyzed sugar mixture obtained by invertase presents the advantages of being colourless in contrast to the coloured products obtained by acid hydrolysis (Akgöl *et al.*, 2001; Tanriseven & Doğan, 2001; Bayramoğlu *et al.*, 2003; Danisman *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006). Immobilized enzymes are preferred over soluble enzymes owing to their ability for multiple and repetitive use, as well as easier purification of final products. Immobilization of enzymes onto insoluble supports has been reported in many studies due to their wide application in industrial processes. The main application of immobilized enzymes is in food and the pharmaceutical industries. They can be successfully immobilized in a large number of supports without losing their activity (Bayramoğlu *et al.*, 2003; Farag & Hassan, 2004; Sanjay & Sugunan, 2005).

Immobilization of enzymes in inorganic support materials is very attractive owing to the possibility of sterilization, stability under operational pressure, stability in organic solvents and high mechanical resistance (Sanjay & Sugunan 2005). The main immobilization methods for enzymes include entrapment (Bagal *et al.* 2006), adsorption (Kovalenco *et al.*, 2002), anion exchanger (Godbole *et al.*, 1990), cross-linker (Mateo *et al.*, 2000) and covalent binding (Limbut *et al.*, 2004). The physical structure and chemical composition of the support can influence the microenvironment of the immobilized enzyme and consequently its biological properties (Bayramoğlu *et al.*, 2003; Danisman *et al.*, 2004).

The presence of SiO₂ is important for silanization of glass, posterior covalent binding of the alkyl amine to glutaraldehyde and subsequent attachment of the enzyme to glutaraldehyde via Schiff's base linkage. The glass has environmental features such as relative humidity, concentration of salts, presence of pollutant gases, degree of acidity or alkalinity, temperature and presence of microorganisms. Those are some factors can lead to surface alteration of glasses and their conservation (Weber *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005). Some improvements in durability have been reported, including glass coating with durable materials, like civil building residues (Cimdins *et al.*, 2000; Kniess *et al.*, 2002) and coal fly ashes (Villora *et al.*, 2004). SiO₂ is stabilized an outer protection (Suzuki *et al.*, 1991). The chemical composition of coal fly ashes makes it quite suitable for use as the raw material for structural glass-ceramics, which are mainly CaO-Al₂O₃-SiO₂ (CAS) system glass-ceramics (Peng *et al.*, 2004) being favourable to the system immobilization of enzymes. Due to environmental aspects, inorganic substance residues for

enzyme immobilization have great interest because of their durability, and high mechanical strength for usage in packed-bed or fluidized-bed bioreactors, relatively low cost. It is important to study physical properties as porosity (Kovalenco *et al.*, 2002), aqueous adsorption and mechanical resistance of the samples of porous glass ceramic. The improvement of the pore size can be important for efficient immobilization of the enzyme and its activity, facilitating the bioconversion in industrial processes in bioreactors. Chen *et al.* (2002) found out that the support porosity has a significant influence in kinetic parameters and with optimization of bioreactor size (Gómez *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2004; Limbut *et al.*, 2004). In addition, the process of enzyme immobilization can affect the stability, optimum pH and temperature, K_m and V_{max} (Akgöl *et al.*, 2001).

In the present work, sinterizing coal fly ashes were studied to obtain a competitive support in experiments about physical proprieties and resistance mechanic to immobilize invertase. The derivative immobilized was characterized, its activity retention, catalytic properties, reusability and a particular attention being paid to the effect of the enzyme activity in bioreactors and flow system were determined.

2. Experimental

2.1. Materials

Bakers yeast invertase (Novozymes), Glutaraldehyde from Nuclear (BR), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) were purchased from Sigma–Aldrich Chemicals Pvt. Ltd (USA). Glass bead 50 - 100 μ m was purchased POLYSSCIENCES, INC (USA). Sucrose, glucose, polyvinylalcohol (PVA) and carboxymethyl-cellulose from VETEC (BR). All other chemicals were of the highest purity commercially available. For comparison, the porous glass-ceramic supports were made with two mineral samples as clay originated from sugarcane plantation and coal ashes from Candiota Power Station, at RS State – Brazil.

2.2. Preparation of porous glass-ceramic support

Concerning the additives, glass beads were used in order to generate a high density of linkages to invertase; PVA was employed as an aggregating agent and carboxymethyl-cellulose was used to form porous structures. On the other hand, clay was used also as a ceramic inorganic support for immobilization so that its results could be compared with those obtained with coal fly ash. Different mixtures of the ceramic supports with the additives green bodies were tested, aiming to maximize apparent density, apparent porosity, apparent aqueous adsorption and mechanical resistance. The mixtures tested are indicated in table 1, where C_0 and A_0 were used as controls and C_2 was further subjected to uniaxial pressure (1 ton). Mixture were homogenized in distilled water and put into a plaster mould of 6 mm diameter and 5.5 mm length (extrusion). The green bodies were dried at 70°C overnight and sinterized afterwards at 1100°C for 3h in electric furnace (QUIMIS, Q318M), being the heating and cooling rate of 6 °C/min. The sintering temperature was chosen from previous studies (results not shown) since, at that temperature, the highest mechanical resistance was registered. Bulk apparent specific density, porosity and aqueous absorption of the sintered specimens were measured by Archimedes's method in distilled water at 20°C (ABNT 12.766). The apparent porosity is razing between humid weights less dry under humid weight less submersed weight; the apparent aqueous absorption is razing between humid weight under dry weight. With the purpose of evaluating the mechanical resistance of the mixtures, they were subjected to a uniaxial pressure between 2.13 to 21.28 MPa, using twenty units of C_1 (5g) all together at 0.77mm/min (Ronald TOP Ltda uniaxial – 1 and 10ton). All the subsequent studies were performed only with the mixture C_1 , from now on denominated SCFA (sinterizing coal fly ashes).

Table 1 - Mixtures test to form the green bodies (%).

