



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

ALEXANDRE LIBANIO SILVA REIS

***IMOBILIZAÇÃO COVAENTE DE β -D-
FRUTOFURANOSIDASE (INVERTASE) EM SUPORTE
VÍTREO-CERÂMICO.***

RECIFE, 2004.

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

ALEXANDRE LIBANIO SILVA REIS

***IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE β -D-FRUTOFURANOSIDASE
(INVERTASE) EM SUPORTE VÍTREO-CERÂMICO.***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof^oDr. José Luiz de Lima Filho

(Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE).

Orientadora Externa: Prof^a Dra. Maria de Mascena Diniz Maia

(Departamento de Biologia – UFRPE)

FEVEREIRO de 2004

IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE β -D-FRUTOFURANOSIDASE (INVERTASE) EM SUPORTE VÍTREO-CERÂMICO.

ALEXANDRE LIBANIO SILVA REIS

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
(Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE).

Prof^a.Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Prof^a. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva
(Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof^a. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra
(Instituto de Ciências Biológicas – UPE; LIKA – UFPE).

Membros Suplementares

Prof^o. Dr. Eduardo Henrique Magalhães Melo
(Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof^o. Dr. Cosme Rafael Martinez Salinas
(LIKA – UFPE)

“As grandes coisas são feitas por pessoas que tem grandes idéias e saem pelo mundo para fazer com que seus sonhos se tornem realidade” (Ernest Holmes)

Dedicatória

Aos Meus Pais

SUMÁRIO

Agradecimentos	i e ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Tabelas	v
Lista de Tabelas do Artigo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Figuras do Artigo	vi
Lista de Abreviaturas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.2.1. Materiais Cerâmicos	4
1.2.1.1. <i>Processamento das Cinzas na Produção de Materiais para a</i> <i>Aplicação Biotecnológica</i>	6
1.2.2. Imobilização Enzimática e Suas Aplicações	8
1.2.2.1. <i>Estrutura do Suporte Cerâmico UTPM Imobilizado com a β-D-</i> <i>Fructofuranosidase</i>	12
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos.	13
3. ARTIGO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	15
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Agradecimentos

A Deus

Aos Meus Pais, pelo respeito a incentivo a minha escolha acadêmica e ao amor que dedicaram a mim nos “bastidores” da execução dessa dissertação.

Ao Prof^o Dr. José Luiz de Lima Filho, pelo sucesso no compromisso da sua orientação, paciência, confiança e amizade criada durante essa minha segunda iniciação científica.

À Professora Maria de Mascena Diniz Maia, pela co-orientação.

Ao Professor Dr. Marcionilo de Barros Lins (*in memorian*) pelo seu pioneirismo nas pesquisas bioquímicas na Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Professor Dr. Valder N. Freire e ao Msc. Ricardo P. Santos da Universidade Federal do Ceará, pela atenção dedicada, suporte e fornecimento das cinzas de carvão mineral.

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

Às Professoras Maria Tereza dos Santos Correia pelo apoio inicial, Maria do Carmo Pimentel, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Maria da Paz Carvalho da Silva, Rosa Amália Fireman Dutra e ao Professor Dr. Cosme Rafael Martinez Salinas, pelas sugestões.

Aos secretários do Departamento de Bioquímica: Miron (“desenrolado”), Neidinha e Djalma pela flexibilidade no apoio acadêmico e amizade criada.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica João, Flávio, Albérico, Maria, Sr. Ademar pela amizade e respeito que tiveram por mim durante minha formação.

À técnica da Central Analítica do DQF-CCEN Eliete e aos técnicos 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.

Às secretárias Conceição e Ilma e aos técnicos do LIKA e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Rafael Padilha e Sérgio Santos (pelas fotografias de microscopia eletrônica), Carmelita, Felipe, Moisés, Sr. Otaviano, Dona Celeste, “Verinha” e Cleide pela amizade e dedicação ao compromisso de suas atribuições.

A minha namorada Cláudia pelo carinho, apoio, inspiração e pela paciência e compreensão nos dias em que eu estava ausente.

Aos meus amigos-irmãos Felipe Augusto Farias de Andrade, Nerivan Barbosa de Lima e Sálua Gedeon Perez.

Aos meus colegas de mestrado João Soares, Ana Acácia, Regina, Lília, Catarina, Neila, Michele e Rosângela, Janaína Duarte, Alexandre “Chopininho”, Herberty, Sérgio “Bozó” Wânia e Edílson.

A Alessandro Albertini pelo companheirismo, ajuda essencial no desenvolvimento da minha dissertação de Mestrado.

Aos meus inesquecíveis colegas de laboratório Roberto, Mauro, Rivaldo, Pabyton, Edney, Paula Ferdinanda, Marcelo Moura, Danielly Brunaska, Andréa Pachêco, Keyla Aparecida, Amanda, Fernanda, Fernanda Borba, Raquel, Michele, Giuliana, Germana, Jorge (Biosensores), Kaly, Érica, Carmem Gabriela, Carlos, Clóvis, Eduardo Alécio, Ian Porto (Bioquímica), Daniela Viana, Conceição (Imunologia), Luiz e Fábio (Microscopia Eletrônica).

A todos os professores do Departamento de Bioquímica pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, P & T LTDA pelo apoio ao Projeto Sacarose e a UFRPE pelo fornecimento do APTS.

RESUMO

β -D-Fructofuranosidase (Invertase, E.C. 3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae*, foi covalentemente imobilizada em suporte cerâmico, sintetizado a partir de cinzas de carvão mineral e pérolas de vidro (50-100 μ m), modificado com γ -aminopropiltriethylxilano (APTS), seguido de glutaraldeído que atua como agente bifuncional, responsável pela ligação cruzada entre a enzima e o suporte inorgânico. Na imobilização foi utilizado APTS a 2% (v/v) em tolueno, que após seu processo de ativação promove uma união covalente do tipo alquilamina com o glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio a 10mM pH 7,4 que por sua vez une-se, também de forma covalente, com a enzima via base de Schiff. Foi obtida uma estabilidade na atividade do derivado em aproximadamente de 76,31% em 6 reusos, com sacarose a 876,42 mM em tampão citrato de sódio a 100mM e pH 4,6 a 55°C num sistema de fluxo contínuo. Foram determinados os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_m e $V_{máx}$ no qual foram estimados, tanto para a enzima livre, 58,7 e 72,69 mM.min⁻¹, respectivamente, quanto para a enzima imobilizada, 78,2 e 20,32mM.min⁻¹. Foram observadas, também, diferenças entre os valores máximos de pH, 5,0 para a livre e 5,6 para imobilizada e de temperatura 55°C para livre e 65 °C para a imobilizada, assim como os seus valores de estabilidade, onde o derivado imobilizado apresentou uma estabilidade térmica até 60°C e pH até 5,2. Essa alta estabilidade operacional e disponibilidade de matéria-prima para a síntese do suporte determinam a viabilidade do uso do suporte cerâmico na construção de biorreatores em sistemas contínuos para a produção de glicose e frutose a partir da sacarose.

Palavras-Chave: *Cerâmica, Cinzas Volantes, Imobilização Covalente Cruzada e Invertase.*

ABSTRACT

β -D-Fructofuranosidase (invertase, E.C. 3.2.1.26) of *Saccharomyces cerevisiae* was covalently immobilized at ceramic support surface synthesized from fly ashes of mineral coal added of glass beads (50-100 μ m), modified with γ -aminopropyltriethylxysilane (APTS), followed by glutaraldehyde which acts as agent bifunctional responsible for the cross-linked attachment between the enzyme and the inorganic support. At immobilization APTS 2% (v/v) diluted in toluene was used, which promotes an alkylamine covalent attachment type with glutaraldehyde 2.5% (v/v) in Phosphate Sodium Buffer 10mM pH 7.4 after activation process which also attach covalently with the enzyme through Schiff's base. The derivated immobilized hydrolysis activity stability was obtained in approximately 76.31% at six reuses with 876.42mM of sucrose concentration in Citrate Sodium Buffer 100mM pH 4.6 at 55°C in continuous flow injection system. The Michaelis-Menten Kinetics parameters, $K_{m_{ap}}$ and V_{max} were estimates, so much for free enzyme 58.7mM and 72.9mM.min⁻¹, respectively, as for the immobilized 78.5mM and 20.32mM/mL.min⁻¹. Was observed too, differences among the maximum values of pH 5 for free and 5.6 for immobilized and temperatures of 55 and 65°C to free and immobilized invertase. The thermal stability values of the immobilized invertase were until 60°C and pH up to 5.2. The high operational stability and raw material readiness for the synthesis of the support determine the viability of the ceramic support use at the bioreactors construction in a continuous system for the glucose and fructose production from sucrose.

Keywords: *Invertase, fly ash, Cross-link and Ceramic*

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas do Artigo

Table 1 <i>Relationship between the APTS concentrations Buffers used in Immobilization and pH values.....</i>	<i>37</i>
--	-----------

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Reação de Hidrólise da Sacarose</i>	03
Figura 2 <i>Fragmento de Quartzo puro</i>	05
Figura 3 <i>Diagrama da estrutura tridimensional do SiO₂</i> ,	06
Figura 4 <i>Etapas relacionadas aos processos de tratamento das cinzas e produção de cerâmicas UTPM para imobilização de Proteínas</i>	07
Figura 5 <i>Diferentes formas de enclausuramento de enzimas</i>	09
Figura 6 <i>Esquema dos possíveis prejuízos (decrécimo da atividade) causados pela imobilização por enclausuramento</i>	10
Figura 7 <i>Tipos de imobilização enzimática por adsorção</i>	11
Figura 8 <i>Ligação covalente entre a enzima e o suporte</i>	11
Figura 9 <i>Ligação Covalente: Braço químico formado pelo ?-aminopropiltriethylsilano e o glutaraldeído</i>	12
Figura 10 <i>Estrutura do suporte cerâmico UTPM</i>	13

Lista de Figuras do Artigo

Figure 1. <i>Conformational process uniaxial used for the synthesis of Ceramic Support UTPM</i>	29
Figure 2 <i>Apparatus used for process of enzymatic immobilization</i>	30
Figure 3 <i>Chemistry Process of Enzymatic Immobilization onto Ceramic Surface</i>	31
Figure 4 <i>3,5- Dinitrosalicylic Acid Reduced Reaction</i>	32
Figure 5 <i>Enzymatic Immobilization stability</i>	32
Figure 6 <i>Kinetics parameters of velocity initial rates</i>	33

Figure 7 <i>K_m and V_{máx} of free invertase</i>	33
Figure 8 <i>K_m and V_{máx} of immobilized invertase</i>	34
Figure 9 <i>Temperature effects of kinetics parameters of free and immobilized invertase</i>	34
Figure 10 <i>Thermal stability of free and immobilized invertase</i>	35
Figure 11 <i>pH effects of kinetics parameters of free and immobilized invertase</i>	35
Figure 12 <i>pH stability of free and immobilized invertase</i>	36
Figure 13 <i>Structure details of ash particles</i>	36
Figure 14 <i>Surface details of immobilized support with yeast cells</i>	37

Lista de Abreviaturas

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

APTS – 3-aminopropiltriethylxilano

SiO₂ – Dióxido de Silício

UTPM – Usina Termelétrica Presidente Médici

HNO₃ – Ácido Nítrico

HF – Ácido Fluorídrico

DEAE – Sephadex – Dietilaminoetil Sephadex

1. INTRODUÇÃO

Na hidrólise da sacarose é formada uma mistura equimolar de glicose e frutose (açúcares redutores ou invertidos) no qual são muito utilizados na indústria de alimentos devido as suas vantagens em relação à própria sacarose como: *maior doçura* (numa mistura de 50% de sacarose e 50% de açúcar invertido existe um aumento de 20% no poder adoçante do açúcar quando comparado com a sacarose pura), *maior retenção de água* (o que pode manter os produtos com uma relativa umidade, suficiente para estender o seu tempo de bancada), *menor cristalização* (valorizando o produto ampliando a sua aplicabilidade), *menor viscosidade* e *aumento no poder de sabor*, dentre outros (BRITISH SUGAR, 2004).

O Brasil produziu cerca de $2,6 \times 10^8$ toneladas de cana-de-açúcar em 2002 e dispõe de aproximadamente 324 usinas de beneficiamento de álcool etílico hidratado (álcool combustível) e sacarose (BORRERO; PEREIRA and MIRANDA, 2003). Toda essa produção concentra-se em cerca de 74% no sudoeste do país. Mesmo diante dessa produção o Brasil ainda importa xarope de glicose (procedente do milho) dos Estados Unidos, que produziu, no mesmo ano, cerca de 148.405 toneladas desse produto, rendendo em torno de 50 milhões de dólares além de lucros provenientes de outros subprodutos da hidrólise do amido de milho (EXPORTS OF PRODUCTS MADE FROM CORN, 2003).

Muitas estratégias são projetadas para a produção de açúcar invertido a partir da sacarose. No entanto, uma das mais utilizadas pelas indústrias é a hidrólise ácida a partir de H_2SO_4 sob aquecimento, no objetivo de baratear custos e por ser um processo mais rápido. Todavia, essa tecnologia torna-se inviável devido à presença de uma alta quantidade de resíduos furfurais eliminados no final do processo. O que pode ser tratado como produto impróprio para o consumo causado pelo efeito carcinogênico desses elementos furfurais diluídos na mistura.

