

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – CAMPUS POÇOS DE CALDAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ROGÉRIO LOPES GARCIA**

**IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA DE *Aspergillus oryzae* IPT-301,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas / MG

2018

ROGÉRIO LOPES GARCIA

**IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA DE *Aspergillus oryzae* IPT-301,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito final para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

Poços de Caldas / MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca campus Poços de Caldas

G216i Garcia, Rogério Lopes.

Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligossacarídeos / Rogério Lopes Garcia. -- Poços de Caldas/MG, 2018.  
86 f. –

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2018.  
Bibliografia.

1. Análise enzimática. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. Reticulação. 4. Glutaral. 5. Transfrutossilacção. I. Perna, Rafael Firmani. II. Título.

CDD – 660

**ROGÉRIO LOPES GARCIA**

**IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA DE *Aspergillus oryzae* IPT-301,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

A banca examinadora abaixo assinada, aprova a dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Aprovado em: 28 de março de 2018.



Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG



Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo



Prof(a). Dr(a). Daniela Battaglia Hirata

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

*Dedico aos meus pais e  
aqueles que sempre estiveram  
comigo na realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À minha família por me proverem sempre mais do que o necessário para que atingisse meus objetivos.

À Any, por todo o companheirismo, paciência e incentivo ao longo deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pela dedicação, apoio, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli pelas palavras sábias no momento necessário.

Aos integrantes e parceiros do Laboratório de Bioprocessos, Marcela Oliveira, Thais Miranda, Raquel Pádua e José Pedro Prado. Ao Mestre Josivan Cunha pelos ensinamentos ao longo da pesquisa. Aos amigos Eduardo Paniguel, Alex Marquiti e Mauro Toledo por toda a ajuda e parceria ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso por todo o suporte fornecido. Ao Prof. Dr. Alfredo Maiorano, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Battaglia Hirata e Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira pelas valiosas contribuições ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus irmãos da família Matula, por me dar apoio e conseguirem tornar magníficos todos os dias em Poços de Caldas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Muito obrigado a todos!

*“O que está faltando neste exato momento?”*

*Rinzai*

## RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares de baixa caloria que apresentam diversos benefícios à saúde humana. São disponibilizados comercialmente mediante produção sintética, por reação de transfrutossilatação, utilizando enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9). Dentre os micro-organismos produtores desta enzima, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca como fonte potencialmente produtora, sintetizando FTase micelial (aderida a biomassa celular) com atividades hidrolítica ( $A_H$ ) e de transfrutossilatação ( $A_T$ ). A razão entre as atividades ( $A_T/A_H$ ) é um importante parâmetro que indica a predominância de  $A_T$  sobre  $A_H$ . A aplicação deste micro-organismo na produção de FOS pode ser aprimorada por meio da imobilização da biomassa por processo de reticulação visando aumentar a estabilidade da biomassa e possibilitar o seu reuso. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho centrou-se na imobilização da biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 utilizando glutaraldeído como agente de reticulação e caracterização quanto às suas propriedades catalíticas, assim como a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos e avaliação de sua estabilidade operacional na produção de FOS. A biomassa catalítica foi produzida por fermentação submersa aeróbia, em agitador orbital do tipo *Shaker* e meio de cultura sintético. Os ensaios de imobilização da biomassa produzida foram realizados por planejamento experimental do tipo DCCR 2<sup>2</sup> e o efeito de diferentes concentrações de glutaraldeído (GLU) e pH no meio de imobilização foram avaliados. As melhores respostas foram obtidas em pH 7,9 e concentração de GLU 2,1 % (v/v), com  $A_T$  e  $A_H$  iguais a  $821 \pm 28 \text{ U.g}^{-1}$  e  $126 \pm 10 \text{ U.g}^{-1}$ , respectivamente. Quando comparado o ganho de atividade por unidade de massa micelial com o processo de imobilização, foi observado um aumento de 14 % na  $A_T$ , redução de 40 % na  $A_H$  e aumento em 86 % da razão ( $A_T/A_H$ ). Estas mudanças nas atividades observadas após a imobilização são benéficas por favorecerem maiores rendimentos deste biocatalisador na produção de FOS. Assim, as biomassas livre e imobilizada foram caracterizadas. A biomassa livre apresentou os melhores resultados de atividade entre as temperaturas de 45 °C e 55 °C, enquanto as maiores  $A_T$  e razão ( $A_T/A_H$ ) para a biomassa imobilizada foram observadas entre 50 °C e 55 °C. Quanto à influência do pH, ambos os biocatalisadores apresentaram maiores  $A_T$  e razão ( $A_T/A_H$ ) em pH 5,5. Desta forma, a temperatura de 50 °C e o pH 5,5 foram fixados para se realizar a comparação dos biocatalisadores nos ensaios de estabilidade operacional. Os ensaios de estabilidade frente ao pH mostraram que ambos os biocatalisadores foram estáveis na faixa de pH entre 4,5 e 7,5. A análise de estabilidade térmica mostrou por meio dos parâmetros termodinâmicos avaliados que a imobilização da biomassa proporcionou um aumento da termoestabilidade, com a biomassa imobilizada passando a ter um tempo de meia vida a 50 °C de 5728,5 min, valor este 2,8 vezes maior que o observado para o tempo de meia vida da biomassa livre a 50 °C. A avaliação da cinética enzimática indicou que os modelos de Hill e de Michaelis-Menten se ajustaram satisfatoriamente ao comportamento da FTase de ambos os biocatalisadores. Foi observada a redução de  $K_{0,5}$ , de 97,8 para 85,9  $\text{g.L}^{-1}$  e uma redução de  $K_m$ , de 121,5 para 98,5  $\text{g.L}^{-1}$  após a imobilização da biomassa catalítica, indicando um aumento da afinidade entre enzima e substrato com a imobilização. A aplicação dos biocatalisadores em ensaios de estabilidade operacional mostrou que a biomassa imobilizada foi estável após 12 ciclos de produção de FOS (atividade relativa de  $88,9 \pm 2,2$  % da atividade inicial), enquanto a atividade da biomassa livre caiu após 12 ciclos de produção para aproximadamente 50 % da atividade inicial, demonstrando assim o ganho de aplicabilidade da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 na produção de FOS com o processo de imobilização realizado.

**Palavras-chave:** Frutossiltransferase micelial. *Aspergillus oryzae*. Reticulação. Glutaraldeído. Transfrutossilatação. Imobilização. Frutooligossacarídeos.

## ABSTRACT

The fructooligosaccharides (FOS) are sugars of low calorie that have several benefits to human health. They are commercially available through synthetic production, by transfructosylation reaction, using microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9). Among the microorganisms that produce this enzyme, *Aspergillus oryzae* IPT-301 stand out as potentially producer source, synthesizing mycelial FTase (adhered to cellular biomass) with hydrolytic activity ( $A_H$ ) and transfructosylation activity ( $A_T$ ). The ratio between activities ( $A_T/A_H$ ) is an important parameter that indicates the predominance of  $A_T$  over  $A_H$ . The application of this microorganism to the production of FOS can be improved by the immobilization of the biomass by cross-linking process, aiming to increase the stability of the biomass and to enable its reuse. In this context, the objective of the present work was focused on the immobilization of *Aspergillus oryzae* IPT-301 biomass using glutaraldehyde (GLU) as cross-linking agent and the characterization of the catalytic properties of the immobilized enzyme, as well as the determination of kinetic and thermodynamic parameters of the enzyme and avaluation of its operational stability. The catalytic biomass was produced by aerobic submerged fermentation on shaker type orbital in synthetic culture medium. The immobilization tests were performed by central rotatable composite design  $2^2$  and the effect of different concentrations glutaraldehyde concentrations and pH in the immobilization were evaluated. The best responses were obtained at pH 7.9 and concentration of GLU 2.1% (v/v), with  $A_T$  and  $A_H$  equal to  $821 \pm 28 \text{ U.g}^{-1}$  and  $126 \pm 10 \text{ U.g}^{-1}$ , respectively. When the gain of activity per unit of mycelial mass with the process of immobilization was compared, there was a 14% increase in  $A_T$ , a 40% reduction in  $A_H$  and an 86% increase of the ratio ( $A_T/A_H$ ). These changes in activities observed after immobilization are favoring higher yields of this biocatalyst in FOS production. Thus the free and immobilized biomass were characterized. The free biomass showed the best results of activity between the temperatures of 45 °C and 55 °C, while the higher  $A_T$  and ratio ( $A_T/A_H$ ) for the immobilized biomass were observed between 50 °C and 55 °C. As for pH influence, both biocatalysts had higher  $A_T$  and ratio ( $A_T/A_H$ ) at pH 5.5. Thus, the temperature of 50 °C and pH 5.5 were set for the comparison of the biocatalysts in the operational stability tests. The pH stability tests showed that both biocatalysts were stable in the pH range between 4.5 and 7.5. Thermal stability analysis showed through the thermodynamic parameters evaluated that the immobilization of biomass provided an increase of thermostability, with the immobilized biomass having a half-life time at 50 °C of 5728,5 min, wich is 2.8 times higher than that observed for the half-life time of free biomass at 50 °C. The evaluation of the enzymatic kinetics indicated that the Hill and Michaelis-Menten models fit satisfactorily to the behavior of the FTase of both biocatalysts. The reduction of  $K_{0.5}$  was observed, from 97.8 to 85.9  $\text{g.L}^{-1}$ , and a reduction of  $K_m$ , from 121.5 to 98,5  $\text{g.L}^{-1}$  after the immobilization of the catalytic biomass, indicating an increase in the affinity between enzyme and substrate with the immobilization . The application of biocatalysts in stability tests showed that the immobilized biomass was stable after up to 12 cycles of FOS production (relative activity of  $88.9 \pm 2.2 \%$  of the initial activity), while free biomass activity fell after 12 production cycles to approximately 50% of initial activity, demonstrating the gain of applicability of the catalytic biomass of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in the production of FOS with the immobilization process carried out.