Sample		Composition				
C_0	coal fly ash	100	-	-	-	-
C_1 (SCFA)	coal fly ash	65	glass beads	25	PVA	10
C_2	coal fly ash	65	glass beads	25	PVA	10
C_3	coal fly ash	65	-	-	carboxymethyl-cellulose	10
A_0	clay	100	-	-	-	-
A_1	clay	65	glass beads	25	PVA	10
A_2	clay	65	glass beads	25	carboxymethyl-cellulose	10

2.3. Chemical composition and structural investigation of SCFA

The ceramic samples were pulverized in mortar porcelain and posterior resulting powder was weighted and sintered at 1000°C for two hour for determination lost on ignition. Another portion of the powder was pressed at 25 ton. a disc mould of 30 mm diameter. Then the samples were analyzed qualitatively and quantitatively by X-ray fluorescence spectroscopy (XRF -Rigaku, model RIX 3000), to search for the constituent chemical elements in coal fly ashes and in the support. To study ceramic's morphology were put on carbon adhesive, to be perfectly fixed in the metallor (Fine Coat – Ion Sputter JFC- 1100), and sprayed with gold. After, they were visualized in the scanning electronic microscope (SEM - Jeol, JSM 5.600 LV, Scanning Electron).

2.4. Immobilization of invertase

Clean support (SCFA) was derivative external and internal surface with organosilane. Adding 1g of clean support material to 19.6 ml toluene and to 0.4 ml of 2% (v/v) 3-aminopropyltriethoxysilane. The mixture was then incubated, at 85°C, in a water bath shaker for 6h. The support was finally washed with distilled water and dried at 100°C for 1h.

The next step was enzyme binding to alkylamine support material for its activation by glutaraldehyde to yield aldehyde groups. This was performed by adding 0.25 g of the alkylamine support material into 1 ml of 2% (v/v) glutaraldehyde in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with stirring for 24h at 4°C. During this time, the colour of the support changed to orange-red. It was washed ten times with same buffer cited above. To immobilize the enzyme 7.17 mg of protein (655 U) was dissolved in 1 ml of 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 per 0.25g of activated support materials. The immobilization was undergone for 36h at 4°C with stirring. The immobilized biocatalyst was stored in 0.1M sodium citrate buffer pH 4.5 at 5°C.

2.5. Immobilized invertase quantification

The protein amounts in the enzyme and washing solutions were determined as described by Bradford (1976). The amount of bound enzyme was calculated by the general formula: $q = ((C_i - C_f) \cdot V) / W$, where q is the amount of glass-bound enzyme contained in ceramic (mg g^{-1}), C_i and C_f are respectively, the initial and final concentrations of the enzyme in the reaction medium (mg

ml⁻¹), V is the volume of the reaction medium (ml) and W is the weight of the ceramic (g). All experiments were done in duplicated.

2.6. Enzymatic activity assays

The activities of both free and immobilized invertase preparations were determined by measuring the amount of reducing sugars liberated from the invertase-catalyzed hydrolysis of sucrose per time unit. To determine the activity of free and immobilized enzyme, 0.438 M sucrose solution in 5ml, 0.1M sodium citrate buffer pH 4.5. After that, biocatalysts were incubated in triplicate period (20 min. at 50°C) in a water bath under agitation. The activities of the free and immobilized invertase were expressed in units of enzymatic activity, one unit (1 U) is the amount of enzyme required to hydrolyze 1mM sucrose per minute under the assay conditions. One sample of derivative immobilized was used to out carry of experiments (triplicate) with 0.73 M sucrose solution, pH 4.5 at 50°C. To stop the reaction, aliquots withdrawn from the reaction medium were kept at -20°C. At the end of process, the reaction medium was discarded and the ceramic support was stored in 0.1 M sodium citrate buffer pH 4.5. Sucrose hydrolysis by the free and immobilized preparations was determined by the DNS method, thus measuring the reducing sugars content according to the method described Summers (1924). The activity assays were carried out over the pH range of 3.0 - 9.0. The buffer used for various pH ranges were sodium citrate (pH 3.0 – 6.0) and sodium phosphate (pH 7.0 – 9.0) at 25°C and temperature range of 25 - 85°C, in order to determine the pH and the temperature profiles of the free and the immobilized enzyme. In complement of information, the experiments were out carrier in bath with 5mL of 0.73 M sucrose solution. The effects of pH, temperature and multiple uses over the activity of reactor-immobilized invertase were evaluated and are exhibited in the normalized form, being assigned 100% activity to the highest value of each set.

2.7. Bioreactors' design and continuous flow system

In complement study, it was used to determinate of activity of immobilization enzyme in a continuous flow packed bed reactor in two glass columns with different sizes were tested: one with 62 length and 3 cm diameter and 14cm length and 7 cm diameter, respectively bioreactor 1 and 2 with 400 sample of derivative immobilized. The activity of immobilization enzyme it was

also experimented in bath and the better performance of bioreactor. With the goal of achieving the highest catalytic activity of immobilized invertase, a continuous flow system apparatus was built-up; was composed by the ceramic-immobilized invertase packed inside glass column with recirculation (with a peristaltic pump Watson-Marlow, Falmouth, Cornwall, TR11 4RU) from and to a vessel containing the sucrose solution of with 0.438 M in sodium citrate buffer pH 4.5. Moreover, influx used by the top bioreactor and by the bottom at four different flow speeds: 0.12, 0.18, 0.24 and 0.3 L h⁻¹. The effect of recirculation conditions was also studied by employing three different schemes: influent; effluent and alternated recirculation (Figure 1). These experiments were performed (schemes 1; 2 and 3) in bioreactor 1 with a flow speed of 0.18 L h⁻¹ and 0.438 M sucrose in 0.1 M sodium citrate buffer pH 5.0. The scheme 3 (both flow – influent and effluent), was modified at each time to analyze sugar reducing (data not shown). In all the assays, aliquots of the substrate-containing vessel were periodically withdrawn and assayed for enzymatic activity.