A β -D-fructofuranosidase (invertase, 3.2.1.26) ácida da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma importante enzima que processa a hidrólise da sacarose em α -D-glicose e β -D-frutose, na qual é utilizada convencionalmente nos processos “orgânicos” de produção de açúcar invertido pela indústria de alimentos (ARSLAN *et al*, 2000). No

entanto, a idéia de utilizar essa enzima de forma solúvel torna-se dispendiosa devido ao desperdício da própria enzima no final do processo junto com a mistura produto/substrato.

Essa levedura produz a invertase sob duas formas: uma mais glicosilada (contém cerca de 50% de carboidratos e apresenta peso molecular de aproximadamente 270.000), encontrada no espaço periplasmático e uma menos glicosilada encontrada no citosol, que provavelmente deve auxiliar a digestão da sacarose e outros compostos glicosilados apenas nos sistemas acoplados ao retículo endoplasmático e o plasmalema ainda no exterior da célula (microambiente), não sendo secretada para o macroambiente. A utilização de células intactas de leveduras pode promover prejuízos no âmbito da qualidade de pureza do produto a ser comercializado, ou seja, indução da presença de outros microrganismos selvagens ou de alguma forma recombinante de forma mais significativa, fator atrelado a possíveis mecanismos de competição pelo substrato. Isso pode ocorrer devido à passividade de falhas nos sistemas de separação das células dos seus produtos e de contaminação. O que pode conduzir a via metabólica para a fermentação alcoólica diminuindo o rendimento na produção (NEUMANN *et al*, 1967) (CHU *et al*, 1985).

Diante dessas dificuldades, a imobilização de biocatalisadores (como a invertase) em suportes insolúveis, torna-se a forma mais competitiva economicamente para a produção industrial de açúcares redutores, além de otimizar a estabilidade conformacional da proteína, o uso múltiplo e repetido do derivado enzimático e a inibição significativa de fatores de contaminação do produto (ARICA *et al*, 2002).

A silanização a partir do γ -aminopropiltriethylxilano (APTS) e glutaraldeído (ligante bifuncional) através de ligação covalente, têm sido uma das mais eficazes alternativas de imobilização de enzimas utilizando suportes inorgânicos e insolúveis como os materiais vítreos-cerâmicos. Porém, a maioria das publicações direciona a aplicação desse “mecanismo” a suportes de vidro, especialmente pérolas de vidro de porosidade controlada, devido à alta disponibilidade de SiO_2 nas suas microestruturas amorfas, nos quais se apresentam como principais grupos químicos reativos entre o suporte e o primeiro ligante o APTS (SUZUKI *et al*, 1991).

O uso de pérolas de vidro de porosidade controlada apresenta um preço relativamente incompatível com as avaliações de custo benefício dentro de uma aplicação industrial.

Uma alternativa para a redução deste custo é substituir, adequadamente, essas pérolas de vidro por compostos também ricos em silicatos e que preferencialmente, se encontre em alta disponibilidade no ambiente na intenção de baratear o processo, e ainda capazes de interagir eficientemente com o APTS e glutaraldeído sem que a enzima sofra alguma alteração na sua funcionalidade.

A proposta deste trabalho foi utilizar cerâmicas sintetizadas a partir de resíduos (cinzas) de carvão mineral, aqui citada como UTPM (devido a sua origem da Usina Termelétrica Presidente Médici) adicionadas de pequena quantidade de vidro amorfo (25%) no propósito de aumentar a capacidade de silanização e também adequar esse suporte às mesmas vantagens das pérolas de vidro de porosidade controlada, inclusive a alta resistividade mecânica nos processos operacionais e capacidade de esterilização, por exemplo, para a imobilização da β -D-fructofuranosidase.

A principal vantagem de utilizar essas cinzas para a produção de cerâmicas voltadas para a imobilização de proteínas é a construção de biorreatores para escala industrial e suportes para separação de proteínas devido a sua alta porosidade, estabilidade mecânica e versatilidade no preparo. O que pode conduzir a construção de dispositivos eletrônicos cerâmicos avançados com a possibilidade de sua miniaturização para a construção de “reatores-microcanais” aplicáveis aos estudos de semicondutividade para biosensores, além de permitir a reciclagem de um material tóxico acumulável na natureza, dentro de uma proposta pró-ecológica (CHENG *et al*, 2002) (WYSZOMIRSKI and BRYLSKA, 1996).

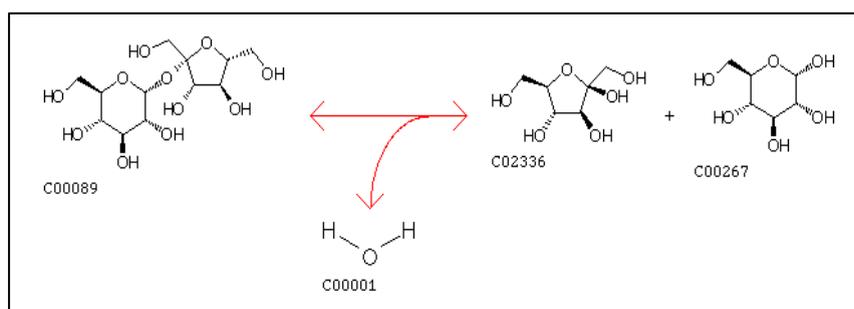


Figura 1 Reação de Hidrólise da Sacarose (C00089), resultando nos resíduos de Frutose (C02336) e Glicose (C00267)

1.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. MATERIAIS CERÂMICOS

A palavra cerâmica vem do grego “*keramikos*” que significa “material queimado”, indicando a necessidade de um tratamento térmico para adequar suas propriedades à suas utilizações (BARROS, 2003).

Há muito tempo, esses materiais acompanham o homem. Estima-se que assim que saiu das cavernas e que se tornou um agricultor, surgiu também a necessidade de acondicionar água, alimentos colhidos e sementes para a próxima safra. Entretanto, essas vasilhas deveriam ser resistentes ao uso, impermeáveis e de fácil fabricação. Então, a argila tornou-se a primeira e mais adequada matéria-prima de materiais para o desenvolvimento social do homem naquela época (BARROS, 2003).

Os materiais cerâmicos são polifásicos, contendo elementos metálicos e não metálicos (C, O, N, P, S), que formam ligações químicas covalentes e iônicas. Em função do arranjo atômico e das ligações químicas presentes, os materiais cerâmicos apresentam elevada rigidez e dureza mecânica apesar da alta fragilidade (muito quebradiço), de alta temperatura de fusão e da grande resistência ao calor (SANTOS *et al*, 2003).

Dentro de uma sistemática existem dois tipos de materiais cerâmicos: *Tradicionais*, que exigem pouco controle dos seus parâmetros operacionais, utilizando quase sempre a matéria-prima natural (argilas caulínicas, quartzo, feldspato, filito – substituinte alternativo para o quartzo e o feldspato, talco – usado em porcelanas elétricas e etc.) e as *Avançadas*, também designadas como cerâmicas novas, especiais, modernas, etc. que originam-se a partir de processos altamente controlados de matérias-primas sintéticas. Esses materiais são empregados na indústria tecnológica de ponta como a eletrônica (encapsuladores de chips e substratos para circuitos integrados), nuclear e aeroespacial (isoladores térmicos para ônibus espaciais, por exemplo), devido ao controle de suas propriedades elétricas, magnéticas e ópticas (CALLISTER, 2002).



Figura 2 Fragmento de Quartzo puro, um dos elementos essenciais na síntese de materiais Cerâmicos.

Nesse trabalho foi desenvolvida uma tecnologia de obtenção de materiais cerâmicos modificados para imobilização de proteínas a partir de cinzas volantes (“fly ash”) não intemperizadas de carvão mineral produzida pelo complexo Mina-Usina Termelétrica Presidente Médici, localizada na cidade de Candiota, Rio Grande do Sul e coletadas por precipitadores eletrostáticos (SANTOS *et al*, 2003).

As cinzas são compostas tipicamente por silício (27%), cálcio (0,38%), alumínio (11,3%), ferro (3,7%), magnésio (0,03%) e óxidos de enxofre (aproximadamente 0,006%), junto com carbono (0,42%) e vários elementos traço (metais pesados). Composição determinada através de digestão com HNO₃ e HF, em micro-ondas, pelo método EPA 3052, sendo as análises realizadas pelo laboratório de análises de solos e outros materiais do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes elementos são achados na cinza por causa de seus elevados pontos de fusão e pequeno intervalo de tempo que as partículas de cinzas permanecem no forno durante combustão. O quartzo mineral (SiO₂) sobrevive ao processo de combustão permanecendo na cinza de carvão sendo o “composto alvo” da tecnologia aqui descrita. Esse grupo químico ligar-se-á covalentemente ao APTS via formação de alquilaminas (SANTOS *et al*, 2003).

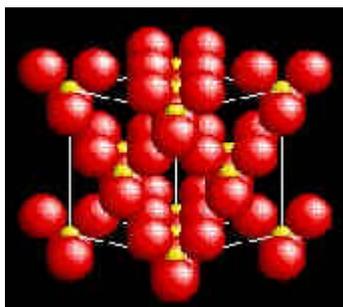


Figura 3 Diagrama da estrutura tridimensional do SiO_2 , componente responsável pela união do suporte cerâmico ao “braço” químico (APTS+glutaraldeído) com a Enzima. As esferas em vermelho representam átomos de O e as amarelas Si.

2.1.1. Processamento das Cinzas na Produção de Materiais Cerâmicos para Aplicação Biotecnológica

Para alcançar o sucesso no produto cerâmico final, torna-se de fundamental importância a preparação das cinzas para as etapas seguintes de conformação e sinterização do material.

Essa preparação envolve a *moagem*, quando necessário (isto se o material possuir partículas grandes), *peneiração* (que essencialmente provoca a uniformização do tamanho das partículas dentro de uma granulometria padronizada) e *acréscimo de aditivos* especialmente ligantes orgânicos como a glicerina e álcoois polimerizados (por exemplo, o polivinil álcool), os efeitos dos aditivos são de permitir que as partículas de cinzas deslizem para um novo arranjo mais compacto e distribuir a pressão em todas as regiões do granulado. É nessa etapa que também são adicionados materiais diversos de interesse da pesquisa, como vidro por exemplo (SANTOS *et al*, 2003).

A etapa seguinte à preparação das cinzas é a *Conformação* onde se efetua a compactação e modelagem das cinzas processadas. Para que isso ocorra de forma mais eficiente, faz-se necessário uma nova peneiração após a adição e mistura dos aditivos, para que esse material recupere a sua uniformidade de granulometria.

Existem três mecanismos básicos de conformação de cinzas para síntese de produtos cerâmicos: *Uniaxial* (prensagem mecânica da mistura de cinzas confinadas no interior de um molde, a partir de um êmbolo de uma prensa hidráulica ou manual), *Isostática*, que se baseia a partir de uma pressão exercida por um fluido num confinamento de borracha no qual distribui a pressão uniformemente e a *Prensagem a*

Quente onde as cinzas são prensadas e queimadas sucessivamente. Conseqüentemente, tanto as prensagens uniaxial e isostática devem se submeter a um tratamento térmico após o processo (SANTOS *et al*, 2003).

Posterior à conformação onde as partículas das cinzas de carvão estão mais próximas e compactadas (com exceção da conformação a quente) procede-se a secagem do material para a sinterização, que busca a eliminação dos espaços vazios existentes entre as partículas, resultando em um corpo rígido, devido à ligação íntima interpartículas em temperaturas elevadas formando, geralmente, novos compostos policristalinos (BARROS, 2003)

Produtos cerâmicos sinterizados representam um sistema de materiais que podem variar em número de componentes, características das partículas, complexidade das reações químicas envolvidas e em mecanismos de contração durante a síntese. As mudanças que ocorrem na micro-estrutura quando é realizada a sinterização, são novas características de empacotamento das partículas (SANTOS *et al*, 2003).

Após todos esses processos, obtém-se a cerâmica “virgem” para as devidas modificações químicas adequadas ao sistema de imobilização de proteínas descrito a seguir (BARROS, 2003) (SILVA *et al*, 1999).

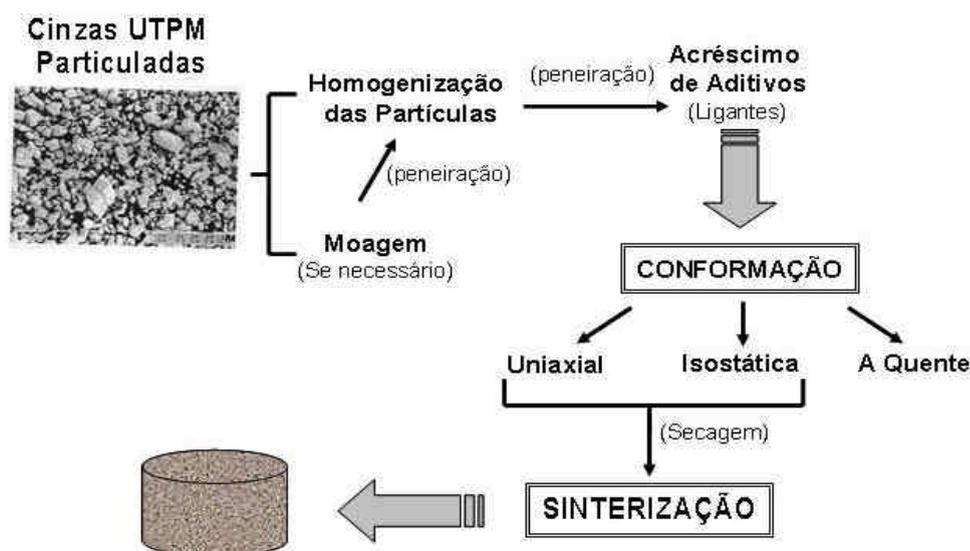


Figura 4 Etapas relacionadas aos processos de tratamento das cinzas e produção de cerâmicas UTPM para imobilização de Proteínas.