**Keywords:** Mycelial fructosyltransferase. *Aspergillus oryzae*. Cross-linking. Glutaraldehyde. Transfructosylation. Immobilization. Fructooligosaccharides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema dos métodos de imobilização celular. ....	28
Figura 2 -	Diagrama de Pareto para as variáveis concentração de glutaraldeído e pH na atividade de transfrutossilacção da biomassa imobilizada. ....	46
Figura 3 -	Atividade de transfrutossilacção em função da concentração de glutaraldeído e do pH durante a etapa de imobilização: (A) superfície de resposta e (B) curva de contorno. ....	48
Figura 4 -	Diagrama de Pareto para as variáveis concentração de glutaraldeído e pH na atividade hidrolítica da biomassa (micélio) imobilizada. ....	49
Figura 5 -	Atividade hidrolítica em função do pH e da concentração de glutaraldeído durante a etapa de imobilização: (A) superfície de resposta e (B) curva de contorno. ....	51
Figura 6 -	Influência da temperatura nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilacção ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> , pH 5,5. ....	56
Figura 7 -	Influência da temperatura nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilacção ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa imobilizada. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> , pH 5,5. ....	57
Figura 8 -	Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutossilacção residual da FTase aderida à biomassa (micélio) livre. ....	59
Figura 9 -	Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutossilacção residual da FTase aderida à biomassa (micélio) imobilizada. ....	59
Figura 10 -	Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de inativação ( $E_D$ ) da FTase presente nas biomassas catalíticas livre e imobilizada. ....	60
Figura 11 -	Influência do pH nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilacção ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> , a 50 °C. ....	63
Figura 12 -	Influência do pH nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilacção ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa (micélio) imobilizada. Meio	

	reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> , a 50 °C. ....	64
Figura 13 -	Estabilidade da FTase micelial presente nas biomassas catalíticas livre e imobilizada frente ao pH. Incubação por 24 horas em solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> a 4 °C. ....	66
Figura 14 -	Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica, de transfrutossilção e na razão entre atividades (A <sub>T</sub> /A <sub>H</sub> ) da FTase micelial aderida a biomassa livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> pH 5,5 a 50 °C. ....	67
Figura 15 -	Comparação dos resultados experimentais e previstos pelos modelos cinéticos de Hill e Michaelis-Menten para a FTase micelial aderida à biomassa livre. ....	69
Figura 16 -	Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica, de transfrutossilção e na razão entre atividades (A <sub>T</sub> /A <sub>H</sub> ) da FTase micelial aderida a biomassa imobilizada. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> pH 5,5 a 50 °C. ....	70
Figura 17 -	Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo cinético de Hill e Michaelis-Menten para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada. ....	71
Figura 18 -	Avaliação da estabilidade operacional das biomassas livre e imobilizada ao decorrer de 12 ciclos batelada, totalizando 12 horas de reação de transfrutossilção. Meio reacional constituído por 3,7 mL de solução de sacarose 63,6 % (m/v) e 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> pH 5,5, a 50 °C. ....	74
Figura 19 -	Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais (ART). ....	86
Figura 20 -	Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G). ....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Micro-organismos produtores de FTase EC 2.4.1.9.....	18
Tabela 2 -	Volumes de tampão tris-acetato 0,2 mol.L <sup>-1</sup> e glutaraldeído 25 % (v/v) adicionados para realização dos ensaios de otimização das atividades enzimáticas .....	36
Tabela 3 -	Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais.....	37
Tabela 4 -	Matriz do delineamento e respostas para otimização da imobilização da biomassa. ....	45
Tabela 5 -	Efeitos estimados, erro padrão e <i>p-valor</i> para avaliação dos efeitos da concentração de glutaraldeído e pH na atividade de transfrutossilação após a etapa de imobilização da biomassa.....	46
Tabela 6 -	Resultado da análise de variância para a regressão quadrática com interação para a avaliação dos efeitos de pH e concentração de glutaraldeído na atividade de transfrutossilação da biomassa (micélio) imobilizada.....	47
Tabela 7 -	Efeitos estimados, erro padrão e <i>p-valor</i> para avaliação dos efeitos da concentração de glutaraldeído e pH na atividade hidrolítica após a etapa de imobilização da biomassa.....	48
Tabela 8 -	Resultado da análise de variância para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos de pH e concentração de glutaraldeído na atividade hidrolítica da biomassa imobilizada.....	50
Tabela 9 -	Valores de atividades enzimáticas (transfrutossilação e hidrolítica) para as biomassas livre e imobilizada.....	52
Tabela 10 -	Resultados obtidos na determinação do teor de massa seca presente no micélio úmido.....	54
Tabela 11 -	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a FTase presente nas biomassas livre e imobilizada, incubada em diferentes temperaturas.....	60
Tabela 12 -	Coeficiente de determinação de erros obtidos para diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial aderida à biomassa livre.....	68
Tabela 13 -	Parâmetros cinéticos para a FTase micelial aderida à biomassa livre.....	69
Tabela 14 -	Coeficiente de determinação de erros obtidos para diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada.....	71
Tabela 15 -	Parâmetros cinéticos para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada.....	72

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Frutooligossacarídeos .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Síntese enzimática de FOS por frutossiltransferase.....</b>	<b>19</b>
3.2.1	<i>Reação e atividade de transfrutosilação (<math>A_T</math>).....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Reação e atividade hidrolítica (<math>A_H</math>).....</i>	<i>20</i>
3.2.3	<i>Razão (<math>A_T/A_H</math>) .....</i>	<i>20</i>
<b>3.3</b>	<b>Produção de FOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Cinética enzimática .....</b>	<b>21</b>
3.4.1	<i>Aspectos gerais .....</i>	<i>21</i>
3.4.2	<i>Efeitos da temperatura na cinética enzimática.....</i>	<i>23</i>
3.4.3	<i>Estabilidade térmica enzimática.....</i>	<i>24</i>
3.4.4	<i>Efeitos do pH na cinética enzimática.....</i>	<i>25</i>
<b>3.5</b>	<b>Imobilização de enzimas e células .....</b>	<b>26</b>
<b>3.6</b>	<b>Métodos de imobilização de células.....</b>	<b>27</b>
3.6.1	<i>Ligação a um suporte.....</i>	<i>28</i>
3.6.2	<i>Aprisionamento .....</i>	<i>29</i>
3.6.3	<i>Reticulação entre as células .....</i>	<i>30</i>
3.6.3.1	<i>Glutaraldeído.....</i>	<i>30</i>
<b>3.8</b>	<b>Imobilização da FTase .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção da biomassa catalítica.....</b>	<b>35</b>
4.1.1	<i>Micro-organismo e condições de cultivo.....</i>	<i>35</i>
4.1.2	<i>Meio de cultura .....</i>	<i>35</i>
4.1.3	<i>Fermentação submersa.....</i>	<i>35</i>
<b>4.2</b>	<b>Imobilização da biomassa catalítica .....</b>	<b>36</b>
4.2.1	<i>Otimização das atividades enzimáticas em função do pH de imobilização e concentração de glutaraldeído .....</i>	<i>36</i>
4.2.2	<i>Imobilização da biomassa catalítica (micélio) com glutaraldeído.....</i>	<i>37</i>
<b>4.3</b>	<b>Atividade enzimática e quantificação de açúcares.....</b>	<b>38</b>
4.3.1	<i>Determinação das atividades hidrolítica e de transfrutosilação miceliais .....</i>	<i>38</i>
4.3.2	<i>Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART).....</i>	<i>39</i>
4.3.3	<i>Determinação da concentração de glicose.....</i>	<i>40</i>