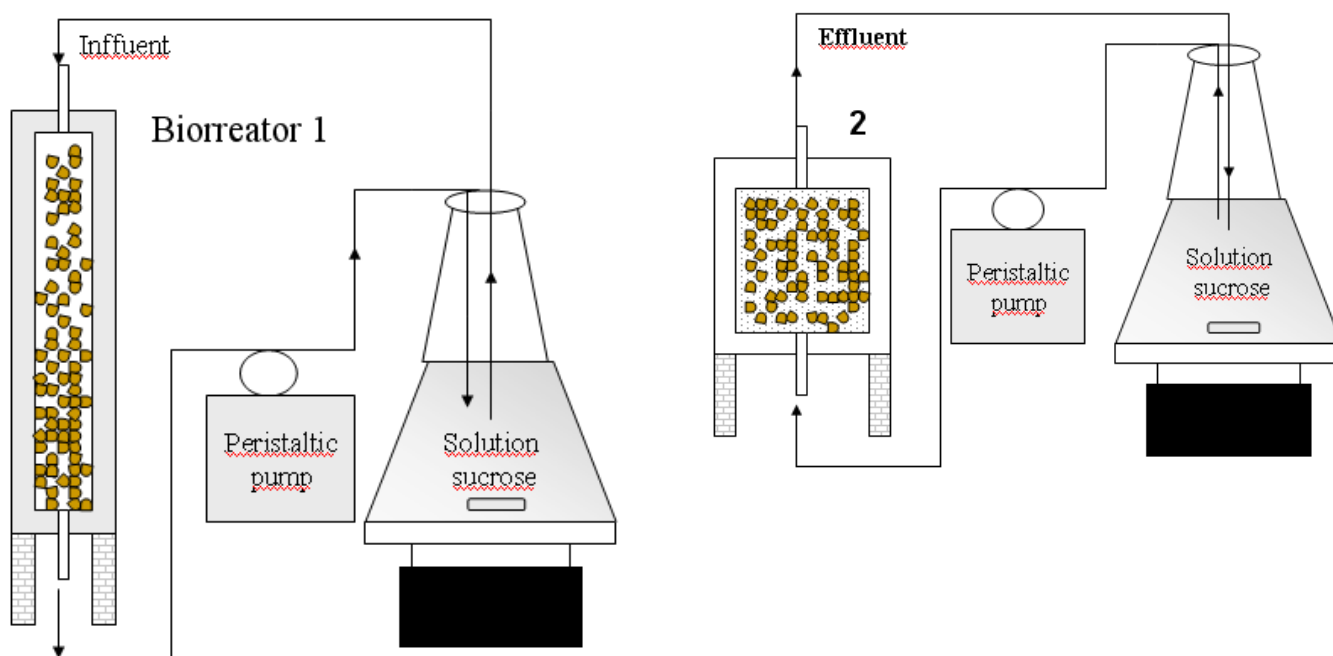


Figure 1. The packed bed and recirculation used. Biorreactor 1 and 2 with 62 length and 3 cm diameter and 14cm length and 7 cm diameter, respectively.

2.8. Kinetic parameters K_m and V_{max}

K_m and V_{max} for the free enzyme were determined by measuring the initial rates of sucrose hydrolysis (29 – 584 mM) in 0.1 M sodium citrate buffer under optima pH and temperature conditions. The kinetic parameters of immobilized invertase were determined in a batch system by changing sucrose concentrations.

3. Results and discussion

3.1 Physical properties of the ceramic

Mixtures of both coal fly ashes and sinterized clay with the previous additives were compared in relation to apparent porosity; aqueous absorption; mechanic resistance and specific surface area. The results are summarized in Table 2. Ceramics with coal fly ashes showed, in general, better apparent porosity than ceramics with clay. Concerning the apparent aqueous adsorption, C_1 and C_0 exhibited the highest values, despite the feasible mechanic resistance of C_0 . This may be due to the absence of PVA, as a linking reagent, in its composition. Nevertheless, A_1 also demonstrated indicative results in relation of apparent porosity and aqueous adsorption due its addition. The physical and chemistry proprieties of clay are lower dimensions after sinterization (Cindins *et al.*, 2000). Moreover, C_2 showed great mechanical resistance and porosity, probably because this sample was pressed uniaxially before sinterization. Both parameters cited may be an indicator to examine of resistance mechanic after sinterization as it was found in works previously pressed ceramic samples (Villora *et al.*, 2004). In addition, sets of 20 capsules of SCFA (5g) were subjected to different uniaxial rupture tensions. After discarding the debris, the total weight of intact of intact capsules was measured and results were expressed as a fraction of the initial of each set (Figure 3). In 8.51 MPa the ceramic presented around 60% fraction of the initial weight. This can be acceptable (a more fractured sample results in higher losses of enzyme after decantation and possible obstruction of the injection channels with the resulting debris), we way state that the results thus obtained allow the use of this sample in a typical industrial-scale bioreactor.

3.2. Chemical components of coal fly ashes after the sinterization by XRF and SEM

The chemistry properties in coal fly ashes and SCFA are summarized and the results were calculated to percentage to enclose others elements obtained for lost on ignition in Table 3. The results found to major component to both form were SiO_2 , FeO_3 and Al_2O_3 in relation to the CAS ($\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$) as cited in others works (Peng, *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005). In addition, all chemistry component found were, in except to light component (H, He Li, Be, B, C, N and O). Some particularity to sinterization can be verified minor composition of CaO and MgO to promote increase the formation of amorphous and semicrystallized materials. The considerable percentage (18.9%) of FeO_3 presented in coal fly ashes can influence the sinterization of material in presence of crystallization or nucleation and resistance mechanic of material formatted and the ceramic's color to brown (Kniess *et al.*, 2002). The samples of SiO_2 through of spheres in coal fly ashes after sinterization was increase around 2.9%. However Usually, coal fly ashes contained the ions cited, after temperature and time ($1100^\circ\text{C} - 3\text{h}$) may format products as bustamit, wollastonite, albite, anorhite, feldspar, etc (Kim, 2004). In addition, sinterizing coal fly ashes can influence in the high mechanic resistance.

SEM photos (Figure 1) illustrate the different surfaces morphology of coal fly ashes added glass beads for extrusion (A) and pressed firstly sinterization (B). The ceramic obtained for extraction clay, too added glass beads. The results show that there is a structural difference due the press green bodies to influence a good resistance mechanic counterpart decrease the aqueous absorption. The ruptures in glass due temperature used, is favorable more binding of enzymes in in SiO_2 (C). According to ABNT, clay is compost comprises for colloidal particle with diameter lower than 0.005mm comprehended a plasticity high when amide state and without necessity of PVA and press in green bodies of clay (D).

Component	Coal fly ashes (Wt%)	Support (SCFA)Wt%
SiO ₂	55.3	58.2
Al ₂ O ₃	15.1	10.2
FeO ₃	18.9	16.2
K ₂ O	4.2	3.2
CaO	2.8	7.5
TiO ₂	1.7	1.4
SO ₃	0.1	0.1
P ₂ O ₅	1.0	1.1
MgO	0.2	0.4
SrO	0.1	0.1
Others	0.5	0.4
Lost on ignition	0.04	0.2
Total	100.14	100.0

Table 3. Chemical proprieties of sinterizing coal fly ashes and support in by XRF.