2.2. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA E SUAS APLICAÇÕES

Os processos que envolvem tecnologia enzimática são usualmente dispendiosos. Isto devido ao desperdício do biocatalizador misturado ao produto de consumo ou com os resíduos industrializados o que pode determinar também um caso de poluição ambiental, dependendo do biocatalizador empregado.

A tecnologia de imobilização de enzimas, objeto dessa dissertação, apresenta vantagens como: o seu uso múltiplo e repetitivo, o controle no processo onde o operador decide o início e a interrupção imediata com a retirada do derivado imobilizado, o aumento de estabilidade e o prolongamento do tempo de $\frac{1}{2}$ vida permitindo uma redução significativa nesse desperdício, conseqüentemente nos custos operacionais, resultando num aumento da produtividade melhorando a qualidade do produto (livre de enzimas) a ser comercializado, dada a possibilidade do desenvolvimento de biorreatores em escala industrial (THE UNIVERSITY OF READING, 2004).

Alguns métodos de imobilização enzimática são aplicados à indústria de alimentos e bebidas, farmacêutica, biorremediação e a de pesquisa pura e aplicada (biosensores e cromatografia de afinidade). Entretanto, é necessário um conhecimento avançado dos tipos de imobilização para que se conduza a imobilização mais adequada ao biocatalizador de interesse. É importante também a escolha de um suporte, cuja natureza seja compatível com as características da enzima e também com o objetivo da técnica a ser empregada (KENNEDY and WHITE, 1984).

Nos últimos anos, vários métodos foram desenvolvidos, contudo, aqui são descritos os que mais são designados à aplicação industrial, de uma forma geral:

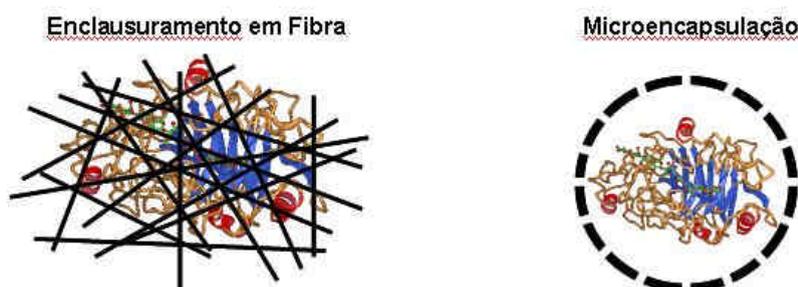
Enclausuramento (“*entrapment*”), que está relacionado ao confinamento da enzima ou qualquer outra proteína no interior de uma matriz que pode ser um polímero em gel, fibras ou membranas, o que determina sua classificação em enclausuramento em gel, fibra e microencapsulação, respectivamente. O substrato penetra pelos interstícios do suporte e alcança a enzima que libera o produto para o meio permanecendo confinada. Apesar do método de enclausuramento em gel disponibilizar melhor os poros para a penetração do substrato, isso também faz com que ocorra uma tendência de

“vazamento” da enzima durante as lavagens. De qualquer forma ainda existe a possibilidade de enclausurar em fibras que promovem uma maior área de absorção da enzima, aumentando dessa forma a sua capacidade de retenção protéica, além de serem resistentes à contaminações por microrganismos e tratamentos ácidos-básicos fracos e alguns solventes orgânicos. Esse tipo de imobilização restringe ao uso de enzimas de baixo peso molecular. Apesar de não haver limitações quanto a natureza e o peso molecular das enzimas e também favorecer a possibilidade de realização de imobilizações simultâneas.

A microencapsulação, baseada no enclausuramento do biocatalizador no interior de esferas poliméricas semipermeáveis, apresenta desvantagens frente a outras tecnologias de imobilização, como por exemplo, uma relativa inativação enzimática durante o processo de microencapsulação, a possibilidade de impedimento da difusão do substrato para o interior da cápsula devido ao tamanho dos poros ou aberturas, a exigência de uma concentração alta de enzima e o risco de deslocamento da enzima para o interior da “parede” da membrana e conseqüente vazamento da enzima para o ambiente (KENNEDY and WHITE, 1984).

Na literatura científica existem diversas publicações em torno do enclausuramento da invertase: em gel de poliacrilamida, gel de Etilenoglicol/2-hidroxi-etilmetacrilato, fibras de acetato de celulose (KENNEDY and WHITE, 1984) e recentemente, com objetivo na aplicação industrial, Arruda e Vitolo. (1999) utilizaram a técnica de síntese do Alginato de Cálcio para o confinamento da invertase em processo simultâneo, onde a enzima em solução com alginato de sódio é misturada com uma solução de um polissacarídeo ácido. Essa mistura é gotejada numa solução de cloreto de cálcio. Os íons de cálcio substituem os íons de sódio e realizam uma ligação cruzada com o polissacarídeo, resultando na formação de pequenas esferas de alginato de cálcio com a enzima enclausurada.

Figura 5 Diferentes formas de enclausuramento de enzimas



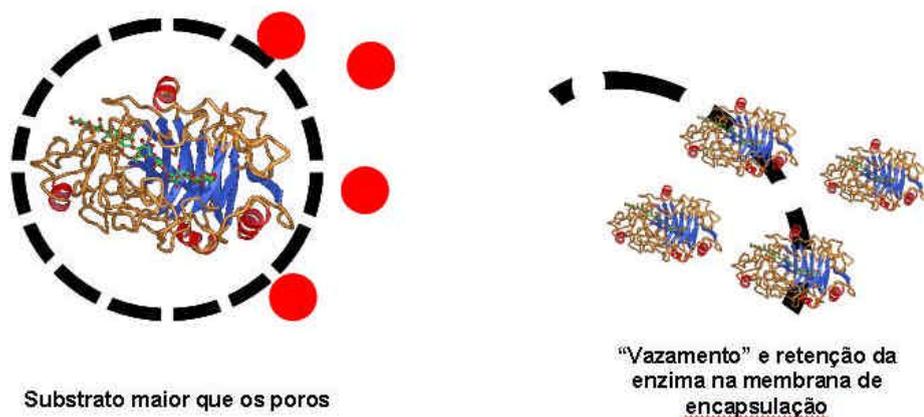


Figura 6 Esquema dos possíveis prejuízos (decréscimo da atividade) causados pela imobilização por enclausuramento

Outra técnica de imobilização é a **Adsorção**, a mais antiga e mais simples técnica de imobilização enzimática (KENNEDY and WHITE, 1984) em hidróxido de alumínio baseado na adsorção física, que coincidentemente foi realizada com a invertase e que ocorre graças a interação da enzima com o suporte através de ligações fracas (pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas). Devido à simplicidade da técnica e vasta disponibilidade de suportes que apresentam custos módicos à aplicação industrial, as primeiras publicações relacionadas à imobilização da invertase em trocadores iônicos como o Amberlite®, DEAE-Sephadex® e CM-Sephadex® (KENNEDY and WHITE, 1984) e mais recentemente em DEAHP-Celulose por Hradil e Svec (1981 e em Hidrogéis de Poly (acrilamida/ácido maleico) por Arslan *et al.* (1999), descrevem a simplicidade da técnica. Como ocorre apenas a estabilidade do contato da enzima com o suporte através dessas ligações fracas, as desvantagens se apresentam em torno dos reusos, das limitações quanto às lavagens com determinadas substâncias que possuem alta força iônica e da exigência de altas concentrações da enzima em estudo. Tornando um método relativamente inadequado para as aplicações industriais.

A técnica de imobilização enzimática mais competitiva é a conduzida pela formação de **Ligação Covalente**, envolvendo o compartilhamento de elétrons dos grupos químicos de ligação entre a proteína e o suporte diretamente, onde não se torna necessária nenhuma atividade catalítica por parte da enzima, todavia, os grupos reativos

do suporte podem ligar-se aos sítios ativos da enzima afetando sua cinética. Significantes são as vantagens frente a outras técnicas de imobilização citadas anteriormente, encontra-se na reduzida exigência da quantidade de enzima para o processo por grama de suporte (geralmente em torno de 0,02 a 0,5g de proteína/g de matriz de imobilização) e absoluta estabilidade na imobilização dificultando a difusão da enzima para o meio ambiente. No entanto, dependendo da natureza química do suporte, são exigidos muitos aditivos químicos para que seja estabelecida a união entre a enzima e o suporte (THE UNIVERSITY OF READING, 2004).

Nesse estudo foi realizada uma imobilização enzimática da β -D-Fructofuranosidase em suporte cerâmico UTPM através de ligação covalente cruzada, devido às vantagens apresentadas pelo método onde foram utilizados um ativador do suporte e um agente bifuncional: o γ -aminopropiltriethylxilano responsável pela oxidação do suporte rico em dióxido de silício (SiO_2) em altas temperaturas e que possui um grupamento orgânico amínico alifático capaz de interagir covalentemente com o glutaraldeído através de uma ligação alquilamida. Determinado o braço de ligação, o glutaraldeído disponibiliza grupos carboxílicos funcionais, nos quais reagem, normalmente, com resíduos de L-Lisina via formação base de Schiff.

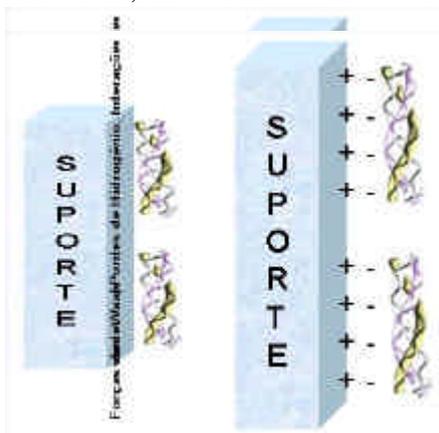
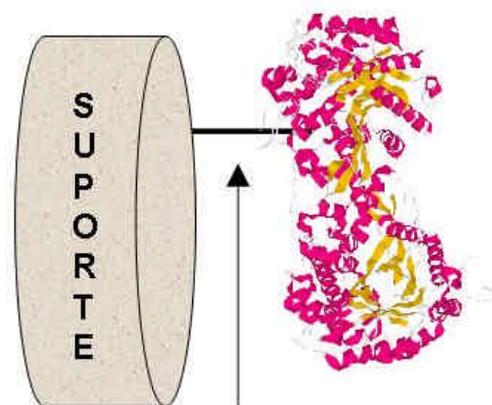


Figura 7 Tipos de imobilização enzimática por adsorção, no lado esquerdo: estabelecimento de ligações fracas e no lado direito: interações iônicas.



Ligação covalente estabelecida entre os grupos químicos da Enzima e do Suporte

Figura 8 Ligação covalente entre a enzima e o suporte



Figura 9 Ligação Covalente: Braço químico formado pelo γ -aminopropiltriethylxilando que oxida, formando uma ligação covalente com suporte em altas temperaturas que por sua vez promove uma ligação alquilamida com o glutaraldeído que une-se a enzima (no esquema invertase) através da formação de bases de Schiff.

2.2.1. Estrutura do Suporte Cerâmico UTPM Imobilizado com a β -D-Fructofuranosidase (Invertase)

Tópico de relevante importância no estudo cinético de uma enzima imobilizada em suportes de elevada porosidade, isso devido ao microambiente formado na superfície da partícula, que possui diferentes propriedades em comparação com o restante da solução devido ao substrato *versus* difusão do produto e os efeitos de partição hidrofóbicos e iônicos, que podem determinar uma inibição da atividade pelo excesso de produto ao redor do sítio ativo, se o sistema não for devidamente agitado, ou uma redução significativa nos valores das velocidades iniciais do derivado enzimático imobilizado e definir uma perspectiva equivocada de sua cinética (THE UNIVERSITY OF READING, 2004).

Dois parâmetros físicos importantes no estudo da estrutura do suporte são a *porosidade*, que pode ser determinada pela proporção do volume no interior da partícula em relação ao volume externo e a *tortuosidade*, que é definida como a média das “galerias” originadas a partir dos poros até o interior do suporte de encontro ao seu centro em linha reta (THE UNIVERSITY OF READING, 2004).

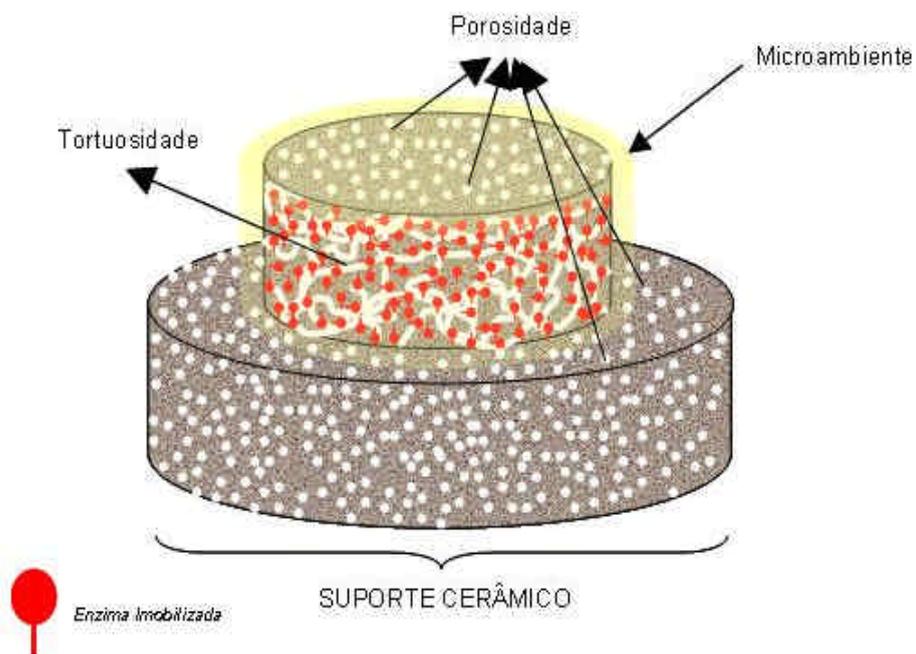


Figura 10 Estrutura do suporte cerâmico UTPM, esquematizado segundo descrição visual do autor em experimentação.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Preparar o suporte, avaliar a viabilidade da utilização das cinzas de carvão mineral como matéria prima para síntese de suportes vítreos-cerâmicos direcionados a imobilização de proteínas e comparar a atividade enzimática da β -D-fructofuranosidase imobilizada em suporte cerâmico UTPM frente a outros suportes com a mesma natureza de imobilização citados na literatura científica.