4.3.4	<i>Determinação do teor de massa efetiva (<math>m_{ef}</math>).....</i>	40
<b>4.4</b>	<b>Caracterização das biomassas catalíticas livre e imobilizada.....</b>	<b>41</b>
4.4.1	<i>Influência da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutosilação.....</i>	41
4.4.2	<i>Ensaio de estabilidade térmica das biomassas catalíticas livre e imobilizada e determinação dos parâmetros termodinâmicos.....</i>	41
4.4.3	<i>Influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutosilação .....</i>	42
4.4.4	<i>Ensaio de estabilidade ao pH das biomassas catalíticas livre e imobilizada.....</i>	42
4.4.5	<i>Influência da concentração de substrato e determinação dos parâmetros cinéticos .....</i>	42
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da estabilidade operacional das biomassas catalíticas livre e imobilizada visando a produção de FOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Estudos de imobilização da biomassa catalítica.....</b>	<b>44</b>
5.1.1	<i>Otimização das atividades enzimáticas em função do pH de imobilização e concentração de glutaraldeído por planejamento experimental.....</i>	44
5.1.1.1	<i>Atividade de transfrutosilação (<math>A_T</math>) .....</i>	45
5.1.1.2	<i>Atividade hidrolítica (<math>A_H</math>).....</i>	48
5.1.1.3	<i>Razão entre as atividades de transfrutosilação e hidrolítica (<math>A_T/A_H</math>) .....</i>	51
5.1.2	<i>Comparação das atividades enzimáticas antes e após a imobilização da biomassa catalítica .....</i>	52
5.1.3	<i>Determinação do teor de massa efetiva (<math>m_{ef}</math>) no micélio úmido .....</i>	54
<b>5.2</b>	<b>Estudos de caracterização das biomassas catalíticas livre e imobilizada .....</b>	<b>55</b>
5.2.2	<i>Estabilidade térmica das biomassas catalíticas livre e imobilizada e determinação dos parâmetros termodinâmicos.....</i>	58
5.2.3	<i>Influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutosilação .....</i>	62
5.2.4	<i>Efeito do pH na estabilidade das biomassas catalíticas livre e imobilizada.....</i>	65
5.2.5	<i>Efeito da concentração de substrato nas atividades das biomassas catalíticas livre e imobilizada e determinação dos parâmetros cinéticos.....</i>	67
<b>5.3</b>	<b>Estudos de estabilidade operacional.....</b>	<b>73</b>
5.3.1	<i>Avaliação da estabilidade operacional das biomassas catalíticas livre e imobilizada visando a produção de FOS .....</i>	73
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos mais saudáveis e com baixo valor calórico na dieta de carboidratos tem se intensificado devido aos reflexos de uma sociedade preocupada com a saúde e qualidade de vida. Esta mudança de hábitos alimentares tem despertado na indústria alimentícia o interesse pela pesquisa, desenvolvimento e produção dos chamados edulcorantes alternativos, os quais fazem parte da composição nutricional de diversos produtos introduzidos no mercado. Em 2015, o mercado internacional de alimentos funcionais foi estimado em cerca de 30 a 60 bilhões de dólares, o que representa 3% do mercado total de alimentos (WANG, 2015). Entre os alimentos funcionais, tem-se os edulcorantes alternativos, dos quais os frutooligosacarídeos (FOS), produzidos a partir de reações de transfrutossilacção da sacarose devido a atuação de enzimas como as frutossiltransferases (FTases, E.C.2.4.1.9) se destacam por serem prebióticos, não calóricos, não cariogênicos, reduzem o colesterol total e auxiliarem na proliferação das bifidobactérias no cólon humano (VAŇKOVÁ et al., 2008). Os FOS se tratam de um dos prebióticos mais comumente comercializados (NOBRE et al., 2018). Ocorrem naturalmente em frutas e hortaliças, entretanto, a sua produção, via síntese enzimática de origem microbiana, é bem mais difundida industrialmente por proporcionarem menores custos de produção (FORTES; MUNIZ, 2010; WANG, 2015).

Diversos organismos são reportados na literatura como produtores da FTase, com destaque para os fungos *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus aculeatus* e *Rhodotorula diarensis* (AGUIAR-OLIVEIRA e MAUGERI, 2010; CUNHA, 2017; GHAZI et al., 2005; L'HOCINE et al., 2000;). Entre estes, o *Aspergillus oryzae* IPT-301 se destaca por produzir a FTase com elevadas atividades de transfrutossilacção, na forma extracelular e aderida ao seu micélio (biomassa). A produção da FTase aderida ao micélio do micro-organismo é de grande interesse de estudo por possibilitar seu uso como biocatalisador do tipo células íntegras (CUNHA, 2017).

Apesar do acentuado crescimento mundial no mercado de FOS e o baixo custo da sacarose, o Brasil continua importando grande parte dos frutooligosacarídeos que necessita para a aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Ainda há uma carência no país por processos biotecnológicos adequados e prontos para a aplicação industrial. Uma das possíveis formas de intensificar a produção é por meio do desenvolvimento de processos utilizando a enzima frutossiltransferase imobilizada, uma vez que o processo de imobilização pode favorecer diversas propriedades, entre elas, o aumento da estabilidade física, possibilidade de uso da

enzima em uma faixa mais ampla de condições operacionais e possibilidade de reuso do biocatalisador, sendo estas características de grande importância para a aplicação industrial (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005a). De maneira similar, a imobilização de células visa aumentar a estabilidade celular e possibilitar sua utilização como biocatalisador. Podem ser promovidas melhorias operacionais similares à imobilização de enzimas, como o aumento do rendimento, produtividade e estabilidade, tornar mais fácil a separação entre o biocatalisador e o meio reacional reduzindo os custos com a recuperação e reciclo de células, além de diminuir as exigências para armazenamento por promover uma maior estabilidade ao conjunto célula-enzima. Em contrapartida, a imobilização pode acarretar em maiores custos de investimentos, impor limitações difusionais aos reagentes e produtos ou até mesmo causar desativação do biocatalisador e, portanto, um estudo direcionado à cada técnica aplicada a cada micro-organismo deve ser feito (KRASŇAN et al., 2016; SHULER; KARGI, 2002). De acordo com Canilha, Carvalho e Silva (2006) a imobilização de células pode trazer mais vantagens que a imobilização de enzimas, por eliminar a necessidade de extrair a enzima do micro-organismo para posterior fixação em um suporte. Com a imobilização de células ocorre o aproveitamento da estrutura natural em que a enzima já está fixada.

Entre as diversas técnicas de imobilização, a reticulação entre as células possui a vantagem de aproveitar a própria estrutura celular como um suporte e não exigir o uso de um segundo suporte físico, necessitando apenas de um agente químico que promova ligações cruzadas entre as células, como o glutaraldeído (MIGNEAULT et al., 2004a). Fazendo uso de glutaraldeído para reticulação de lipase aderida ao micélio de *Aspergillus flavus*, Long et al. (1996) obtiveram um aumento da estabilidade térmica e da resistência da enzima à extração por água, possibilitando o reuso da biomassa reticulada por até 13 ciclos sem queda de atividade. Resultados similares também foram obtidos por Sun et al. (2010b) no estudo da metanólise para produção de biodiesel. Por meio da reticulação da biomassa de *Rhizopus oryzae* com glutaraldeído, foi obtido um aumento da estabilidade das células, de forma que o micro-organismo, que antes apresentava apenas 10 % da atividade inicial após 10 ciclos, passou a apresentar alta atividade na metanólise para produção de biodiesel por até 15 ciclos de produção sem considerável queda de atividade.

A imobilização da FTase na forma micelial já foi estudada por alguns autores. Chien, Lee e Lin (2001) estudaram a imobilização micelial de *Aspergillus japonicus* em glúten resultando em um biocatalisador com rendimento satisfatório na produção de FOS e estável em operações de longa duração. Ganaie et al. (2014) estudaram a imobilização da FTase micelial de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364 em quitosana e alginato, a qual tornou possível o reuso da

biomassa de *Aspergillus flavus* para a produção de FOS. Uma abordagem similar a esta foi realizada por Huang et al. (2016) com o micro-organismo *Aspergillus aculeatus*, também tornando possível o reuso do biocatalisador na produção de FOS. Todos estes trabalhos realizaram a imobilização da biomassa por meio da técnica de aprisionamento (encapsulamento). Alguns autores buscaram a imobilização da biomassa através da colonização do micro-organismo em suportes durante a etapa de fermentação, como os trabalhos de Mussatto et al. (2009) e Castro et al. (2017). Não foram encontrados trabalhos estudando a aplicação da técnica de reticulação da biomassa celular em um processo que tenha como objetivo a produção de FOS. Além disso, não há trabalhos envolvendo o estudo da imobilização da biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por nenhuma técnica de imobilização. Dessa forma, a aplicação da técnica de reticulação à biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 concilia o uso de um método de imobilização ainda não explorado e um micro-organismo cuja imobilização ainda não foi avaliada, apresentando assim a possibilidade de obtenção de um biocatalisador inédito para a produção de FOS.

Portanto, diante deste contexto, este trabalho visou realizar o estudo da imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, rica em FTase micelial, por meio de sua reticulação usando glutaraldeído como agente promotor. A biomassa imobilizada também foi caracterizada com relação ao pH, temperatura e concentração de substrato do meio reacional, assim como avaliada quanto às estabilidades térmica, frente ao pH e operacional para a produção de FOS.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi imobilizar, por reticulação, a biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301, rica em FTase micelial, utilizando glutaraldeído como agente reticulante, assim como caracterizar as propriedades catalíticas da biomassa imobilizada e avaliar sua estabilidade operacional para a produção de FOS a partir da sacarose.

### 2.2 Objetivos específicos

Visando atingir o objetivo geral, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- a) Produzir a biomassa catalítica, rica em FTase micelial, de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa aeróbia utilizando meio de cultura sintético;
- b) Imobilizar a biomassa microbiana produzida com glutaraldeído por meio do processo de reticulação;
- c) Avaliar os efeitos do pH e da concentração de glutaraldeído durante a reação de imobilização por meio da técnica de planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional (DCCR);
- d) Determinar e avaliar as atividades hidrolítica ( $A_H$ ) e de transfrutossilção ( $A_T$ ) das biomassas livre e imobilizada, assim como a razão entre as atividades ( $A_T/A_H$ ) para ambos os biocatalisadores;
- e) Caracterizar as propriedades catalíticas e obter os parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a biomassa livre e imobilizada de acordo com o melhor resultado obtido no item iii.
- f) Avaliar o desempenho da biomassa imobilizada (estabilidade operacional) para diferentes ciclos em batelada visando a produção de FOS de acordo com os melhores resultados obtidos no item v.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose com grau de polimerização variando entre 2 e 20, consistindo em uma molécula de sacarose alongada por uma cadeia de unidades frutossil. Os FOS ocorrem mais comumente nas formas de 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e 1-β-frutofuranosilnistose (GF<sub>4</sub>), nos quais a unidade frutossil (F) são ligadas a molécula de sacarose terminal (GF) através de ligações glicosídicas β-(2→1) (YUN, 1996). Por não serem digeridos pela maioria das bactérias orais e intestinais, estes edulcorantes são prebióticos, considerados não cariogênicos e não calóricos (BARBOSA, 2007). Recomenda-se a ingestão diária de aproximadamente 10 g de FOS para promover seu efeito benéfico à flora intestinal. Valores mais altos, como 20 g de FOS por dia podem resultar em efeitos indesejados como aumento da flatulência e de ruídos intestinais.