3.3. Immobilization of invertase

The elaboration of methods for immobilization of enzyme is conceived as one the most important experiments. Considering this, initial experiments were tested concentrations of APTES with same solvents. After, it was tested APTES concentration in relation glutaraldehyde and enzyme to bind ceramic (data not shown). Efficient immobilization of this enzyme was achieved under conditions in which the silanization reaction was carried out in a non-aqueous medium (toluene) and the cross-linking bifunctional reagent, glutaraldehyde, used at the level of 2% (Figure 2). Analysis of the wash solutions showed that the immobilization process was irreversible. The enzyme loading was 1.37 mg (0.67 U/mg) per 0.25g of support. This amount of small bond can be partially attributed to an incomplete glutaraldehyde activation of amino groups in support, through diffusion limitations during the activation step (Azevedo *et al.*, 2004). Other works showed good results in invetase immobilized as Sanjay & Sugunan (2005) using montmorillonite with 10mg per 1g of support, Amaya-Delgado *et al.* (2005) using on nylon-6 microbeads was 4.95mg per 1g of support and Akgöl *et al.*, (2001) using the magnetic PVAL microspheres was 7.18 mg g⁻¹ support.

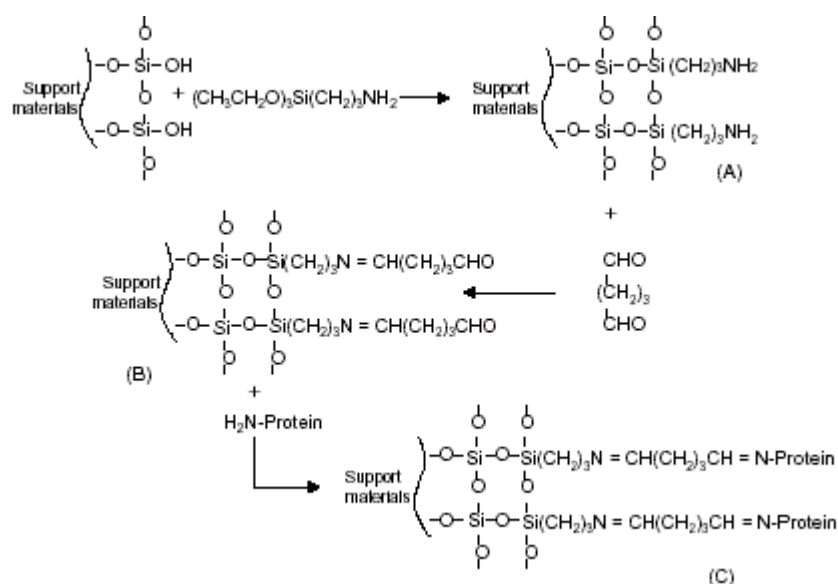


Figure 2. They are general pan of the three-step immobilization process, which consists of (A) silanization of glass surface (contained into ceramic); (B) cross-linking reaction with bifunctional glutaraldehyde e (C) finally covalent binding of invertase to the carbonyl group of glutaraldehyde via a Schiff's base linkage. Source: Limbut *et al.*, 2004.

3.4. Effect of temperature and pH on enzymatic activity

Proteins may be very unstable when exposed to environmental conditions significantly different from those found in physiological condition. The effect of temperature situation on the catalytic activity of free and immobilized invertase was studied in 0.1 M sodium citrate buffer pH 4.5 over the temperature range of 20-85°C. As presented in Figure 3.A, the resultant curve shows maximum activity at 45°C for both free and immobilized invertase. However, the activity of immobilized invertase showed a strong temperature dependence at temperatures below and decrease of its activity after the optima temperature. Additionally, the activity of the free invertase showed a more critical temperature dependence at temperature above the optimal temperature. Some authors observed a dependence of temperature in the activity of immobilized invertase due to the changing physical and chemical properties of the enzyme when covalent bound into inorganic supports (Chen *et al.*, 2000; Akgöl *et al.*, 2001; Danisman *et al.*, 2004). As cited by Bayramoğlu *et al.*, 2003, the immobilization via amino groups could not be prejudicial the conformational flexibility of enzyme and their proper organization for the binding to substrate and imminent cause natural of denaturation due temperature employed.

Often enzymes are assayed at their optimal pH for appreciable rate of reaction to take pace. The effect of pH over the activity of both free and immobilized invertase was evaluated in the range of 3.0 – 9.0 (Figure 3.B). A resulting curve was obtained, with the optimum value for free

and immobilized invertase at pH 5.0. This result supports the evidence that system of immobilization was not so prejudicial to enzyme. The pH dependent activity profile for immobilized invertase is broadened (pH 4.0 to 6.0). Thus, expansion is possibly due to the stabilization of invertase molecules as consequence of multipoint linkages of the enzyme molecules on the surface of the ceramic due to the process of immobilization (Chen *et al.* 2000).

3.5. Kinetic parameters

Kinetic parameters of the enzymatic reaction can be estimated by the direct linear method of Lineweaver–Burk plot of the initial sucrose hydrolysis rates from experimental data. The plot gives two straight lines which conform to the Michaelis-Menten equation for the reaction. The apparent Michaelis constants K_m and V_{max} for free invertase were 11.6 mM and 676.9 U mg⁻¹. The apparent Michaelis constants K_m and V_{max} for free invertase were 1.1mM and 114.28 U mg⁻¹. The apparent K_m for immobilized invertase was approximately 10-fold lower than free enzyme (Figure 4). For sucrose hydrolysis with the immobilized enzyme-ceramic, K_m and V_{max} values were significantly increased and reduced, respectively. However, K_m and V_{max} values of the free and immobilized invertase for sucrose are in the same order magnitude. This indicates that the catalytic function of invertase was not very much impaired by this immobilized method. Amaya-Delgado *et al.*, 2005 using nylon-6 microbeads showed K_m 1.2-fold higher than V_{max} values of immobilized invertase were obtained results like to free invertase. The formation of enzyme-substrate complex is more difficult with the immobilized invertase due to the porous structure of the support (Selampinar *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2002). Alternatively, the ceramic's irregular porosity increase great contact enzyme-substrate complex. In present, the complex becomes easier leading to an increased affinity for substrate and consequently a low K_m value in comparison with other works (Akgöl *et al.*, 2001; Tanriseven & Doğan, 2001; Gómez *et al.*, 2006; Sanjay & Sugunan 2005).