3.2. ESPECÍFICOS

- Obtenção do Suporte para Imobilização a partir das Cinzas Volantes resultantes da queima de Carvão Mineral;
- Testar a resistividade do suporte diante de diversos tipos de soluções tampão usados nos processos de imobilização e atividade;

- Imobilizar a invertase no suporte vítreo-cerâmico e obter estabilidade de atividade;
- Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada nesses suportes em comparação aos da enzima livre e/ou imobilizada em outros suportes inorgânicos;
- Determinar a viabilidade da sua aplicação em escala semi-industrial

Artigo a ser submetido a revista *Biochemical Engineering Journal*

**Immobilization of β -D-Fructofuranosidase on Vitreous-
Ceramic Support**

**Reis, A. Libanio; Albertini, A.V.P; Freire, V.N. Santos; R. P.; Maia, M.M.D. and
Lima Filho, J. L.**

Immobilization of β -D-Fructofuranosidase on Vitrous-Ceramic Support

Reis, A. Libanio¹, Albertini, A.V.P¹ Freire, V.N.³, Santos, R. P.³ Maia, M.M.D.^{1,2}
and Lima Filho, J. L.¹

1. Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco
2. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
3. Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará

ABSTRACT

β -D-Fructofuranosidase (Invertase, E.C. 3.2.1.26) of *Saccharomyces cerevisiae* was covalently immobilized on ceramic support surface synthesized from fly ashes of mineral coal added to glass beads (50-100 μ m), modified with γ -aminopropyltriethylsilane (APTS), using glutaraldehyde as agent bifuncional. APTS was diluted in toluene 2% (v/v) to promotes an alkilamine covalent attachment with glutaraldehyde 2.5% (v/v) in sodium phosphate buffer 10mM pH 7.4. The stability of derivated immobilized was obtained in aproximately 76.31% in six reuses with the sucrose concentration of 876.4mM in sodium citrate buffer 100mM pH 4.6 at 55°C in continuous flow injection system. The Michaelis-Menten kinetics parameters for free enzyme, were estimates for sucrose concentrations at 14.6 a 1460.7mM, and the Km_{ap} observed was of 58.7mM and $Vmax$ of 72.9 μ moles min^{-1} and to immobilized enzyme the Km_{ap} was 78.5mM and and the $Vmax$. was 20.32 μ moles. min^{-1} mg. The maximum values of pH for free enzyme activity was 5.0 and for the immobilized enzyme was 5.6 whereas the maximum temperatures were 55 and 65°C to free and immobilized invertase activity, respectively. The termal stability values of the immobilized invertase were until 60°C and pH up to 5.2. The high operational stability and raw material readiness for the synthesis of the support determine the viability of the ceramic support use at the bioreactors construction in a continuous system for the glucose and fructose production from sucrose.

Keywords: β -D-Fructofuranosidase, fly ash, covalent and vitrous-ceramic support.

Corresponding author: Av. Moraes Rêgo, s/n 50.670-901 Recife-PE, Brasil. Fax: +55 3271-8485, e-mail: zeluiz@lika.ufpe.br

1. Introduction

β -D-Fructofuranosidase (invertase, E.C. 3.2.1.26) acid from yeast *Saccharomyces cerevisiae* it is an important enzyme that process the hydrolysis of sucrose in inverted sugars which are used conventionally in the “organic” process by the food industries. However, the idea of using that enzyme in a soluble way becomes costly because to the waste of own enzyme in the end of process with the mixture product/substrate. Due to that difficulty the immobilization of biocatalyst, as the invertase, in insoluble supports, becomes economically the most competitive form for the industrial production of sugars reducers, besides to optimize the conformational stability of the protein, the enzymatic multiple and repeated use of the derived and significant inhibition of factors of contamination of the product [1].

Based to the silanization with γ -aminopropyltriethylsilane (APTS) and glutaraldehyde (bifunctional ligands) through attachment covalent the immobilization of enzymes using inorganic and insoluble supports have been one of the most effective alternatives. Scientific publications indicate the application of that “mechanism” to glasses supports, specially Controlled Pore Glass (CPG), due to the high readiness of SiO_2 in its amorphous microstructures which has as main groups chemical reagents between the support and the APTS [2]. Nevertheless, the use of CPG presents a price relatively incompatible with the evaluations of cost/benefit inside an industrial application.

An alternative for the reduction of this cost is to substitute, appropriately, those CPG for a raw-material cheap, rich in silicon and enable react efficiently with APTS and glutaraldehyde without the enzyme suffers some alteration in its functionality.

The propose of this work is to use ceramic synthesized from residues (ashes) of mineral coal, here mentioned like UTPM (due to its origin of Usina Termelétrica Presidente Médici – Candiota RS, Brazil) added of a few amount of amorphous glass (25%) to increasing the silanization capacity in a view to the immobilization process of β -D-fructofuranosidase.

The main advantage in to use ashes for the production of ceramics supports to protein immobilization and bioreactors construction, is its high porosity, mechanical stability and versatility to prepare it. What can drive the construction of ceramic electronic devices moved forward with the possibility of its miniaturization for the construction of “reactor-microchannels” applicable to the semiconductivity studies for biosensors, besides allowing the recycling of a cumulative toxicant materials in the nature, inside of a pro-ecological proposal [3][4].

2. Experimental

2.1. Materials

β -D-Fructofuranosidase was obtained from NOVO Nordisk, Glutaraldehyde from Nuclear®, Glass Beads from Ornela a.s., Ashes of Mineral Coal, from Usina Termelétrica Presidente Médici – Candiota RS, γ -aminopropiltriethylxissilane from SIGMA (SIGMA CHEM. Co.) and Polivinil Alcohol (VETEC).

2.2. Preparation of Ceramic Pill and Surface Activation.

The ashes were mixed in agreement with the following composition:ashes 50% (w/w),glass beads porous of diameter controlled 25% (w/w) and polivinil-alcohol - PVA (ligant - organic agregador) 25% (w/w).

The distilled water added to the mixture was enough to turn the joined mass and uniform and it varied in agreement with the total mass of each experiment. A few portions of ashes made uniform with the addictive ones mentioned previously were distributed evenly in 3 head offices of a stainless steel mold Figure 1, pressed and submitted to dry in sterilization stove at temperature of 100°C approximately for 1 hour.

After dry, the formed pills were to oven type mufla in the temperatures of 900°, 1000°, 1100° and 1200°C and after evaluated with relationship to its hardness and resistance front to the distilled water, solutions soduim citrate buffer 0.1M pH 4.6, sodium phosphate buffer 0.2M pH 7.0 and Tris HClbuffer 0.5mM pH 8.0.

To evaluate the behavior of the structure of the support during the immobilization processes, after the addition of APTS, they were accomplished tests fragmentation of the support front to the use of several immobilization buffers.

It was also accomplished a comparative study of the concentration of APTS (1%, 2%, 3%, 4% and 5% v/v in Tolueno) in relation to the 4 types of solutions used in the immobilization process and verifying the occurrence of fragmentation of the support in rest and after gentle manual agitations.

Opposed to other silanization methodologies, in which it's necessary the activation of the support with acid treatments, the ceramic support UTPM was just washed with water distilled in abundance with the aid of a Pinsseta and a sieve to avoid the presence of possible free particulados in the surface of the ceramic.

After wash and dry in sterilization stove, the silanization was proceeded with APTS (Merck) at 2% (v/v) in Tolueno in a proportion of 20mL of that solution for each support gram. Therefore, those tubes contend the support they were taken to the water-bath to a temperature of approximately 95°C, under continuous agitation for 6h.

The covalent "arm" was concluded with the addition of the glutaraldehyde 2.5% (Nuclear) in Phosphate of Sodium Buffer 10mM pH 7.5 at system of continuous flow, similar to the used by Suzuki *et al.* [2], at 4°C over 24h to a speed of 65 U/min. with the aid of a persitaltic pump. (Figure 2)

2.3. Enzymatic Immobilization

After the incubation with the glutaraldehyde solution the enzymatic immobilization was proceeded, using Invertase (NOVO Nordisk) diluted 2500mg) of the enzyme in 10mL in the Phosphate of Sodium Buffer 10mM pH 7.5, also using the continuous flow (same apparatus of the previous stage) at 4°C for 32 hours in a speed of 65U/min (Figure 3).

After that process, the immobilized supports were washed with 300mL of NaCl 1M and approximately 500mL of water distilled respectively in continuous flow being despised

the affluent, for the removal of possible enzymes that didn't covalently attach and toxicant residues of glutaraldehyde.

2.4. Activity Assays of Free and immobilized Invertase

The activities of both invertases, free and immobilized, were measured through the determination of sugars total reducers (glucose and fructose), liberated during the hydrolysis of the sucrose by unit of time.

For determination of sugars reducers the was adopted colorimetric methodology using the acid 3,5-dinitrosalicylic [5], in which suffers a reduction for the carbonyls functional groups present in those sugars (mainly the monosaccharides) for 3-amino-5-nitrosalicylic at the same time in that the aldehydic group is oxidized to carboxylic acid (Figure 4). That oxidation requests an alkaline environment and it develops a coloration red-brown leaving of the yellow (beginning of the reaction). [6]

2.5. Operational Stability of Immobilized Invertase in a Continuous System

With the objective of test the efficiency of the stability of the cross-linked attachment between the support and the enzyme was accomplished an sequence use and six reuses in intervals of 24 hours for a total of 120 minutes in each reaction. For that assay 100mL of a solution of Sucrose were used in Sodium Citrate Buffer 0.1M pH = 4.6 to 30% (w/v) at 55°C in continuous flow.

2.6. Determination of the Kinetic Parameters

The aliquots (300 μ L) they were collected in the times of 0 to 12 minutes and heated up immediately in water-bath at 100°C for 5 minutes. However, for the study of enzymatic kinetics of the free invertase 10 μ L were used in the concentration of 2mg/mL for each different concentration substrate. While, for the immobilized enzyme, an immobilized pill was used.

The used sacarose concentrations 14.6 to 1460.7 mM/mL, for both. For each assay graphs of enzymatic activity (mg/mL) and time (minutes) were plotted. From the line of initial dispersion (1minute), it was traced a tangent that represents the initial velocity (method of the initial velocities) of the enzyme for that concentration. This data were treated by the software Micolal Origin, for determination of the Maximum Velocity (V_{max}) and the Apparent Constant of Michaelis (Km_{ap}).

In the assays of determination of pH and temperature optimum values for the enzymatic activity the concentration of the substrate was used in agreement with the obtained results of Km_{ap} and V_{max} of the previous assays.

The stability was determined by the exhibition of the enzyme by 30 minutes in temperatures previously determined in comparison to some points of the curve of optimum temperature and soon after a study of the activity it was accomplished (mg/mL) per time (minutes) the temperature sets.

The optimum pH was obtained starting from two types of buffer solutions (Citrate and Phosphate, with concentrations cited above) for different limits of the values that varied from 3.0 to 7.4.

2.7. Scanning Electronic Microscopy

The scanning electronic microscopy (SEM) it is the method more used to study the microstructural characteristics, as well as the morphology of the surface of materials through its resolution in up to 150.000 times the original size [7] [8].

Begun from the need of detailed visualization of the immobilization and porosity of the ceramic supports UTPM, the analysis of electronic micrography was proceeded using cells of *Saccharomyces cerevisiae*, due to the impossibility of visualization of the invertase immobilized by conventional techniques.

3. Results and Discussion

3.1. Tests of Resistivity of Support front to Used Solution Buffers in the Process.

The results of resistivity of the support in relation to the buffers used in the immobilization method and reaction were classified in “partially broken” and “totally broken”, resultant of a visual observation of the behavior conformacional of the ceramic (Table 1).

The results comprove the needs of the behavior study of the support structure related to the pH and the molarity of the Phosphate of Sodium Buffer, in which came less probably aggressive due to its ionic behavior. In agreement with the technique of Suzuki *et al* [2], that used that buffer for immobilization of β -galactosidase for 10mM and also due to its reductor ionic characteristic important for the establishment of covalent attachments, presenting a closer of the neutrality pH of 7.5, annulling in that way the aggressiveness against the ceramic pills.

3.2. Determination of Proteic Retention, Relative Activity and Stabilization of the Activity

The covalent arms of the silanized ceramic got to retain 5.941mg approximately (2.35%) of total proteins of 252.58mg/mL disponibilized for the immobilization. As the volume of the ceramic is 0.521 cm³, those data, may determine the likeness of the enzyme in relation to the volume of 11.403mg/cm³, due a support high porosity.