OS FOS foram introduzidos no mercado primeiramente pela Meiji Seika Cia, em 1984, no Japão, país este que possui um dos maiores mercados comerciais de FOS. O seu valor comercial é alto, chegando a custar cerca de U\$ 200 por quilograma (PASSOS; PARK, 2003; SILVA, 2008). Por serem dificilmente hidrolisados pelas enzimas digestivas, os FOS se tratam de um alimento seguro para pessoas diabéticas por não proporcionarem um aumento no teor de glicose sanguínea (YUN, 1996).

Como edulcorantes, os FOS demonstram sabor similar ao da sacarose; contudo, suas propriedades funcionais destacam sua aplicabilidade na indústria alimentícia. Sabe-se que as bifidobactérias e os lactobacilos são classificados como micro-organismos benéficos ao cólon intestinal em termos de saúde e nutrição, promovendo uma redução da incidência de doenças intestinais, enquanto alguns micro-organismos, como a *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens* são classificados como prejudiciais (HIDAKA et al., 1986; WANG, 2015). Os FOS, por serem açúcares fermentados pela flora “amigável” do cólon intestinal, possibilitam a redução do pH do bolo fecal e aumento do peristaltismo intestinal, combatendo a constipação e auxiliando na eliminação de micro-organismos patogênicos (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; PASSOS; PARK, 2003); melhoram a absorção de minerais pelas células da mucosa intestinal e diminuem o nível de colesterol total, fosfolipídios e triacilgliceróis no sangue (PASSOS; PARK, 2003; YUN; SONG, 1996).

Ao se levar em conta o equilíbrio na flora gastrointestinal, pode ser acrescido ao FOS a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, redução da absorção de carboidratos e

lipídeos, aumento da digestão da lactose, aumento da síntese de vitaminas do grupo B, aumento da produção de compostos imuno estimulantes, diminuição da potencialidade de várias doenças humanas associadas com alto número de bactérias intestinais patogênicas (câncer, acne, cirrose hepática, constipação e alergias) (PASSOS; PARK, 2003).

Os FOS podem ser obtidos através de fontes de origem vegetal, em plantas como a alcachofra, chicória, banana, alho e cebola ou através da síntese enzimática, por meio da ação da enzima frutossiltransferase promovendo uma reação de transfrutossilacção com a sacarose como substrato (PASSOS; PARK, 2003; SANTOS, 1998). Na Tabela 1 é possível consultar todos os micro-organismos produtores de FTase reportados pelo banco de dados BRENDA (2018).

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de FTase EC 2.4.1.9.

<b>Micro-organismos</b>	
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533
<i>Aspergillus japonicus</i> FCL 119T	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus japonicus</i> JN19	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.106
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Aspergillus oryzae</i> CRF 202	<i>Leuconostoc citreum</i> CW2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> CW28
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> KCCM12017	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-6
<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-7
<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604	<i>Penicillium purpurogenum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Thermothelomyces heterothallica</i>

Fonte: Adaptado de BRENDA (2018).

De acordo com WANG (2015), os processos enzimáticos possuem vantagens que os fazem ser preferíveis para as indústrias de alimentos. Devido a grande diversidade estrutural dos FOS, a estereo e regioselectividade das enzimas são propriedades valiosas industrialmente, uma vez que processos baseados na síntese química necessitam de etapas complexas de proteção e desproteção para a preparação de oligossacarídeos estruturalmente bem definidos. Além disso, a maioria dos catalisadores químicos utilizados são tóxicos e com baixa especificidade, limitando a aplicação da rota química nas indústrias farmacêutica e alimentícia (FLORES-MALTOS et al., 2016)

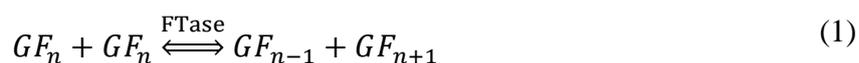
### 3.2 Síntese enzimática de FOS por frutossiltransferase

A síntese de FOS por via enzimática é feita basicamente por três enzimas: as inulinases (EC 3.2.1.7) que hidrolisam a inulina, as frutossiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9) que transferem grupos frutossil em moléculas de sacarose e a  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) que hidrolisa a sacarose em frutose e glicose (GANAIE et al., 2014). A nomenclatura das enzimas microbianas produtoras de FOS ainda é controversa no meio acadêmico, sendo as FTases muitas vezes chamadas de FFases. Entretanto, de acordo com L'Hocine et al. (2000), a nomenclatura correta para a enzima que realiza atividade de transfrutossililação é FTase. Em outra pesquisa, foi constatado que ambas as enzimas realizam atividade de transfrutossililação, entretanto esta só ocorre com a FFase quando usado uma elevada concentração de sacarose, diferentemente da FTase que apresenta a atividade de transfrutossililação também em concentrações inferiores de sacarose e, portanto, a FTase é mais susceptível de ser utilizada para a produção industrial de FOS (GHAZI et al., 2006; HUANG et al., 2016).

A frutossiltransferase realiza a catálise da transferência de um grupo frutossil para uma molécula de sacarose ou para uma molécula de FOS já formada, aumentando sua cadeia. De acordo com Antosová e Polakovic (2001), por ter baixa afinidade com a água como aceptor, a FTase normalmente apresenta baixas atividades hidrolíticas.

#### 3.2.1 Reação e atividade de transfrutossililação ( $A_T$ )

A FTase promove sobre o substrato sacarose uma reação de transferência de grupos frutossil, clivando as ligações do tipo  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) na molécula de sacarose e transfere um grupo frutossil para uma nova molécula de sacarose ou outra molécula de FOS, de forma que a glicose é o subproduto liberado na reação, apresentada pela Equação (1) (GANAIE et al., 2014; WANG, 2015).



onde G e F referem-se às moléculas de glicose e frutose, respectivamente. Quando o índice  $n$  tem o valor de um, temos a molécula de sacarose (GF). Os demais termos representam os oligossacarídeos formados, sendo mais comumente formados oligossacarídeos apresentando 2 unidades frutossil (GF<sub>2</sub>, 1-kestose), 3 unidades (GF<sub>3</sub>, nistose) e 4 unidades frutossil (GF<sub>4</sub>, frutofuranosilnistose).

A atividade de transfrutossilacção ( $A_T$ ) pode ser definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de FOS por minuto, sendo a concentração de FOS considerada a soma dos teores de 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose (OTTONI et al., 2012). Outra definição possível para  $A_T$  é a quantidade de enzima capaz de transferir 1 micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de frutose por minuto (KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996). Deste modo, a concentração de FOS pode ser encontrada indiretamente, por meio do balanço de massa apresentado nas Equações (2) e (3).

$$[ART] = [G] + [F] \quad (2)$$

$$[FOS] = [G] - [F] = 2[G] - [ART] \quad (3)$$

em que  $[ART]$ ,  $[G]$ ,  $[F]$  e  $[FOS]$  representam as concentrações de açúcares redutores totais, glicose, frutose e frutooligossacarídeos, respectivamente.

### 3.2.2 Reação e atividade hidrolítica ( $A_H$ )

A FFase, comumente conhecida como invertase, é a enzima mais associada à hidrólise da sacarose e dos FOS (WANG, 2015). A reação de hidrólise é caracterizada pela quebra do polissacarídeo resultando na liberação dos monossacarídeos que constituem sua estrutura. A hidrólise da sacarose pode ocorrer por rota enzimática, com a transferência de um grupo frutossil da molécula de sacarose para uma molécula de água aceptora, resultando na liberação dos monossacarídeos para o meio reacional, ou ainda, a hidrólise da sacarose pode ser causada pela acidificação do meio reacional.

A atividade hidrolítica pode ser definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de um dos produtos da hidrólise, por minuto. O produto quantificado pode ser a frutose ou a glicose (GANAIE et al., 2014; OTTONI et al., 2012).

### 3.2.3 Razão ( $A_T/A_H$ )

A razão entre a atividade de transfrutossilacção e a atividade hidrolítica ( $A_T/A_H$ ) se trata de um parâmetro essencial para se avaliar o uso da enzima, uma vez que altas razões indicam uma predominância da atividade de transfrutossilacção sobre a hidrolítica, o que torna maior o rendimento final. Desta forma, deve-se buscar utilizar a frutossiltransferase em condições operacionais que promovam maiores razões  $A_T/A_H$  (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; OLIVEIRA, 2007).

De acordo com Ghazi et al. (2007), a razão ( $A_T/A_H$ ) depende de dois parâmetros: a concentração de sacarose utilizada e as propriedades intrínsecas da enzima, ou seja, a capacidade desta de se ligar com o nucleófilo (receptor da frutose) e excluir a água.

### **3.3 Produção de FOS**

Os FOS ocorrem naturalmente em frutas e hortaliças (FORTES; MUNIZ, 2010). Apesar da possibilidade de extração de FOS de fontes vegetais, por normalmente estarem presentes em baixíssimas concentrações, a produção via síntese enzimática de origem microbiana é bem mais difundida industrialmente por proporcionarem menor custo de produção (WANG, 2015).

A produção industrial sintética de FOS iniciou-se no Japão em 1980, sendo produzido sob o nome de Meioligo® pela Meija Seika Kaisha Limited. Em sequência, em outros países tiveram início a produção e comercialização de FOS, em marcas como a Nutraflora® (Estados Unidos), Actlight® (França), F.O.S® (Brasil), Frutafit® (Holanda), entre outras (FORTES; MUNIZ, 2010; GANAIE et al., 2014). FOS podem ser produzidos por meio de dois processos distintos. O primeiro, consiste na produção da enzima por fermentação, com a aplicação posterior da enzima, na forma livre ou imobilizada, na produção de FOS. O segundo, consiste na produção de FOS sendo realizada simultaneamente ao processo fermentativo de produção enzimática. Uma vez que as condições ótimas de crescimento do micro-organismo podem não ser as mesmas condições ótimas de produção do FOS, deve-se preferir o uso do processo em duas etapas (HERNALSTEENS, 2006; OLIVEIRA, 2007).