3.6. Studies of flow sucrose solution in packed bed with invertase immobilized

The results between bath and continuous flow system, showed 84 and 76 % reusability for 20 reuses for the enzymatic reaction in bath and continuous flow system, respectively (Figure 5). The result of bath was superior than continuous flow packed bed system, which could be due to efficient penetration of sucrose for the agitation conversion presented bath systems, being superior

to 80% of activity after 10 cycles using 0.73 M sucrose solution. Sanjay & Sugunan (2005), Akgöl *et al.* (2001) and Amaya-Delgado *et al.*, (2005) obtained good results in bath. The first at 100% reusability for 10 cycles, thus the enzymatic activity was tested around 1mL of 0.29 M sucrose solution and assay temperature at 30°C. The second also, retained enzyme activity after immobilization on the magnetic PVAL microspheres was 74%, thus the enzymatic activity was tested around 10 mL of 0.3 M sucrose solution, pH 5.5 and assay temperature at 35°C. The last however, invertase immobilized on nylon-6 microbeads was decrease of activity enzymatic with 0.3 M sucrose solution pH 5.5, and assay temperature at 50°C.

The purpose comparing the effect of flow rate over invertase activity between bioreactor and formats, it was the quantification of sucrose hydrolysis within the flow rate range of 0.12-0.3 L h⁻¹ performed with both formats. As showed in Figure 6, the best results were obtained at 0.18 L h⁻¹ with both bioreactors. The enzyme into the porous structure does not apparently take part on the reaction, meaning that the substrate is only converted to small extent on the surface of the support. However, the value of activity was higher for bioreactor 1 due probably the higher-pressure entering sucrose in lower diameter. In complement, the fractional inversion of sucrose was relatively larger at long residence time as a more efficient internal mass transfer in system. The phenomena observed are compatible with results obtained by Azevedo *et al.* (2004).

The stability operational to obtain the better activity in relation of sucrose concentration and temperature deserves attention special in futures studies. After 20 reuses there was lost enzymatic activity for the inactivation of invertase due to the natural factors as protein denaturation, oxidation, temperature, etc. As mentioned before, an incomplete glutaraldehyde activation of the amino groups in support can be prejudicial to the system of immobilization. The results were good in relation to same works because the experiments are made in low sucrose concentration to make easier the reaction of invertase. In this experiment was performed in 0.73 M of sucrose solution for minor cost in scale-industrial (Figure 6 – 7). However, a decrease in inversion at higher flow rate occurred probably due to an insufficient residence time.

For economical purposes, for large-scale production of a desired product, it is usually preferable to implement bio catalytic systems operating with continuous flow. A major recurrent handicap in these systems, however, is the low operational stability of immobilized enzymes. The rate of substrate conversion was measured up to a reaction time of 72h by using 0.438 M sucrose in 0.1 M sodium citrate buffer pH 5.0. The operational temperature of 25°C was roughly chosen below the optimum temperature for activity because the stability of invertase is presumably higher

in these conditions (Husain & Saleemuddin, 1998; Bayramoğlu *et al.*, 2003). The results are presented in Figure 7, at 16 hour the immobilized enzyme-ceramic system inverted 100% of sucrose in alternating flow. This can be explicated for the diffusional resistance and inhibition by co-products or inefficiency internal distributions sucrose solution and in the bioreactor through other flow system.

4. Conclusions

This study shows that ceramic's coal fly ashes can be used successfully for the immobilization of invertase as concluded by the kinetic parameters. Usually, small particles are used for enzyme immobilization because of their high immobilization area, but in bioreactors with good system injection sucrose solution, porosity and non-small particles show is sufficient for large-scale applications.

5. Figures and tables

Support	Apparent porosity (%)	Apparent aqueous absorption (%)	Apparent density (g/m ³)	Tension (MPa)	Specific surface area (m ² /g)
C ₀	27.5	19.7	128.7	2.6	0.0112
C ₁ (SCFA)	32.1	23.9	113.1	8.3	0.0111
C ₂	26.5	14.3	130.1	12.3	0.0194
C ₃	32.0	17.0	88.6	3.4	0.0131
A ₀	14.6	6.7	150.6	4.0	0.0140
A ₁	25.1	13.2	107.3	5.3	0.0103
A ₂	18.4	10.7	127.2	4.9	0.0140

Table 2 - Physical proprieties of ceramics after sinterization - apparent density, apparent porosity, apparent aqueous adsorption and mechanical resistance were measured by Archimedes's method in distilled water at 20°C ABNT-12.766.

Coal fly ashes		SCFA	
Component	Wt%	Component	Wt%
SiO ₂	55.3	SiO ₂	58.2
Al ₂ O ₃	15.1	Al ₂ O ₃	10.2
CaO	2.8	CaO	7.5
FeO ₃	18.9	FeO ₃	16.2
TiO ₂	1.7	TiO ₂	1.4
K ₂ O	4.2	K ₂ O	3.2
SO ₃	0.1	SO ₃	0.1
P ₂ O ₅	1.0	P ₂ O ₅	1.1
MgO	0.2	MgO	0.4
SrO	0.1	SrO	0.1
Others	0.5	Others	0.4
Lost on ignition	0.04	Lost on ignition	0.2
Total	100.14	Total	100.0

Table 3. Chemical proprieties of sinterizing coal fly ashes and support in by XRF.