The relative activities of the free and immobilized enzyme were 22.532U.g⁻¹ of proteins through the colorimetric method of Bradford and 24.4 U.g⁻¹ of the support, respectively to 55°C pH 4.6 using sucrose for 14.6mM.

The figure 5 represents the operational stability in the activity of the derived immobilized at relation to the residual activity by use and six reuses values in 120 minutes of reaction using sucrose 876.42mM.

The enzyme lost 23.69% of its activity in the seventh day and 1.45% among the 5° and 6° reuse that it can determine stability in the loss of activity. Arica *et. al.* [1] got a stability at activity of the invertase immobilized in film of 2-hidroxiethyl metacrilate and glicidil metacrilate around 68% until the 28° day of storage, what is not necessarily be related to the values of uses and reuses treated in this work.

3.3. Effects of the Substrate Concentration.

The value of Km_{ap} of the enzyme covalently immobilized was approximately 1.33 more larger than the free.

A comparison with the results obtained by Arica *et al.* [1] with the invertase covalently immobilized in 2-hidroxiethyl metacrilate/glicidil metacrilate and Chen *et al.* [8] with the invertase immobilized in the modified surface of polianilina, demonstrated inferior values to the obtained in that work of 2.06 and 1.16 times, respectively. (Figures 6, 7 and 8).

Those invertase likeness modifications in relation to the sucrose are probably caused by the structural changes of the same when immobilized. The difficulty substrate access even enzyme can also be related with the density of the porosity. This can infer an operational mistake, mainly for the kinetics studies involving measures of initial speeds, because during the derived immobilized introduction to the reaction system, the substrate may proceed slowly to the encounter of the enzyme inside the galleries of the support and to result in estimates mistaken regarding the imobilização process.

However, the use of vigorous and previous agitations of system reduces the mistake possibility.

3.4. Effect of the Temperature in the Catalytic Activity of Free and Immobilized Invertase

Due to the structure of the support, which finds joined to the invertase molecule achieved part of its resistance to extreme conditions of pH and temperature. The derived immobilized presented a great resistance to temperatures and variations of larger pH than the free enzyme. Those extreme values of temperature stays around 65°C. Where, for the free enzyme that value dropped for around 55°C. (Figure 9)

The activity loss stays around 80% after 12 minutes of reaction, for the immobilized enzyme. This determines to poor protection of the enzyme quaternary structure for that support. The graphs demonstrate that assertive. (Figure 10)

3.5. Effect of the pH on Catalytic Activity of Free and Immobilized Invertase

The results of the kinetic studies of pH values were certain to the temperature it sets in Citrato of Sodium Buffer (pH = 3.0 – 5.0) and Phosphate of Sodium Buffer (pH = 5.2 – 7.4) and demonstrated in the Figures 11 and 12.

The optimum pH, so much for free enzyme as for immobilized, were respectively of 5.0 and 5.6, rectifying Chen *et. al.* [8] in which affirms that the obtaining of equivalent values of great pH among the free and immobilized enzyme covalently can be

probably attributed to the action of the concentrations of loaded species (for example, ions hydrogen) in the domain of the immobilized enzyme to be similar with the remaining of the solution. The vigorous and continuous agitation during the experiment, aids in the substrate diffusion, recuperating the physical-chemical microenvironment behavior continually around the support surface and consequently close to the catalytic domains of the enzyme. Manifesting, the true profile of a catalyst immobilized, in an insoluble support and that presents thermal characteristics that benefits the catalytic activity of the conjugated.

The immobilized enzyme came a little stableer than the free. This expansion in the activity can be related to the interaction of the enzyme in several points with the surface of the ceramic, reached by the stability of the support front to the most extreme pHs and due to the efficient interaction covalente of the invertase with the support in study.

3.6. Scanning Electronic Microscopy (SEM)

The electronic micrography obtained through the SEM, represented by the illustrations to proceed, demonstrates the ashes particules surface and the presence of the vitreous cenosferas and also the surface of the ceramic sinterizada with APTS and immobilized with cells of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. Those electronic micrography also revealed the high porosidade of the support and the confirmation of the imobilização efficiency for the presented method, due to the covalent arm stability before the fixation processes, dehydration, critical point and metalização of the material for the microscopic observation. (Figures 13 and 14)

5. References

- [1] BAYRAMOGLU, Gulay; ARICA, M. Yakup *et al.* Covalent Immobilisation of Invertase Onto a Reactive Film Composed of 2-hydroxyethyl Methacrylate and Glycidyl Methacrylate: Properties and Application in a Continuous Flow System. *Biochemical Engineering Journal* no. 3671, 1-10, 2002.
- [2] SUZUKI, Takahiro; TORIYAMA, Motohiro; HOSONO, Hideo and ABE, YOSHIHIRO. Application of a Microporous Glass-Ceramics with a Skeleton of $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ to Carriers for Immobilization Enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol.72, no. 5 384-391, 1991.
- [3] CHENG, T.W.; UENG, T.H. *et al.* Production of Glass-Ceramics from Incinerator Fly Ash, *Ceramics International*, no. 28, 779-783, 2002.
- [4] WYSZOMIRSKI, Piotr and BRYLSKA, Elzbieta. Fly Ash in Polish Building Ceramics – Threat or Proecology? *Applied Geochemistry*, Vol. 11, 351-353, 1996.
- [5] SUMMERS, J.B., The Estimation of Sugar in Diabetic Urine, Using dinitrosalicylic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, no. 62 vol. 2, 287-290, 1924.
- [6] KONIG, Joachim; GRASSER, Roland *et al.* Determination of Xylanase, β -Glucanase and Cellulase Activity. *Anal Bioanal Chem*, no.374, 80-87, 2002.
- [7] ENGQVIST, H., SCHULTZ, J. Loof *et al.* Chemical and Biological Integration of Mouldable Bioactive Ceramic Material Capable of Forming Apatite *in vivo* in Teeth, *Biomaterials*, no.25, 2781-2787, 2004.
- [8] CHEN, Yongjun; KANG, E.T. *et al.* Covalent Immobilization of Invertase Onto the Surface-Modified Polyaniline From Graft Copolymerization with Acrylic Acid. *European Polymer Journal*, no. 36, 2095-2103, 2000.

6. Figures and Tables

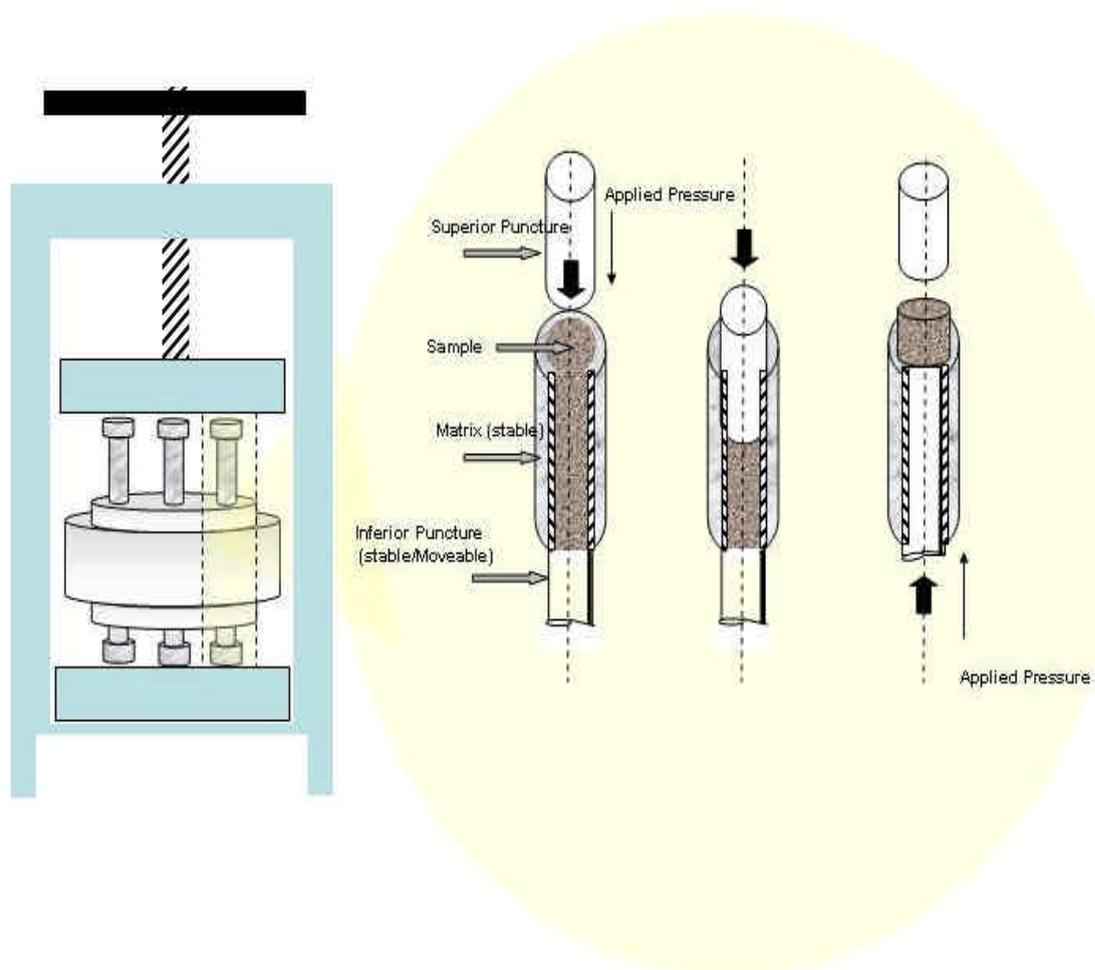


Figure 1. Conformational process uniaxial used for the synthesis of Ceramic Support UTPM