Desta forma, a produção industrial de FOS é dada atualmente de duas formas. Produtos disponíveis comercialmente como Raftilose® e Frutafit® são produzidos a partir hidrólise enzimática da inulina. Já Actilight® e Neosugar® são exemplos de FOS comerciais produzidos por meio da reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose (OLIVEIRA, 2007).

### **3.4 Cinética enzimática**

#### *3.4.1 Aspectos gerais*

O estudo da cinética enzimática possui como finalidade levantar a influência de diversas condições de trabalho sobre a velocidade das transformações catalisadas por enzimas. Estas

condições de trabalho podem envolver diversas variáveis, como a temperatura de reação, pH do meio, concentração de reagentes, enzimas, ativadores e inibidores. Desta forma, são obtidas equações empíricas ou modelos matemáticos para o comportamento enzimático em função dos fatores que mais afetam sua cinética. A cinética de um grande número de enzimas pode ser descrita pelo modelo matemático de Michaelis-Menten (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; OLIVEIRA, 2007).

O modelo matemático de Michaelis-Menten apresenta uma relação de 1º ordem entre a velocidade de formação do complexo enzima-substrato ([ES]) e a concentração enzimática e uma relação também de 1º ordem em relação a baixa concentração de substrato. Considera-se que a etapa de formação e dissociação do complexo [ES] ocorre com grande velocidade, de forma que a ocupação dos sítios ativos pelo complexo [ES] pode ser desprezada. A dependência da velocidade inicial de reação (V) em função da concentração de substrato (S) é apresentada na Equação (4), onde  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) mede a afinidade entre a enzima e o substrato, representando a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima e  $V_{m\acute{a}x}$  é o valor da velocidade máxima de reação. Os valores  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  podem ser encontrados por meio de técnicas de linearização da Equação (4), como descrito por Lineweaver-Burk, Eadie-Hanes e Hofstee. Entretanto, há reações enzimáticas que o modelo de Michaelis-Menten não faz uma boa representação, sendo necessário correções na equação cinética considerando a presença de cooperatividade ou inibidores enzimáticos (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; SHULER; KARGI, 2002).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_m} \quad (4)$$

As correções para a equação cinética podem ser necessárias pelo fato de algumas enzimas não apresentarem uma cinética na forma hiperbólica (como a apresentada no modelo de Michaelis-Menten) e sim uma cinética que segue uma curva do tipo sigmoide. Tal fato ocorre devido a uma ligação cooperativa entre o substrato e o sítio catalítico da enzima, de forma que a ligação de uma molécula de substrato com a enzima traz efeitos às uniões posteriores entre substrato e enzima. Este efeito mais comumente acontece em enzimas que apresentam múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos, denominadas alostéricas. Esta cooperatividade pode causar um aumento da afinidade dos demais sítios ativos após a ligação da primeira molécula de substrato, sendo assim chamada de cooperatividade positiva. Todavia, uma cooperatividade negativa ocorre quando a primeira molécula de substrato reduz a afinidade dos demais sítios ativos (WEISS, 1997).

O modelo de Hill é apresentado na Equação (5), em que  $K_{0,5}$  é a concentração de substrato em que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima, representando a afinidade entre a enzima e o substrato, e  $n$  é o coeficiente de Hill (WEISS, 1997).

$$V = \frac{V_{máx}[S]^n}{[S]^n + (K_{0,5})^n} \quad (5)$$

A cooperatividade da ligação entre enzima e substrato é indicada pelo coeficiente de Hill ( $n$ ). Valores acima de 1 indicam uma cooperatividade positiva, sugerindo a presença de mais de um sítio de ligação para a enzima estudada ou até mesmo a formação de subunidades múltiplas da enzima, cada uma com um sítio apenas de ligação com o substrato. Quando o coeficiente de Hill ( $n$ ) assume valor de 1, a Equação (5) passa a representar uma cinética enzimática de Michaelis-Menten (WEISS, 1997).

#### 3.4.2 Efeitos da temperatura na cinética enzimática

O aumento da energia cinética das enzimas, ou seja, seu aumento de temperatura, proporciona até certo ponto um aumento da taxa reacional. A uma temperatura muito baixa, a movimentação da enzima em direção ao substrato é lenta prejudicando sua catálise. Com o aumento gradativo de temperatura, aumenta-se as colisões entre os sítio ativos das enzimas e o substrato, aumentando a taxa de reação. Entretanto, há uma determinada temperatura em que a energia cinética causa perturbações na estrutura ideal enzimática impedindo o encaixe específico com o substrato, ponto este em que ocorre a desnaturação enzimática. Desta forma, cada enzima possui uma temperatura ideal em que sua taxa reacional é máxima e seu estudo é de extrema importância, tanto para a enzima livre como imobilizada (FIELDS, 2001; SHULER; KARGI, 2002).

Desta forma, por meio da Equação proposta por Arrhenius temos a ativação térmica e a inativação térmica da enzima descritas pelas Equações (6) e (7), respectivamente:

$$k_a = A_a \cdot e^{-E_a/RT} \quad (6)$$

$$k_d = A_d \cdot e^{-E_D/RT} \quad (7)$$

onde  $k_a$  representa a constante de ativação térmica e  $k_d$  a constante de inativação térmica,  $A_a$  e  $A_d$  são as constantes de Arrhenius,  $E_a$  a energia necessária para a ativação térmica e  $E_D$  a energia necessária para promover a inativação térmica,  $R$  é a constante universal dos gases e  $T$  é a temperatura absoluta (CORNISH-BOWDEN, 1995).

A energia de inativação térmica ( $E_D$ ) fornece a energia necessária para que o processo de inativação térmica ocorra, de forma que elevados valores de  $E_D$  indicam uma maior termoestabilidade para a enzima e são portanto desejáveis (CATANA et al., 2006).

### 3.4.3 Estabilidade térmica enzimática

O tempo de meia vida enzimática,  $t_{1/2}$ , apresentado na Equação (8), se trata do tempo necessário para reduzir a atividade enzimática à metade do seu valor original, sendo inversamente proporcional à constante de inativação térmica ( $k_d$ ) (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; SHULER; KARGI, 2002).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (8)$$

O tempo de meia vida enzimática antes e após um processo de imobilização pode ser utilizado para se determinar a eficiência de um protocolo de imobilização por meio do fator de estabilidade (FE) apresentado na Equação (9), onde  $t_{1/2 \text{ imobilizada}}$  refere-se ao tempo de meia vida da enzima imobilizada e  $t_{1/2 \text{ livre}}$  refere-se ao tempo de meia vida da enzima livre (SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

$$FE = \frac{t_{1/2 \text{ imobilizada}}}{t_{1/2 \text{ livre}}} \quad (9)$$

Existem parâmetros termodinâmicos, como a variação de entropia ( $\Delta S^*$ ), entalpia ( $\Delta H^*$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ), que são essenciais para se avaliar a estabilidade das enzimas, tanto livres como imobilizadas. A desnaturação térmica da enzima consiste na sua transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia. Para que essa transição irreversível seja feita, é necessário o fornecimento para a enzima, na forma de calor, de uma quantidade mínima de energia chamada de energia de inativação ( $E_D$ ). A entalpia de ativação da desnaturação ( $\Delta H_D$ ), apresentada na Equação (10), fornece a quantidade de energia necessária para que a enzima atinja a condição inativada. Assim, elevados valores indicam uma maior termoestabilidade da enzima (FERREIRA, 2017; SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

$$\Delta H_D^* = E_D - RT \quad (10)$$

A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação ( $\Delta G_D^*$ ), apresentada na Equação (11) se trata de outra forma de quantificar a estabilidade enzimática. É considerada a forma mais confiável de se quantificar a estabilidade enzimática, por considerar fatores entálpicos e

entrópicos simultaneamente para expressar a espontaneidade com que a enzima se torna menos estável. Quando menor ou mais negativa é seu valor, maior a tendência da enzima a atingir sua condição inativada. Assim como para a entalpia de ativação da desnaturação ( $\Delta H_D$ ), altos valores da energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação ( $\Delta G_D^*$ ) indicam uma maior estabilidade térmica da enzima (KUMAR et al., 2013; SAQIB et al., 2010).

$$\Delta G_D^* = -RT \cdot \ln \left( \frac{k_d h}{k_B T} \right) \quad (11)$$

em que  $h$  se trata da constante de Planck ( $11,04 \cdot 10^{-36} \text{ J} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e  $k_B$  a constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ) (KUMAR et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

A entropia de desnaturação térmica da enzima ( $\Delta S_D^*$ ) também pode ser calculada, expressa pela Equação (12). Quanto maior a aleatoriedade no processo de inativação da enzima, maior e positivo será seu valor. Valores negativos indicam a presença de um estado de transição na inativação enzimática que possui maior ordenação ou menor aleatoriedade (KUMAR et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

$$\Delta S_D^* = \frac{\Delta H_D^* - \Delta G_D^*}{T} \quad (12)$$

#### 3.4.4 Efeitos do pH na cinética enzimática

Algumas enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos que necessitam estar em condições ideais específicas (sejam elas ácidas ou básicas) para exercer sua função como catalisador corretamente. Dessa forma, mudanças na forma dos grupos iônicos dos sítios ativos e conseqüentemente na taxa reacional da enzima podem ser provocadas por mudanças no pH do meio reacional. Esta mudança nos grupos iônicos dos sítios ativos da enzima também podem afetar a estrutura tridimensional enzimática. Em alguns casos, o substrato também pode conter grupos iônicos, de forma que mudanças no pH afetam diretamente a afinidade entre enzima e substrato. Portanto, existe uma faixa de pH ótimo, na qual a enzima consegue exercer corretamente sua função como catalisador. A predição do pH ótimo para determinada enzima depende de conhecimento a respeito das características dos sítios ativos daquela enzima, de forma que o pH ótimo geralmente é determinado experimentalmente (SHULER; KARGI, 2002).