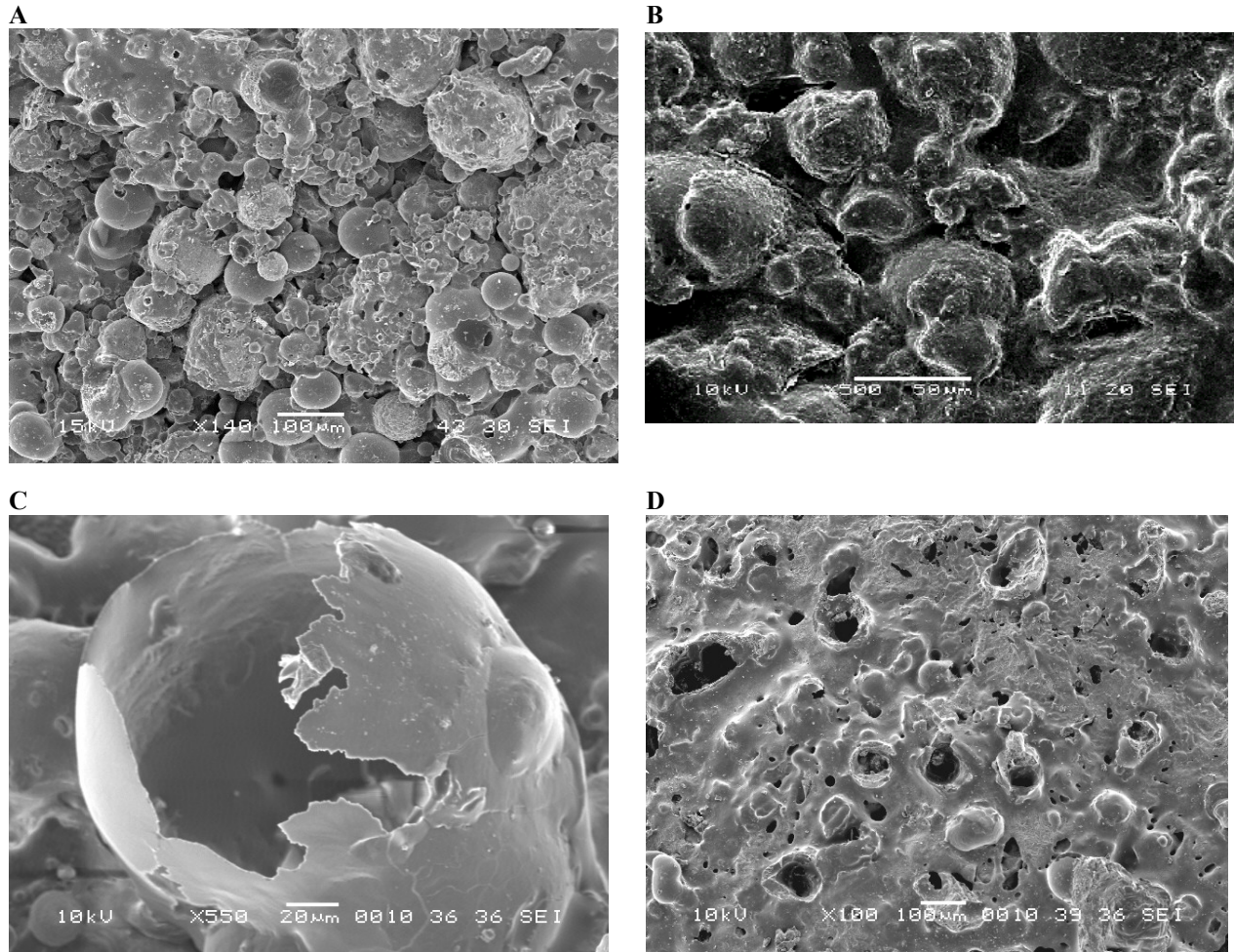


Figure 1. SEM images showing the ceramic's surface morphology of coal fly ashes firstly for extrusion (A-C), coal fly ashes subjected to uniaxial pressure - 1 ton. (B) and clay (D). All samples sinterized by 1100°C 3h.

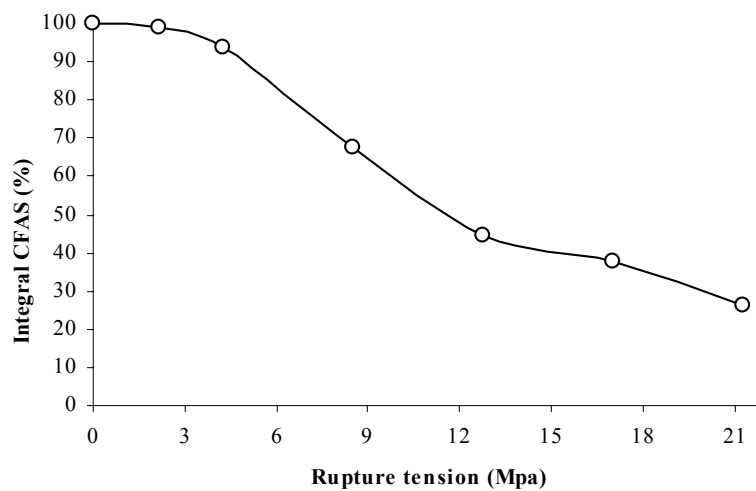
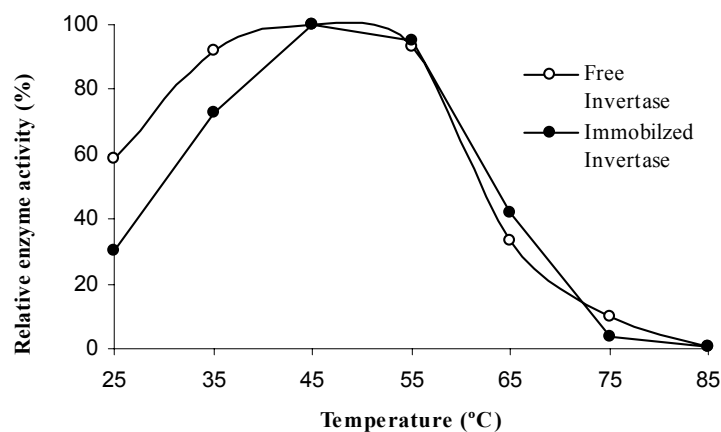


Figure 2. Effect of tension to study the mechanic resistance of ceramic in the deformation rate at 0.77 mm/min

A



B

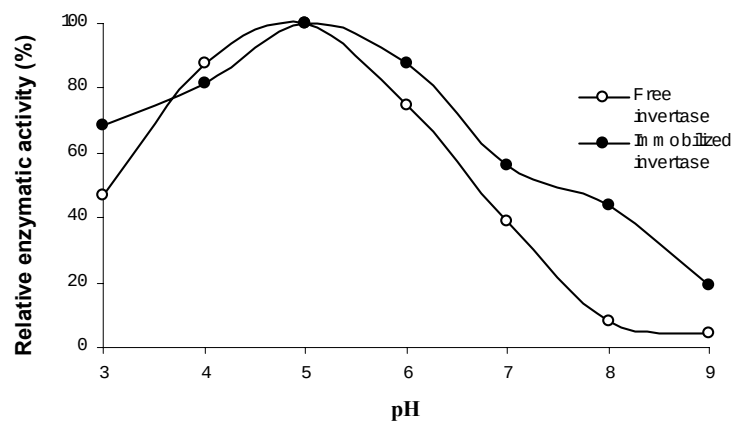


Figure 3. pH and temperature profiles of free and immobilized invertase. Free and immobilized enzymes were incubated in appropriate buffer (0.1 M). The buffer used for various pH ranges were sodium citrate (pH 3.0 – 6.0) and sodium phosphate (pH 7.0 – 9.0) at 25°C and temperature range of 25 - 85°C . The experiments were performed at 0.73 M sucrose solution (5mL) in bath.