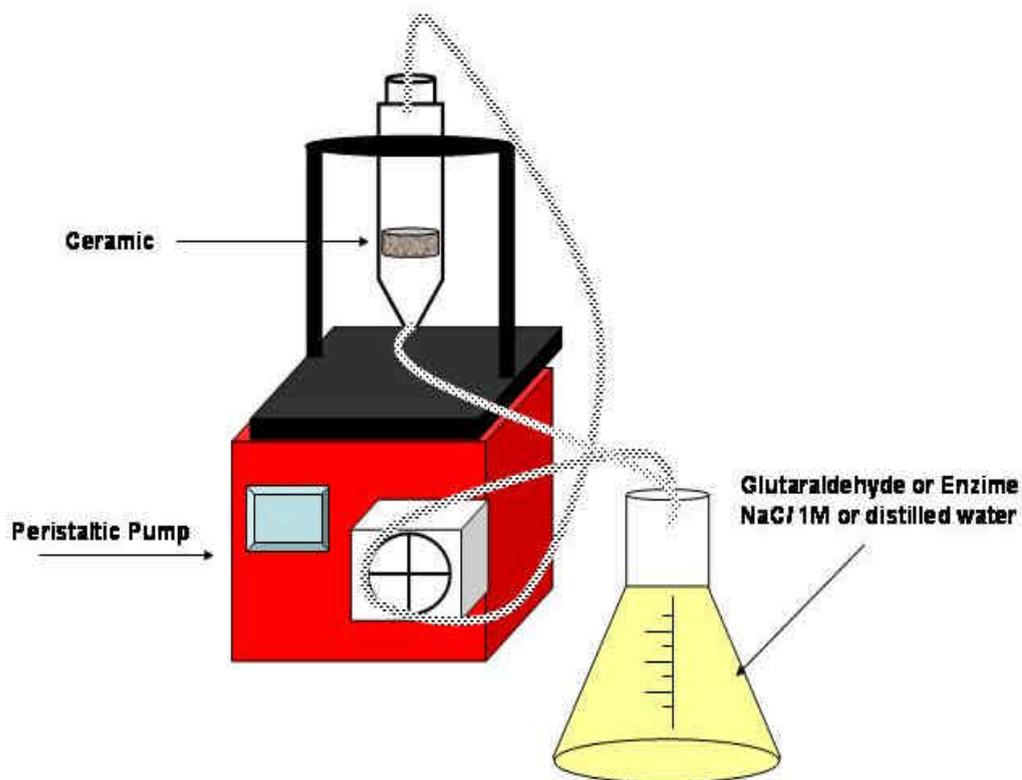


Figure 2 Apparatus used for process of enzymatic immobilization

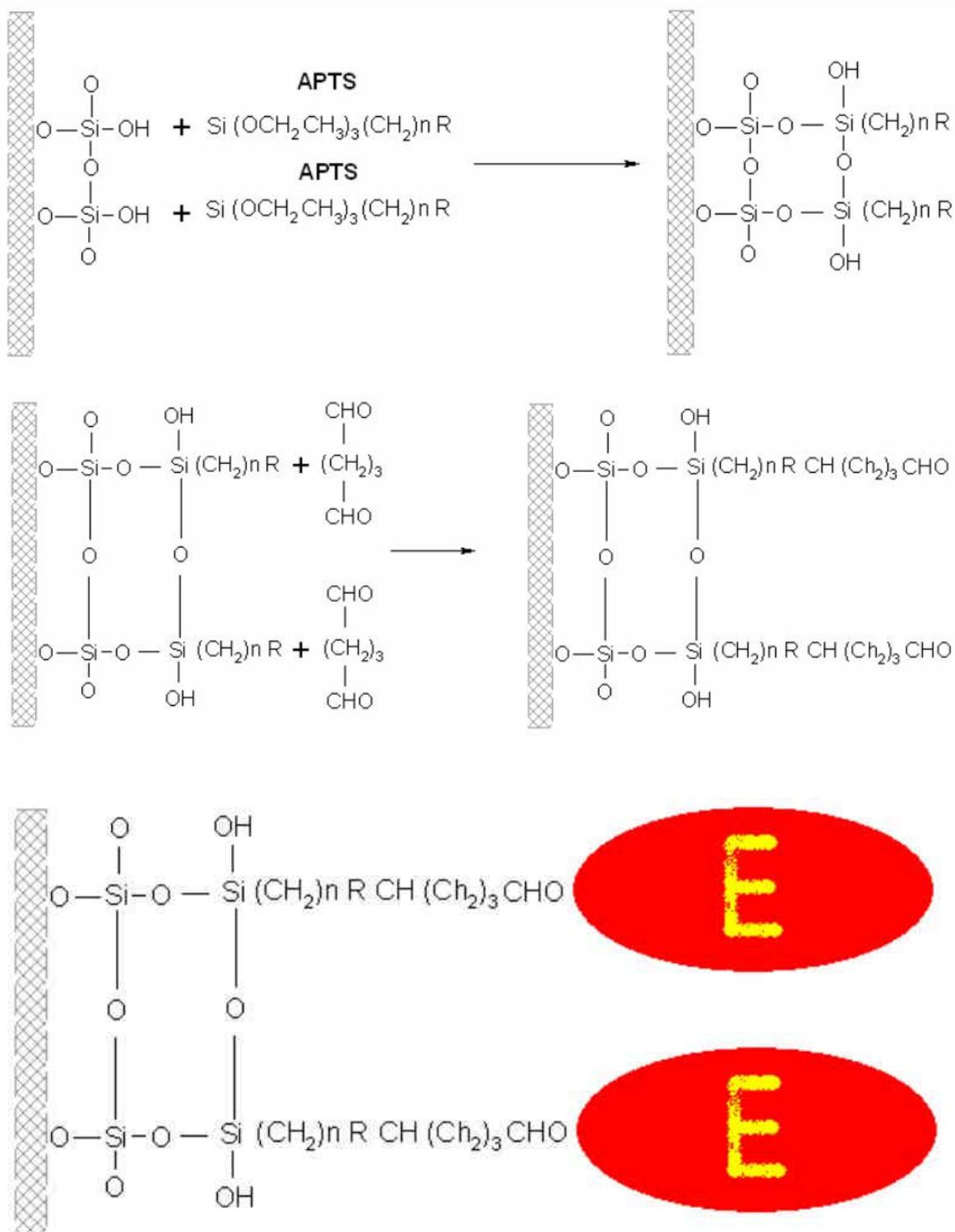


Figure 3 Chemistry Process of Enzymatic Immobilization onto Ceramic Surface

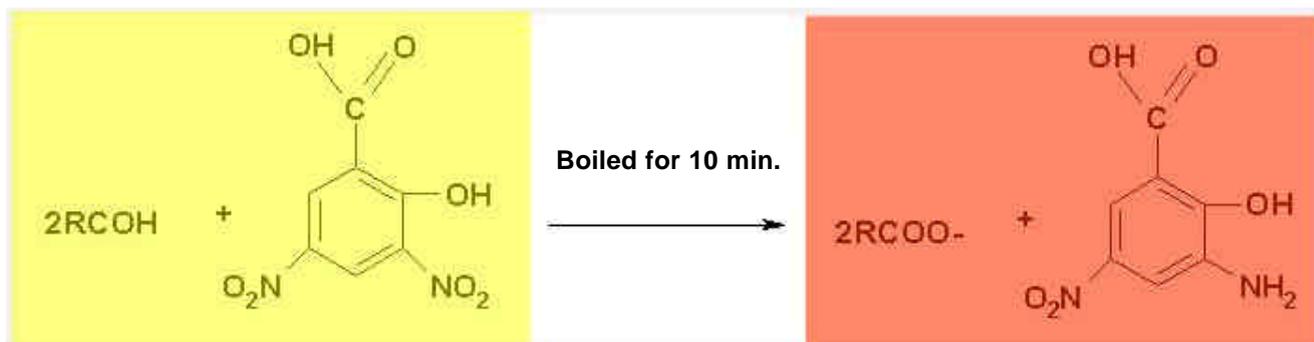


Figure 4.3,5- Dinitrosalicylic Acid Reduced Reaction.

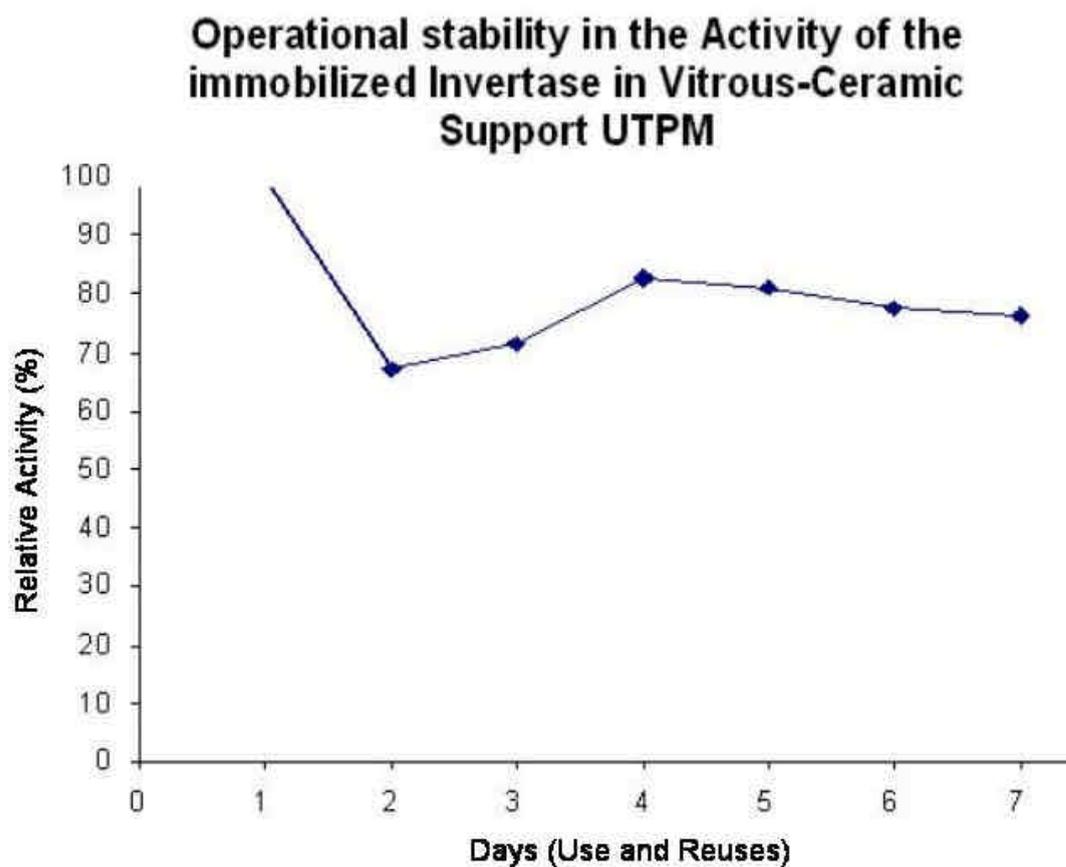


Figure 5 Graphic representation of immobilization stability and relative activity lost estimative.