### 3.5 Imobilização de enzimas e células

A tecnologia enzimática se trata de uma alternativa cada vez mais atrativa para diversos ramos industriais, com um mercado consumidor de enzimas em expansão, sendo o valor de venda das enzimas industriais no ano de 2016 estimado em 6 bilhões de dólares. Entretanto, o reuso destes biocatalisadores somente é possível quando o preparado enzimático é estável o suficiente ou quando a estabilidade é alcançada por meio de técnicas de imobilização. A imobilização é um termo genérico utilizado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico (SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016). A enzima utilizada na forma livre normalmente é solúvel, o que faz com que sua recuperação, após o uso, dificilmente seja viável economicamente. Este problema pode ser contornado com o uso de enzimas imobilizadas em suportes insolúveis, o que permite facilmente a separação do biocatalisador do meio reacional e torna viável seu reuso. O principal objetivo da imobilização enzimática é a reutilização industrial das enzimas para muitos ciclos de reação (GUISAN; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006). Para isso, a imobilização enzimática deve buscar estratégias que proporcionem a manutenção da atividade enzimática e possibilitem aumento de sua estabilidade (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 2012). As técnicas de imobilização podem melhorar diversas propriedades enzimáticas, como a estabilidade, atividade, redução da inibição e seletividade (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005a). Quando comparadas com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas apresentam maior robustez e maior resistência a mudanças do ambiente reacional, como mudanças de temperatura, pH e presença de solventes orgânicos (SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

De maneira similar, a imobilização de células é definida como a técnica de fixação de células microbianas por meio de ligações com um suporte sólido, aprisionamento em uma matriz sólida, retenção por uma membrana ou reticulação celular visando aumentar a estabilidade da célula e possibilitar sua utilização como biocatalisador (KRASŇAN et al., 2016). O uso da célula íntegra do micro-organismo como biocatalisador remove a necessidade de uma etapa de purificação para obtenção da enzima, diminuindo os passos do processo e o tornando mais barato e rápido (CASTRO et al., 2017). Com sua imobilização, podem ser promovidas melhoras operacionais similares à imobilização de enzimas, como a fácil separação do biocatalisador do meio reacional, possibilitando menores custos com o reuso, aumento do rendimento, produtividade e estabilidade, além de diminuir as exigências para armazenamento.

A possibilidade de eliminação das etapas de recuperação e reciclo de células fazem da imobilização de células uma grande oportunidade para redução de custos de um processo. De

acordo com Whendhausen Junior (1998), a imobilização de células frequentemente fornece ainda a possibilidade de utilização de altas velocidades de diluição sem perigo de eluição do biocatalisador (*washout*), aumento da porcentagem de conversão, menor inibição pelos produtos formados e menor tempo reacional. Entretanto, a imobilização pode acarretar em maiores custos de investimentos, impor limitações difusionais aos reagentes e produtos e até mesmo causar desativação do biocatalisador. Desta forma, o estudo direcionado à cada técnica aplicada a cada micro-organismo deve ser feito e a escolha do método de imobilização deve se basear em alguns parâmetros, como a atividade global do derivado enzimático, custo do procedimento de imobilização e nas propriedades resultantes do processo de imobilização para a enzima imobilizada (KRASŇAN et al., 2016; MENDES, 2009; SHULER; KARGI, 2002).

Com o avanço das pesquisas sobre imobilização, tem-se observado que a imobilização de células pode ser mais vantajosa que a imobilização de enzimas, pois elimina a necessidade de extrair do micro-organismo a enzima para depois fixá-la em um suporte. Quando cofatores são necessários para a atividade enzimática, a imobilização da célula também é vantajosa, pois a célula pode regenerar o cofator naturalmente (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Pode ocorrer o aumento da atividade celular com a imobilização quando comparada com o uso de células íntegras em suspensão. Este ganho muitas vezes é atribuído ao aumento aparente da resistência celular a perturbações ambientais, como pH ou exposição a concentrações tóxicas de compostos químicos (MUSSATTO et al., 2009). De acordo com Soccol, França e Resende (2016), a instabilidade da estrutura tridimensional das enzimas quando isoladas do seu ambiente natural é um dos principais problemas da utilização de enzimas solúveis, problema este que pode ser minimizado com o uso da enzima já naturalmente aderida ao micro-organismo.

Muitas técnicas de imobilização de células têm sido desenvolvidas ao longo dos anos. Em termos gerais, pode-se destacar as técnicas baseadas em adsorção ou ligações covalentes com materiais sólidos, o encapsulamento celular entre membranas ou matrizes porosas e a reticulação entre células e materiais poliméricos. Existe também a possibilidade de uso da combinação de dois ou mais métodos em um mesmo biocatalisador (KRASŇAN et al., 2016).

### **3.6 Métodos de imobilização de células**

De acordo com Sheldon (2007), os métodos de imobilização podem ser divididos em três grupos: ligação a um suporte, aprisionamento em matrizes poliméricas e reticulação entre as próprias células. Outros autores, como Canilha, Carvalho e Silva (2006), dividem os métodos de imobilização em quatro, separando o aprisionamento celular em dois tipos: aprisionamento

em matrizes porosas e contenção por barreiras. Apesar de serem diversos os métodos já desenvolvidos, não há um método aplicável para toda enzima ou célula conhecida, sendo indispensável o conhecimento prévio das características do suporte e dos efeitos de cada método empregado para seleção da técnica de imobilização a ser utilizada para cada finalidade, buscando sempre a adoção de um procedimento mais simples e barato (SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

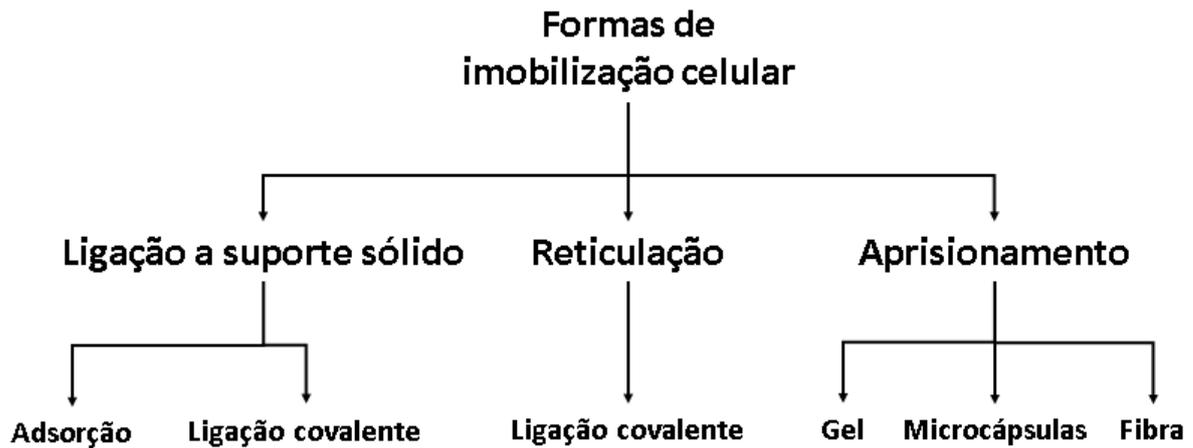


Figura 1 – Esquema dos métodos de imobilização celular.

Fonte: Adaptado de Whendhausen Junior (1998).

### 3.6.1 Ligação a um suporte

a) **Adsorção:** Se trata de um método muito simples e bastante empregado. Consiste na imobilização promovida por ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas entre as células e os grupos reativos do suporte utilizado. Se trata de um método barato e que permite a regeneração da matriz utilizada (uso em uma nova imobilização). Esta técnica pode aproveitar da habilidade de alguns microorganismos se fixarem naturalmente em superfícies de diferentes ambientes. Quando os poros do suporte utilizado possuem tamanho adequado, as células em crescimento de um fungo (hifas) podem penetrar no suporte e preencher seu espaço interno dando origem a um biocatalisador imobilizado. Tem como principais vantagens a simplicidade da técnica, o baixo custo por não necessitar de ativação do suporte para imobilização. Quando a célula deve ser aplicada em meio apolar, a enzima é insolúvel e não é necessário fortes interações entre a célula e o suporte para garantir o sucesso da imobilização, o que traz grandes vantagens ao método. As principais desvantagens deste método residem na aleatoriedade da interação entre célula e suporte e a

possibilidade de dessorção devido a variações de temperatura, pH e força iônica (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; COVIZZI et al., 2007; SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

b) **Ligação covalente:** baseia-se em uma ligação covalente entre as células e os grupos reativos do suporte, através de uma funcionalização do suporte para que este contenha um grupo químico capaz de ligar covalentemente com a célula, formando uma forte ligação entre célula e suporte o que proporciona uma grande rigidez na estrutura enzimática. O número de ligações covalentes formadas depende da densidade de grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais presentes, do estado de protonação dos mesmos e da especificidade dos grupos ativos do suporte. Possui como maior limitação a potencial toxicidade para a célula de alguns agentes químicos utilizados comumente para ativação do suporte, tornando a seleção das condições para imobilização mais difícil que em outros métodos de imobilização. Entretanto, este método pode apresentar a vantagem de aumentar a resistência enzimática quanto à variação de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos e possibilitar o reuso enzimático (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; SHELDON, 2007; SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016)

### *3.6.2 Aprisionamento*

a) **Envolvimento em matrizes porosas:** se trata do método mais utilizado na imobilização de células, por apresentar baixa toxidez. Consiste no confinamento físico de um aglomerado celular em uma matriz polimérica, cujos poros são menores que as células contidas no seu interior, impedindo o arraste das células, porém permitindo o fluxo de substratos e produtos para o interior da matriz para que ocorra a interação entre enzima e substrato. A imobilização de células microbianas em géis de alginato é bastante aplicada em processos fermentativos, apesar das limitações de transferência de massa e a baixa resistência física apresentada pelo biocatalisador obtido. No método de envolvimento em matrizes porosas, a difusão do substrato e produto pode consistir na maior limitação encontrada (BORZANI et al., 2001; COVIZZI et al., 2007).

b) **Contenção por barreiras:** consiste na retenção das células sob membranas, possibilitando a contenção de uma quantidade maior de células em relação a imobilização em matrizes porosas. A diferença deste método para o envolvimento em matrizes porosas é que na contenção

por barreiras as células ficam apenas envoltas por uma membrana e não há material entre as células envolvidas pelas membranas. Desta forma, neste método também é imprescindível se utilizar membranas que não dificultem o fluxo de substrato e produto para que não sejam impostas limitações difusionais ao uso do biocatalisador (BORZANI et al., 2001; COVIZZI et al., 2007).