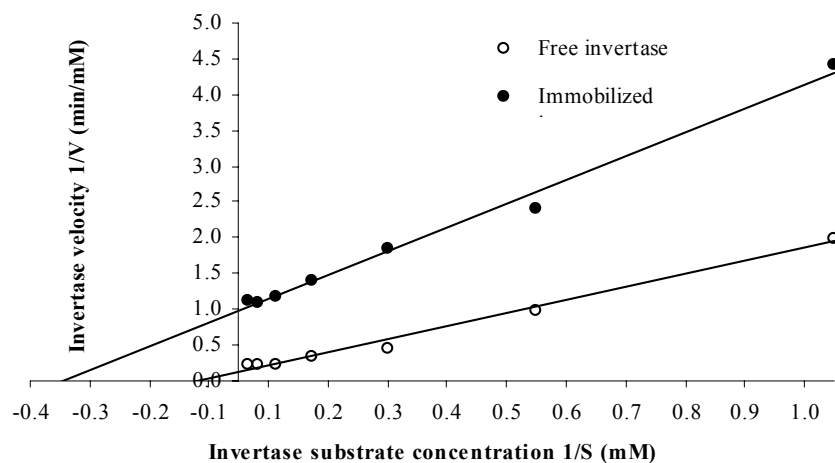


Figure 4. Lineweaver-Burk plots of the free and immobilized invertase. The experiments were performed at pH 5.0 using 5mL of sucrose solution in bath.

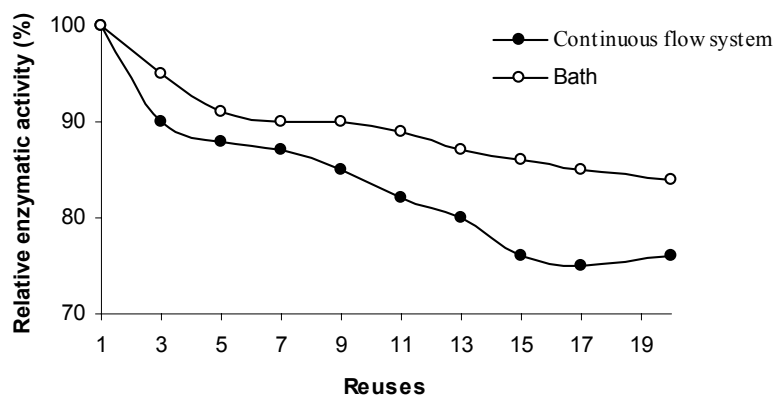


Figure 5. Comparative effect of invertase immobilized activity in bath and continuous flow system (0.18 L h^{-1}) bioreactors in 5mL and 0.5 L of solution sucrose respectively at pH 4.6 (50°C). The experiments in bath were performed at triplicate.

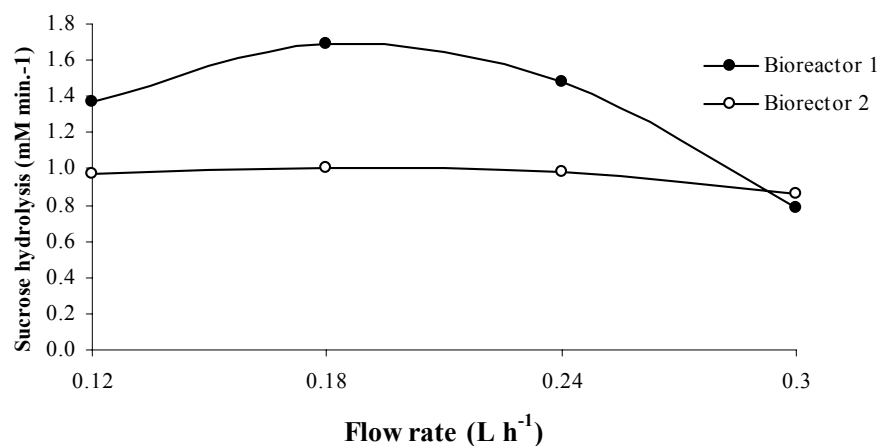


Figure 6. Dependence of the sucrose hydrolysis rate on the flow different rates for both bioreactors 1 and 2. The experiment was out carrier in 0.73 M solution sucrose at 50°C.

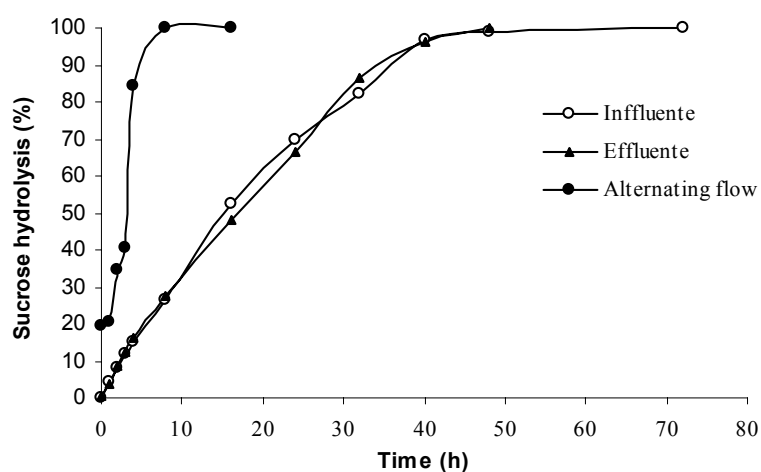


Figure 7. Operational stability of invertase immobilized into SCFA in circulation different of sucrose solution in the bioreactor 1 for 0.18L/h 0.438 M sucrose solution at 25°C (B)