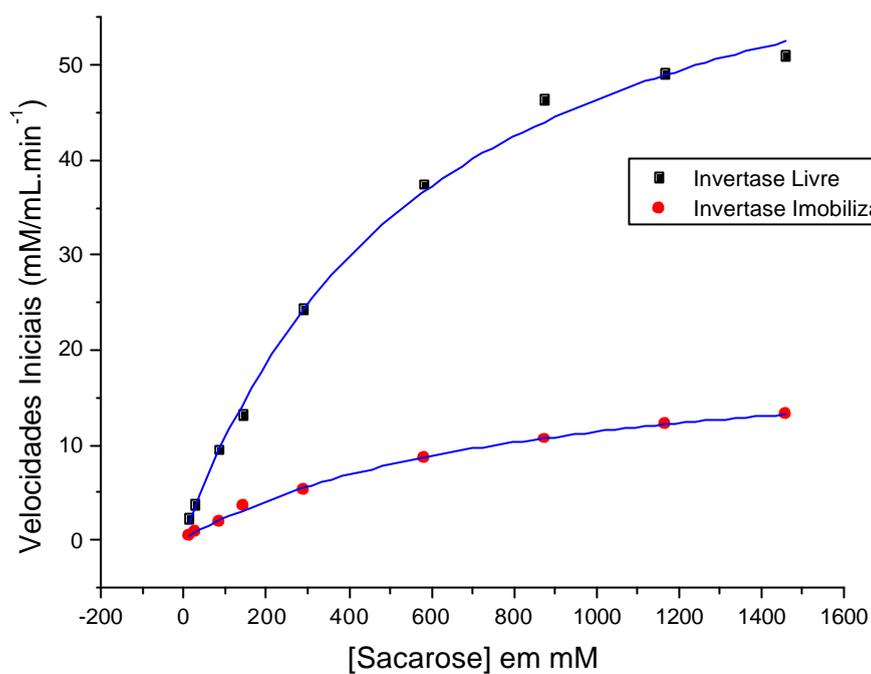


Figure 6 Effect of Sucrose Concentration for Free and Immobilized Invertase

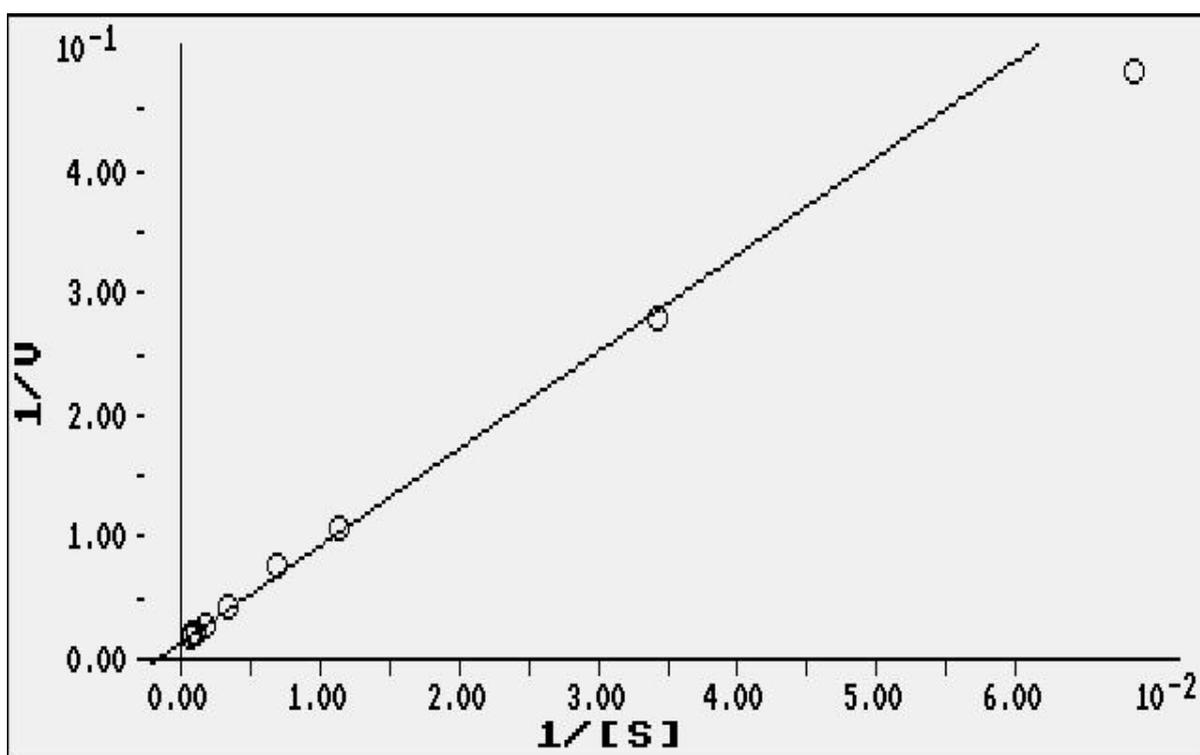


Figure 7 Lineweaver-Burk Plot for Free Invertase

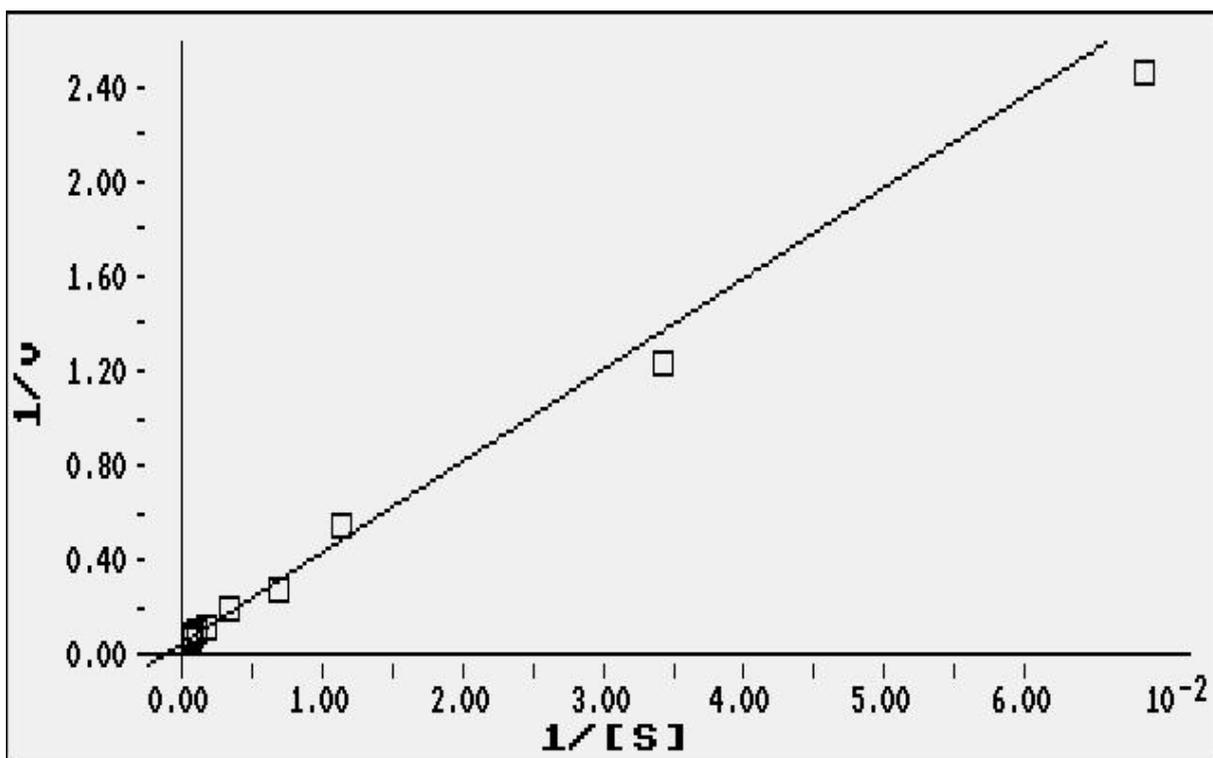


Figure 8 Lineweaver-Burk Plot for Immobilized Invertase

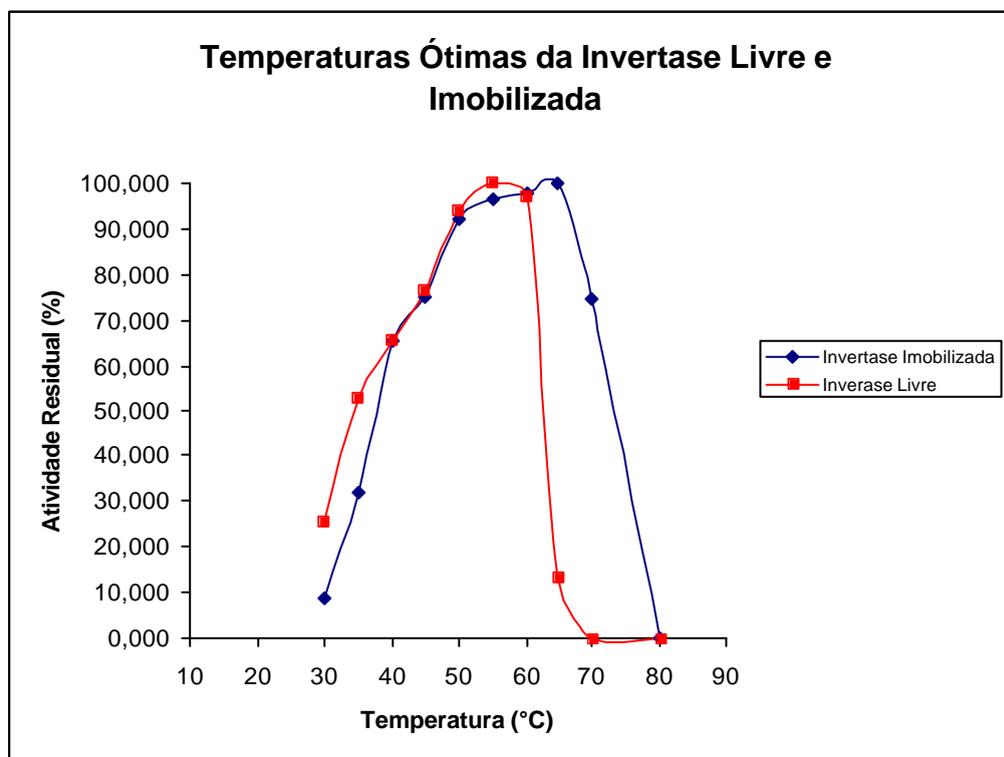


Figure 9 Optimun Temperature Plot for free and immobilized invertase

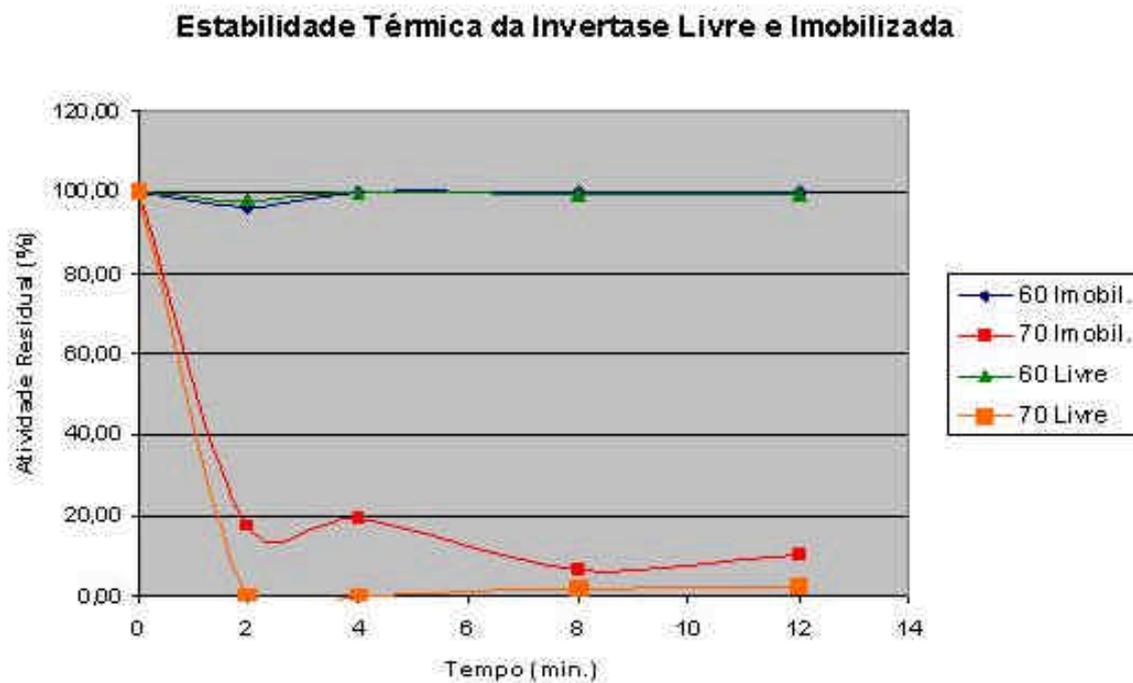


Figure 10 Termal Stability of free and immobilized invertase

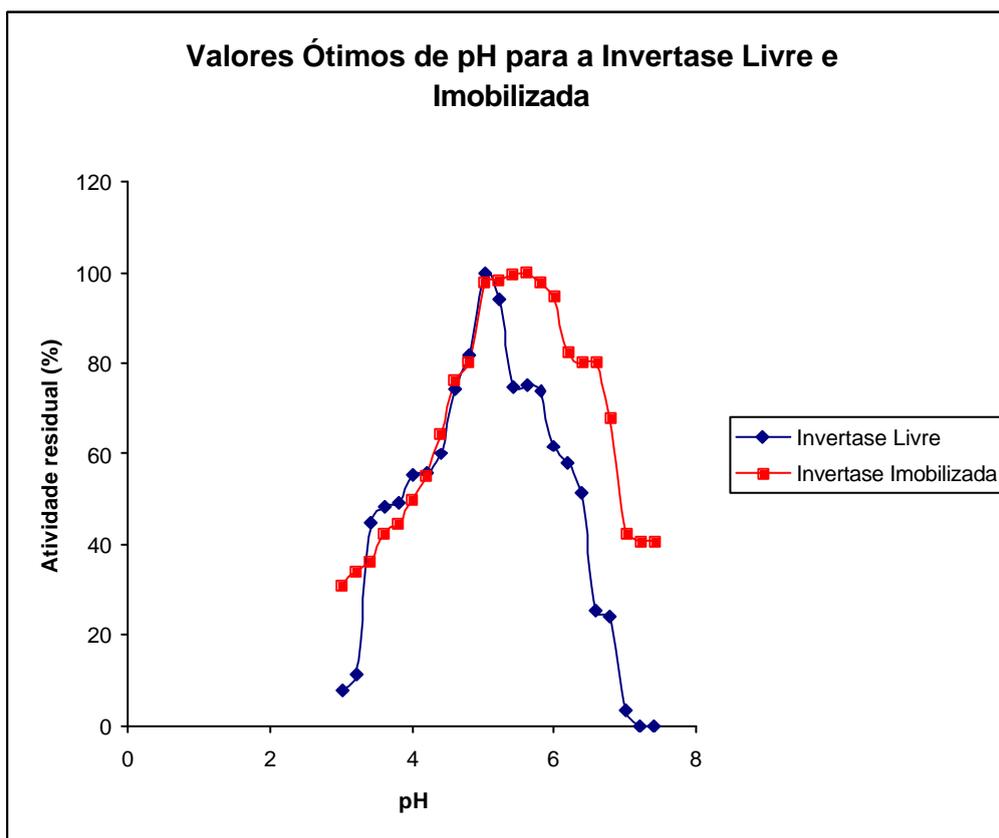


Figure 11 Effect of pH for invertase free and immobilized activity.

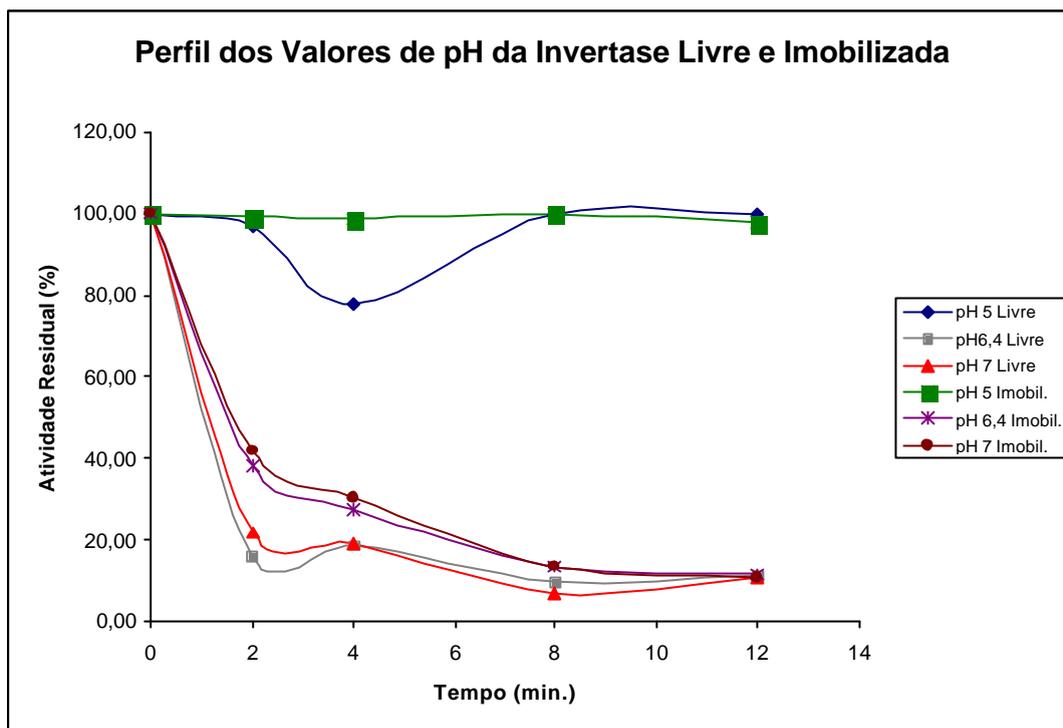


Figure 12 pH Stability of free and immobilized invertase

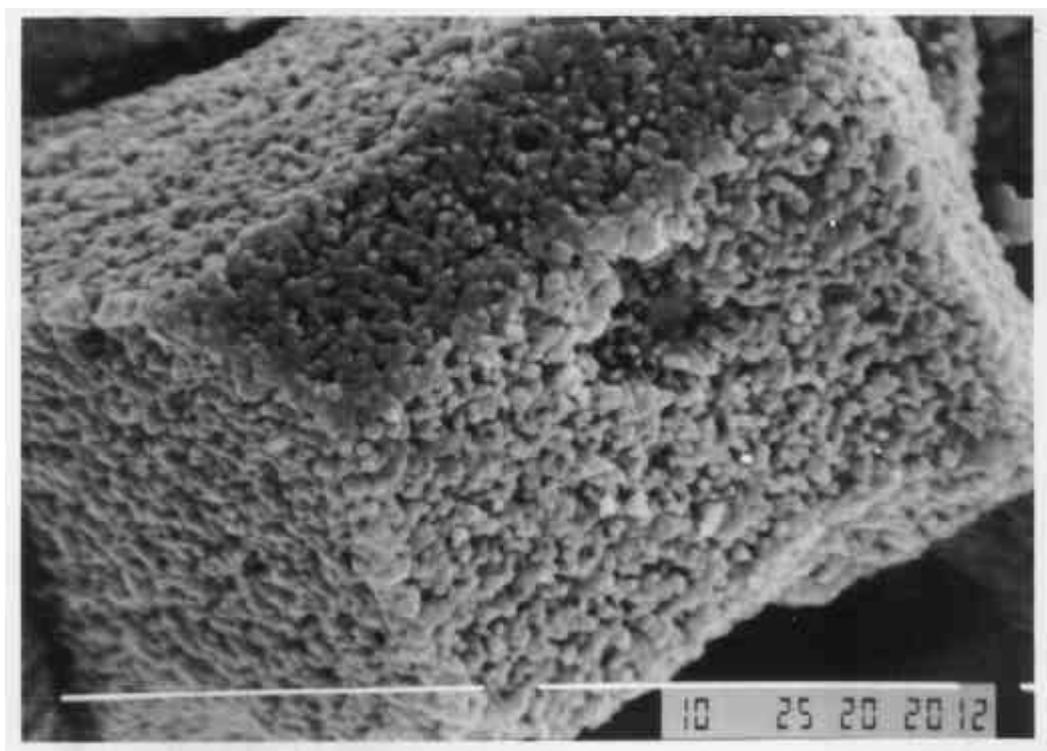


Figure 13 Structure Details of ash particle. This figure shows the high porosity promoted by cenospheres disposition, at magnitude 15000x