### 3.6.3 Reticulação entre as células

O processo de reticulação pode ser definido como um processo no qual um polímero ou material celular torna-se uma rede tridimensional densa por meio de ligações variadas, como ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou covalentes (HOU; DI VONA; KNAUTH, 2012). A reticulação entre as células consiste na formação de um aglomerado celular, de forma natural ou induzida artificialmente por meio de agentes químicos que promovam ligações cruzadas entre as células, chamados de agentes de reticulação (agentes *cross-linking*). Este método possui a vantagem do baixo custo por não exigir o uso de um suporte sólido para a imobilização e proporcionar alta estabilidade enzimática (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; CRUZ et al., 2012; SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016). A eficiência de uma reação de reticulação depende da concentração e tipo de agente de reticulação, do pH do meio reacional, da temperatura e do tempo de reação (tempo de contato). As novas ligações impostas pela reticulação podem melhorar a estabilidade enzimática mas também podem causar distorções no sítio catalítico da enzima (KOMESU et al., 2009). Efeitos positivos à atividade enzimática foram observados por Sun et al. (2010b), que recomendam a reticulação das células de *Rhizopus orizae* IFO 4697 para melhorar a estabilidade operacional das células.

Entre os agentes utilizados para promover a reticulação, o glutaraldeído se destaca por reagir rapidamente com aminas primárias e, conseqüentemente, com proteínas (MIGNEAULT et al., 2004b).

#### 3.6.3.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído, dialdeído linear de 5 carbonos, é um reagente muito popular na imobilização de proteínas, podendo ser utilizado como pré tratamento na ativação de suportes físicos ou na formação da reticulação entre proteínas, atuando como um agente de reticulação (*cross-linking*) (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005b). É um agente reticulante que normalmente é aplicado para formação de redes de polipeptídeos e proteínas devido à reatividade de seus

grupos aldeídos em formar bases de Schiff com o grupo amino das proteínas. Apesar de seu uso, de acordo com Migneault et al. (2004b), não há concordância a respeito de suas espécies reativas que de fato participam de todo o processo de reticulação protéica, de forma que o glutaraldeído pode reagir com diversos grupos funcionais de proteínas, como aminas, tiol, fenol e imidazol pois as cadeias laterais mais reativas dos aminoácidos são nucleófilos. Foi observado que o glutaraldeído reage com grupos tiol apenas na presença de um grupo amino primário, enquanto reage com grupos amino reversivelmente em uma ampla faixa de pH (acima de pH 3,0), com destaque para a faixa de pH entre 7,0 e 9,0, na qual apenas uma pequena reversibilidade é observada (MIGNEAULT et al., 2004b).

A reticulação de proteínas normalmente envolve grupos amino de resíduos de lisina uma vez que os grupos amino não protonados são muito reativos como agentes nucleófilos. A maioria das proteínas contém muitos resíduos de lisina na superfície da proteína. Além disso, normalmente estes resíduos da lisina não estão envolvidos no sítio catalítico enzimático, portanto é possível uma preservação da conformação protéica por meio da reticulação (AVRAMEAS, 1969; MIGNEAULT et al., 2004b). Ao seu trabalhar com a reticulação micelial, de acordo com Monsan (1978) as reações ocorrem entre grupos aldeídos do glutaraldeído e grupos aminos das células, também resultando na formação de grupos de imina (bases de Schiff) e mudança de cor da biomassa.

A imobilização com glutaraldeído pode ser feita para muitas enzimas, em uma larga faixa de condições, determinadas de acordo com os resultados obtidos muitas vezes por meio da tentativa e erro. Diversos fatores devem ser analisados para garantir a insolubilidade da enzima e consequente sucesso da imobilização, como a proporção entre concentração enzimática e de glutaraldeído, o pH, a temperatura e o tempo reacional. Alguns autores sugerem, ao término da reação de imobilização com glutaraldeído, uma etapa de redução das bases de Schiff reversíveis em ligações de aminoácidos secundárias mais estáveis e redução dos grupos de aldeído não reagidos para grupos inertes. Ambas as reduções podem ser promovidas por meio da reação com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) (MIGNEAULT et al., 2004b; RUEDA et al., 2016).

Com o uso do glutaraldeído no processo de reticulação da lipase aderida ao micélio de *Aspergillus flavus*, Long et al. (1996) obtiveram um aumento da estabilidade enzimática, aumentando sua estabilidade térmica com o processo de reticulação e tornando a enzima significativamente mais resistente à extração por água quando comparada à biomassa livre. Foi observado também uma pequena redução da atividade enzimática, atribuída às limitações difusionais ao substrato e produto originadas pelas ligações cruzadas entre as enzimas. Com o

processo de reticulação com glutaraldeído adotado foi possível o reuso da biomassa por até 13 ciclos sem queda da atividade enzimática.

Sun et al. (2010a) estudaram o efeito do glutaraldeído sobre células de *Rhizopus oryzae* na metanólise de óleos renováveis para a produção de biodiesel, relatando um aumento da estabilidade das células e aumento da tolerância ao metanol, atribuída à diminuição da perda de lipase para o meio reacional graças à atuação do glutaraldeído como agente reticulante. Resultados similares foram obtidos por Szczesna-Antczak et al. (2004) para a lipase micelial de *Mucor circinelloides*, para o qual o processo de reticulação com glutaraldeído foi considerado o mais eficiente para estabilização dos pellets formados quando comparados com a estabilização em alginato de cálcio e álcool polivinílico, também testados pelos autores.

### 3.8 Imobilização da FTase

Na literatura pode-se encontrar registros da imobilização da frutossiltransferase, extracelular ou aderida à biomassa.

Uma produção contínua de FOS foi estudada por Yun e Song (1996), por meio de frutossiltransferase extracelular imobilizada em uma resina com alta porosidade chamada Diaioa HPA 25®, obtendo um biocatalisador com maior resistência a variações de pH e com atividade de transfrutossililação similar à enzima livre. Não houve alteração dos valores de temperatura e pH ótimos para aplicação na produção de FOS com a imobilização. O biocatalisador foi aplicado em uso contínuo por até trinta dias com uma queda de apenas 8% da atividade de transfrutossililação inicial.

Chien, Lee e Lin (2001) estudaram a imobilização da biomassa de *Aspergillus japonicus* por envolvimento em glúten visando a produção de FOS. Foi obtido um biocatalisador estável, o qual foi aplicado em um reator de leito empacotado. Foi observado uma redução da velocidade de reação de produção de FOS com a imobilização (a nova velocidade de reação passou a ser próxima a 70% da velocidade de reação catalisada pelo micélio sem tratamento), associada a possíveis limitações difusionais do substrato impostas pelo glúten.

Ghazi et al. (2005) estudaram a imobilização por ligações covalentes de frutossiltransferases comerciais em um polímero à base de polimetacrilato (Sepabeads® EC). Foi obtido um biocatalisador com alta estabilidade mecânica, relativa fácil produção com atividade de transfrutossililação máxima de 25 U.g<sup>-1</sup>.

Platková et al. (2006) estudaram o uso de diversos suportes comerciais na imobilização de FTase extracelular obtida de *Aureobasidium pullulans*. Neste estudo, foram comparados os

efeitos da imobilização por duas diferentes rotas. A primeira, baseou-se na ligação covalente direta entre suportes ativados e a FTase. A segunda, baseou-se na ligação entre os suportes ativados e a FTase tratada previamente com glutaraldeído para a formação de uma reticulação entre as enzimas. Não foi observado em nenhum dos biocatalisadores estudados melhoras operacionais com o uso do glutaraldeído. Como resultado principal do trabalho, foi obtido um aumento da estabilidade de armazenamento para a enzima imobilizada diretamente em Amberlite IRA 900®. FTase também obtida de *Aureobasidium pullulans* foi imobilizada em um copolímero de acrilato de butilo e dimetacrilato de etilenoglicol por Onderková, Bryjak e Polakovic (2007). O suporte foi previamente ativado com glutaraldeído. Este processo resultou em um biocatalisador fisicamente estável, capaz de suportar até 11 ciclos de 1 hora de produção de FOS sem grande queda da  $A_T$ .