6. References

1. Amaya-Delgado, L.; Hidalgo-Lira, M.E.; Montes-Horcastas, M.C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*, 2005.
2. Akgöl, S.; Kaçar Y.; Denizli, A. and Arica, M.Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry*, 2001, **74** 281-288.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT 12.766.
4. Azevedo, A.M.; Cabral, J.M.S.; Gibson, T.D.; Fonseca, L.P. Operation and performance of analytical packed-bed reactors with an immobilised alcohol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **28** 45-53.
5. Bayramoğlu, G.; Akgöl, S; M.Y.; Bulut, A; Denizli, A. and Arica, M.Y. Covalent immobilisation of invertase onto reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14** 117-126.
6. Bagal, D.; Karve, M. S. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose–guar gum biopolymer membrane. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **555** 316–321.
7. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72** 248-254.
8. Danisman, T.; Tan, S.; Kacar, Y.; Ergene, A. Covalent. Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membrane. *Food Chemistry*, 2004, **85** 461-466.
9. Carmona, N.; Garc'ya-Heras, M.; Gilc; C.; Villegas, M.A. Chemical degradation of glasses under simulated marine medium. *Materials Chemistry and Physics*, 2005, **94** 92–102.
10. Cimdins, R. Rozenstrauba; Berzina, L.; Bossert, J. and Bücken, M. Glassceramic obtained from industrial waste. *Resources Conservation & Recycling*, 2000, **29** 285-290.
11. Chen, Y.; Kang, E. T.; Neoh, K.G. and Tan K.L. Covalent immobilization of invertase onto the surface modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. *European Polymer Journal*, 2002, **36** 2095-2103.

12. Farag, A. M.; and Hassan, M. A. Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microbial Technology*, 2004, **34** 85-93.
13. Godbole, S.S.; Kubal, B.S. and D'Souza, S.F. Hydrolysis of concentrated sucrose syrups by invertase immobilized on anion exchanger waste cotton thread. *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, **12** 214-217.
14. Gómez, L.; Ramírez, H. L.; Villalonga, M.L.; Hernández, J.; Villalonga, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **38** 22–27.
15. Husain. S.; Jafri F.; Saleemuddin, M. Effects of chemical modification on the stability of invertase before and after immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, **18** 275-280.
16. Kniess, C.T.; Kuhnen, C. N. E. ; Riella, H. Gracher. Estudo do efeito da quantidade de óxido de ferro em cinzas pesadas de carvão mineral na obtenção de vitrocerâmicos. *Quim. Nova*, 2002, **25** 926-930.
17. Kim, M.J. Kim, H. S. Processing and properties of a glass-ceramic from coal fly ash from a thermal power plant through an economic process. *Journal of the European Ceramic Society*, 2004, **24** 2825-2833.
18. Kovalenko, G.A .; Komova, O.V.; Simakov, A .V. Khomov, V.V and Rudina, N.A. Macrostrured carbonized ceramcs as adsorbents for immobilization of glucoamylase. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2002, **182-183**, 73-80.
19. Limbut, W., Thavarungkul, P.; Kanatharana, P.; Asawatreratanakul, P.; Limsakul, C.; Wongkittisuksa, B. Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver[®] for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, **19** 813-821.
20. Park, S. W.; Choi, S.Y.; Chung, K.H.; Hong, S. I. and Kim, S.W. Characteristics of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel through silanization. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, **11** 87-93.
21. Peng, F.; Liang, K.; Hu A.; Shao H. Nano-crystal glass-ceramics obtained by crystallization of vitrified coal fly ash. *Fuel*, 2004, **83** 1973-1977.

22. Peng, F.; Liang, Kai-ming; Hu, An-min. Nano-cristal glass-ceramics obtained from high alumina coal fly ash. *Fuel* **84** (2005) 341-346.
23. Sanjay, G.; Sugunan, S. Invertase immobilised on montmorilnite: reusability enhancement and reduction in leaching. *Catalysis Communications*, 2005, **6** 81-86.
24. Selampinar, F.; Akbulut, U., Özden, M.Y.; Toppare, L. Immobilization of invertase in conducting polymer matrices. *Biomaterials*, 1997, **18** 1163-1168.
25. Summers, J.B. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicyclic acid. *Journal of Biology chemistry*, 1924, **62** 287-290.
26. Suzuki, T.; Toriyama, M.; Hosono, H. and Yoshihiro Abe. Application of a microporous glass-ceramics with a skeleton of $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ to carries for immobilization of enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, **72** 384-394.
27. Tanriseven, A.; Doğan, S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 2002, **36** 1081-1083.
28. Villora, J.M.; Callejas, P.; Barba, M. F. and Baudín. Statistical analysis of the fracture behaviour of porous ceramic rasching rings. *Journal of European Ceramic Society*, 2004, **24** 589-594.
29. Weber, G.; Strivay, D.; Martinot, L.; Garnir, H.P. Use of PIXE–PIGE under variable incident angle for ancient glass corrosion measurements. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2002, **189** 350–357.

Acknowledgements

Alessandro Victor Patrício de Albertini acknowledges CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). To the Ph.D. Valderez P. Ferreira (Laboratório Núcleo de Estudos de Granitos/NEG - and Laboratório de Isótopos Estáveis/LABISE/UFPE) and Engenho Sítio do Meio e P & T Tecnologia.

6. Conclusão da dissertação

1. A invertase imobilizada, em parâmetros cinéticos, apresentou características Michaelianas semelhantes à livre.

1.1. O sistema de imobilização obtido demonstrou-se maior afinidade com o substrato,

1.2. A cerâmica a partir da sinterização de cinzas de carvão mineral (SCFA), demonstrou uma retenção e usos repetidos da enzima imobilizada, e possuindo uma expansão de inversão da sacarose em diferentes condições.

2. A importância das análises físico-química da amostra de carvão mineral sinterizada

2.1. A amostra cerâmica (SFCA) apresentou porosidade, resistência mecânica e absorção aquosa satisfatória a imobilização considerando a adequação de um biorreator compatível no âmbito de aplicação industrial;

2.2. Os resíduos da sinterização do carvão mineral podem ser aplicadas com outras amostras inorgânicas para a produção de cerâmicas tradicionais e avançadas, e serem experimentadas para a imobilização de outras enzimas;

2.3. Resultados experimentais em biorreatores demonstraram a viabilidade econômica da inversão da sacarose.

3. Aplicação:

Com resultados obtidos, poder-se-á realizar em escala industrial a inversão de 1t/mês de sacarose com 1.540.000 amostras cerâmicas num biorreator com volume de 1m^3 em sistema de fluxo contínuo ou batelada.