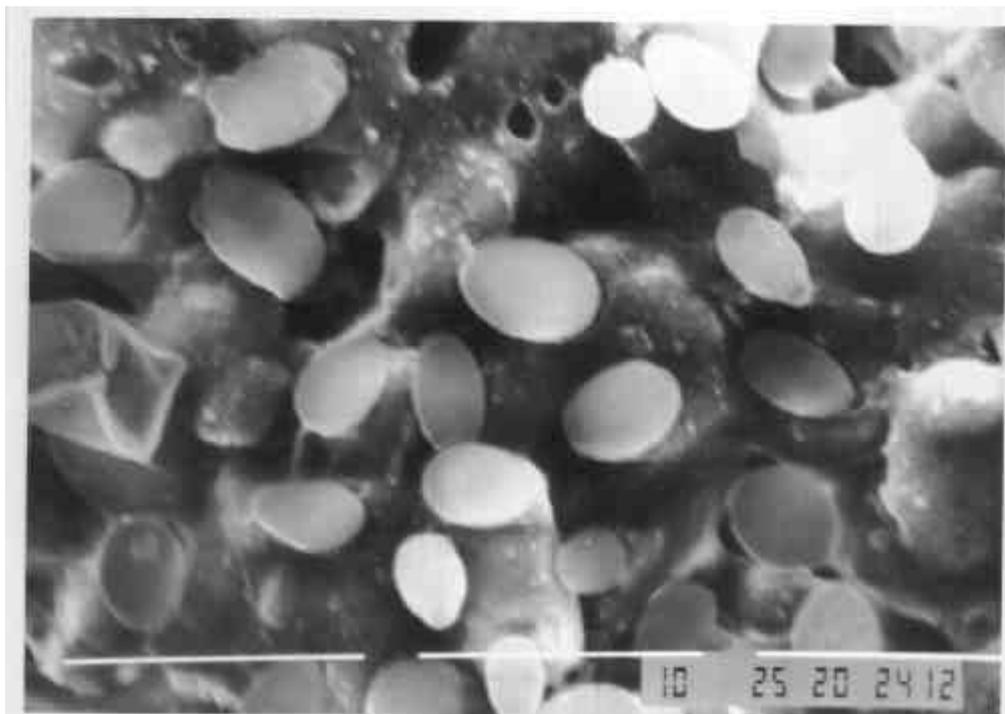


Figure 14 Surface details of immobilized support with yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, at magnitude 10000x

Table 1 Relationship between the APTS concentrations Buffers used in Immobilization and pH values.

APTS Concentration % (v/v) in Tolueno	Destilated water (pH corrected with (NaOH)	Sodium Phosphate Buffer (0,2M) pH 7,0	Sodium Citrate Buffer (0,1M) pH 4,5	Tris-HCl (0,5mM) pH 8,0
1%	totally broken	partially broken	partially broken	Totally broken
2%	totally broken	partially broken	partially broken	Totally broken
3%	totally broken	partially broken	partially broken	Totally broken
4%	totally broken	totally broken	partially broken	Totally broken
5%	partially broken	totally broken	partially broken	Partially broken

6. CONCLUSÕES

Diante da pesquisa realizada e dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- 1) A enzima imobilizada, apesar de modificar sua cinética, apresenta características Michaelianas semelhantes à livre, o que facilita suas estimativas na aplicação industrial;
- 2) Os resíduos da combustão de carvão mineral são viáveis para a produção de cerâmicas tradicionais e avançadas, podendo ser mais estudado em relação às suas aplicações na tecnologia de ponta como a associação de estruturas biológicas a dispositivos semicondutores (Biocerâmicas) para utilização em sensores de monitoramento online ou minirreatores;
- 3) Possibilidade de aplicação da tecnologia de silanização em Suportes Cerâmicos UTPM para imobilização de diversas proteínas (anticorpos e enzimas) e
- 4) O Suporte apresentou-se ser bastante competitivo e eficiente para a imobilização de enzimas com âmbito na aplicação industrial na construção de Biorreatores.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, L.M.O.; VITOLO, M. Characterization of Invertase Entrapped Into Calcium Alginate Beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, no. 81, 23-33, 1999.

ARSLAN, F.; CAYKARA, T. *et al.* The Effect of Gel Composition on the Adsorption of Invertase on Poly(acrylamide/maleic acid) Hydrogels, *Food Chemistry*, no.70, 33-38, 2000.

BARROS, J. Viana. Produção e Estudo da Microestrutura e Propriedade Mecânica da Cerâmica $B_{22}H_0ZrO_{5,5}$ a Base de Zircônia para a Fabricação de Cadinhos de Alta Temperatura, *Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica/UFPE*, 83 páginas, 2003.

BAYRAMOGLU, Gulay; ARICA, M. Yakup *et al.* Covalent Immobilisation of Invertase Onto a Reactive Film Composed of 2-hydroxyethyl Methacrylate and Glycidyl Methacryate: Properties and Application in a Continuous Flow System. *Biochemical Engineering Journal* no. 3671, 1-10, 2002.

BORRERO, M.A.V., PEREIRA, J.T.V., MIRANDA, E.E. An Enviromental Management Method for Sugar Cane Alcohol Production in Brazil, *Biomass and Bioenergy*, no.25, 287-299, 2003.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method of the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, no.72, 284-254, 1976.

BRITISH SUGAR – The Portal Site for Sugar Users. www.britishsugar.co.uk

CALLISTER, W.D. Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução, Editora LTC, 5° Ed., pp. 4, 64, 125, 301 e 302, 2002.

CHEN, Yongjun; KANG, E.T. *et al.* Covalent Immobilization of Invertase Onto the Surface-Modified Polyaniline From Graft Copolymerization with Acrylic Acid. *European Polymer Journal*, no. 36, 2095-2103, 2000.

CHENG, T.W.; UENG, T.H. *et al.* Production of Glass-Ceramics from Incinerator Fly Ash, *Ceramics International*, no. 28, 779-783, 2002.

CHU, Frederick K.; TAKASE, Kenji *et al.* Diverse Properties of External and Internal Forms of Yeast Invertase Derived from the Same Gene, *Biochemistry*, no.24, 6125-6132, 1985.

ENGQVIST, H., SCHULTZ, J. Loof *et al.* Chemical and Biological Integration of Mouldable Bioactive Ceramic Material Capable of Forming Apatite *in vivo* in Teeth, *Biomaterials*, no.25, 2781-2787, 2004.

EXPORTS OF PRODUCTS MADE FROM CORN – U.S. *Department of Commerce*, 2003 (www.corn.org/web/exports01.htm).

HADRIL, J. and Svec, F. Inversion of Sucrose with β -D-Fructofuranosidase (invertase) Immobilized on Bead DEAHp-Cellulose: Batch Process, *Enzyme Microbial Technology*, Vol. 3, 331-335, 1981.

IKEDI OBI, C.O., STEVENS M. and LATINWO, L. Immobilization of Linamarase on Non-Porous Glass Beads. *Process Biochemistry*, Vol.33 no.5, 491-494, 1998.

IMMOBILIZED ENZYMES, *Methods in Enzymology XLIV*, p. 139-142, Edited by Klaus Mosbach, p. 139-142.

KENNEDY, J. F. and WHITE, C.A. Principles of Immobilization of Enzymes, *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Edited by Alan Wiseman, Vol. 5, chapter 4, 147-207, 1984.

KONIG, Joachim; GRASSER, Roland *et al.* Determination of Xylanase, β -Glucanase and Cellulase Activity. *Anal Bioanal Chem*, no.374, 80-87, 2002.

MIYAZAKI, Masaya; KANENO, Jun; NAKAMURA, Hiroyuki; FUJII, Masayuki and MAEDA, Hideaki. Development of Enzyme-Immobilized Microchannel Reactor. *Proceedings of the 9th Congress of Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCCChE) and CHEMECA*, 2002, 130REV(2003).

MSC. MODULE FS 916, The University of Reading – Department of Food and Technology (www.fst.rdg.ac.uk).

NEUMANN, Nobert P. and LAMPEN, J. Oliver. Purification and Properties of Yeast Invertase, *Biochemistry*, Vol.6, no.2, 468-475, 1967.

SANTOS, R.P., J.L. Lima Filho *et al.* Preparação e Caracterização das Cerâmicas de Cinzas de Carvão Mineral, Pesquisa Apresentada no *XXVI ENFMC*, Caxambú/MG, Maio de 2003.

SILVA, N. I. Warpechowski da, CALARGE, L. M., CHIES, F. *et al.* Characterization of fly ash for ceramic use. *Cerâmica*, vol.45, no.296, p.184-187, Nov./Dec. 1999.

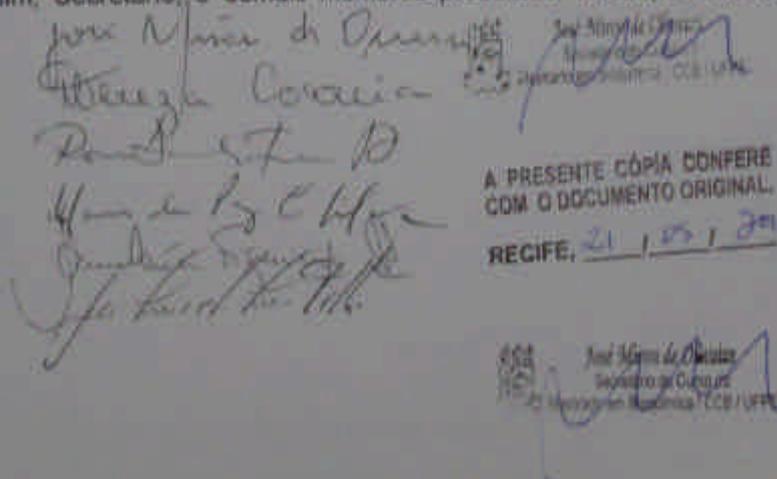
SUZUKI, Takahiro; TORIYAMA, Motohiro; HOSONO, Hideo and ABE, YOSHIHIRO. Application of a Microporous Glass-Ceramics with a Skeleton of $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ to Carriers for Immobilization Enzymes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol.72, no. 5 384-391, 1991.

WYSZOMIRSKI, Piotr and BRYLSKA, Elzbieta. Fly Ash in Polish Building Ceramics – Threat or Proecology? *Applied Geochemistry*, Vol. 11, 351-353, 1996.

ZHANG, S.; LEE, Jim Y. and Hong, L. Visualization of Particle Distribution in Composite Polymer Electrolyte System, *Journal of Power Sources*, no.126, 125-133, 2004.

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Alexandre Libanio Silva Reis**, realizada em 27 de fevereiro de 2004, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:25 minutos do dia 27 de fevereiro de 2004, foi realizada, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, em caráter privado, a defesa de dissertação de **Alexandre Libanio Silva Reis**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, Chefe do Depto. de Bioquímica, fez a apresentação do mestrando, de seu orientador, o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, de sua Orientadora Externa, Profa. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia, do Depto. de Biologia da UFRPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: José Luiz de Lima Filho, na qualidade de Presidente, Maria da Paz Carvalho da Silva, ambos do Depto. de Bioquímica, Ana Lúcia Figueiredo Porto, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE, e Rosa Amália Fireman Dutra, do Depto. de Patologia da UPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Imobilização de β -D-Fructofuranosidase em Suporte Vítreo-cerâmico (UTPM) Modificado para Obtenção de Açúcar Redutor**", 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 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação, o Sr. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para a Profa. Rosa Amália Fireman Dutra, em seguida para a Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto, e finalmente para a Profa. Maria da Paz Carvalho da Silva. Concluídas suas arguições, agradeceram e cumprimentaram o mestrando e seus orientadores. A sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso, na presença da Vice-Coordenadora. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovado**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes, Recife, 27 de fevereiro de 2004.



 José Luiz de Lima Filho, Presidente

 Maria da Paz Carvalho da Silva

 Ana Lúcia Figueiredo Porto

 Rosa Amália Fireman Dutra

 José Luiz de Lima Filho, Secretário

 Profa. Maria de Mascena Diniz Maia

 Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto

 Profa. Maria da Paz Carvalho da Silva

A PRESENTE CÓPIA CONFERE
 COM O DOCUMENTO ORIGINAL.
 RECIFE, 21 / 02 / 2004

Profa. Maria de Mascena Diniz Maia
 Secretária do Curso de
 Mestrado em Bioquímica UFRPE