Kamimura et al. (2009) criaram um biocatalisador a partir da FTase extracelular de *Pichia pastoris* em uma mistura de gelatina, alginato de sódio e cloreto de cálcio, possibilitando o reuso da enzima. Entretanto este método resultou em uma considerável queda de atividade, passando a apresentar apenas 20 % da atividade da enzima livre ( $25 \text{ U.mL}^{-1}$ ) após a imobilização.

A habilidade do *Aspergillus japonicus* ATCC 20236 de colonizar diversos materiais sintéticos durante a etapa de fermentação foi explorada por Mussatto et al. (2009), realizando a imobilização *in situ* por absorção da biomassa em diversos materiais (espuma de poliuretano, esponja de aço inoxidável, fibra vegetal, pedra-pomes, peneiras moleculares de zeólito e espuma de vidro). Como melhor resultado, a absorção micelial em fibra vegetal tornou possível obter uma produção de FOS similar à produção obtida com a biomassa livre, entretanto tornou mais fácil a separação entre o biocatalisador e o meio reacional e proporcionou um aumento da razão  $A_T/A_H$ , passando de 3,2 para 4,8 com o processo de imobilização.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) imobilizaram por adsorção, FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. em minério de nióbio resultando em um biocatalisador com conversão similar à enzima livre, razão ( $A_T/A_H$ ) próxima a 1,6 e tempo de meia vida de 24 dias a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , desta forma, viabilizando o reuso da enzima na produção de FOS.

Ganaie et al. (2014) estudaram a imobilização da FTase aderida à biomassa de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364 em quitosana e alginato pelo método de envolvimento. Foi obtida uma  $A_T$  máxima de  $45 \text{ U.mL}^{-1}$  para a biomassa imobilizada com alginato, enquanto a biomassa livre sem tratamento apresentou uma  $A_T$  máxima de  $40 \text{ U.mL}^{-1}$ . A biomassa imobilizada com quitosana apresentou uma  $A_T$  máxima de  $30 \text{ U.mL}^{-1}$ . Foi observado também uma maior estabilidade ao pH na biomassa imobilizada com alginato em relação à biomassa

imobilizada com quitosana e livre. O biocatalisador imobilizado em alginato foi capaz de manter mais de 50 % de sua atividade inicial após aplicado em 15 ciclos de 24 horas de produção de FOS, enquanto a biomassa imobilizada em quitosana apresentou uma grande queda de atividade após o 5º ciclo. Desta forma, foi concluído que a imobilização da biomassa tornou possível o reuso de *Aspergillus flavus* para a produção de FOS. Em uma pesquisa mais recente, Huang et al. (2016) realizaram a imobilização por envolvimento em alginato do micro-organismo *Aspergillus aculeatus* M105, obtendo um biocatalisador capaz de ser aplicado na produção de FOS por até 15 ciclos.

Castro et al. (2017) estudaram a imobilização da biomassa de *Aureobasidium pullulans* em diversos suportes (subprodutos sintéticos, agroindustriais e materiais minerais). A imobilização ocorreu *in situ* por absorção do micélio durante a etapa de fermentação. Em todos os suportes estudados ocorreu a absorção da biomassa, com destaque para a espuma de poliuretano reticulado, fibra de poliéster e lã de fibra de vidro, que absorveram as maiores quantidades de células.

Não foi encontrado na literatura relatos da aplicação da técnica de reticulação para imobilização da FTase aderida à biomassa. Desta forma, o uso do glutaraldeído em um processo de reticulação micelial se apresenta como um interessante método de imobilização a ser explorado para a FTase aderida à biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301, uma vez que as vantagens proporcionadas por este método de imobilização nunca foram exploradas para este micro-organismo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Produção da biomassa catalítica

#### 4.1.1 *Micro-organismo e condições de cultivo*

Para a produção da biomassa catalítica, contendo a enzima FTase micelial, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, doada pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). O *pellet* contendo aproximadamente 5 g de esporos liofilizados do micro-organismo, foi ressuspensão em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 µL foram inoculadas em meio sólido contendo (em %, m/v): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isofar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados, por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m/v) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % (v/v). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isofar®) 20,0 % (m/v), cujo volume foi variável, de modo ajustar a concentração de esporos para aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C (CUNHA, 2017).

#### 4.1.2 *Meio de cultura*

O meio de cultura utilizado para a fermentação e produção da biomassa catalítica foi constituído por (em %, m/v): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, NaNO<sub>3</sub> (Dinâmica®) 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth®) 0,2, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Dinâmica®) 0,05, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Synth®) 0,03 e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Synth®) 0,001. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH (Synth®) 0,01 mol.L<sup>-1</sup>. Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 120 °C e 2,022 atm durante 15 minutos (CUNHA, 2017).

#### 4.1.3 *Fermentação submersa*

Foram inoculados 500  $\mu\text{L}$  de suspensão de esporos ( $1 \times 10^7$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ ) em 50 mL de meio de cultura descrito no tópico 4.1.2. A fermentação foi realizada em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm por um período de 64 h. O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm e a biomassa, retida no papel (torta), foi armazenada, sob refrigeração, em placas de Petri. Visando reduzir a perda de atividade da enzima micelial, buscou-se realizar as etapas de imobilização e reação enzimática imediatamente após a coleta da biomassa (CUNHA, 2017).

## 4.2 Imobilização da biomassa catalítica

### 4.2.1 Otimização das atividades enzimáticas em função do pH de imobilização e concentração de glutaraldeído

Para se investigar os efeitos dos parâmetros (i) concentração de glutaraldeído e (ii) pH do meio reacional, durante os ensaios de imobilização da biomassa catalítica (micélio), sobre as atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilção ( $A_T$ ) e a razão entre ambas ( $A_T/A_H$ ), realizou-se um planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional 2<sup>2</sup>. Para os estudos de planejamento, foram selecionados os valores de pH entre 6,40 a 9,40 e concentrações de glutaraldeído entre 1,20 e 3,00 % (v/v) como níveis principais. Assim, elaborou-se uma matriz de experimentos (Tabela 3) composta por 12 ensaios. As análises estatísticas foram efetuadas pela Análise de Variância (ANOVA) mediante auxílio do *software* Statistica® versão 7.0®. Os volumes de soluções tampão e de glutaraldeído, adicionados em cada ensaio para atingir as concentrações necessárias, foram calculados e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Volumes de tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e glutaraldeído 25 % (v/v) adicionados para realização dos ensaios de otimização das atividades enzimáticas.

Ensaio	Volume de glutaraldeído ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Tampão (mL)	Ensaio	Volume de glutaraldeído ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Tampão (mL)
1	480	9,52	7	840	9,16
2	1200	8,8	8	840	9,16
3	480	9,52	9	840	9,16
4	1200	8,8	10	840	9,16
5	332	9,668	11	840	9,16
6	1348	8,652	12	840	9,16

Fonte: do autor.

Tabela 3 - Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais	
	Concentração de Glutaraldeído (% (v/v))	pH	Concentração de Glutaraldeído (% (v/v))	pH
<b>1</b>	-1	-1	1,2	6,4
<b>2</b>	+1	-1	3	6,4
<b>3</b>	-1	+1	1,2	9,4
<b>4</b>	+1	+1	3	9,4
<b>5</b>	-1,414	0	0,83	7,9
<b>6</b>	1,414	0	3,37	7,9
<b>7</b>	0	-1,414	2,1	5,78
<b>8</b>	0	1,414	2,1	10,01
<b>9</b>	0	0	2,1	7,9
<b>10</b>	0	0	2,1	7,9
<b>11</b>	0	0	2,1	7,9
<b>12</b>	0	0	2,1	7,9

Fonte: do autor.

#### 4.2.2 Imobilização da biomassa catalítica (micélio) com glutaraldeído

Os ensaios de imobilização da biomassa catalítica (micélio) foram realizados de acordo com a adaptação dos métodos descritos por Vescovi et al. (2016) e Sun et al. (2010b). Em um tubo, adicionou-se 0,1 g de micélio úmido (biomassa) oriundo da fermentação (tópico 4.1.3), seguido da adição de solução aquosa de glutaraldeído 25 % (v/v) (VETEC®) previamente dissolvido em solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> totalizando um volume reacional de 10 mL (o pH, o volume de glutaraldeído adicionado e, conseqüentemente, a concentração de glutaraldeído foram definidos de acordo com o planejamento experimental descrito no tópico 4.2.1). A reação de imobilização foi realizada a 25 °C, 200 rpm durante 60 minutos em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) e finalizada, por mais 30 minutos, a partir da adição de 100 µL de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) (NEON®), previamente dissolvido em solução 0,001 mol.L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®), a uma concentração de 100 g.L<sup>-1</sup>. Ao término desta etapa, o tubo contendo o meio reacional foi imerso em banho de água e gelo e a amostra filtrada em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. A biomassa imobilizada, retida no papel (torta), foi lavada abundantemente com água destilada e

armazenada sob refrigeração para ensaios posteriores de atividade enzimática, caracterização e avaliação do seu reuso para a produção de FOS.

### 4.3 Atividade enzimática e quantificação de açúcares

#### 4.3.1 Determinação das atividades hidrolítica e de transfrutossilção miceliais

Definiu-se uma unidade de atividade de transfrutossilção ( $A_T$ ) como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de FOS por minuto nas condições ensaiadas, sendo a concentração de FOS considerada a soma dos teores de 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose. Já uma unidade de atividade hidrolítica ( $A_H$ ) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol (1  $\mu\text{mol}$ ) de frutose por minuto sob as condições reacionais do ensaio (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2004, 2007; GANAIE et al., 2014; OTTONI et al., 2012)

As concentrações de açúcares, obtidas durante os ensaios de reação enzimática, foram calculadas pelas Equações (13), (14) e (15) (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2004).

$$[ART] = [F] + [G] \quad (13)$$

$$[F] = [ART] - [G] \quad (14)$$

$$[FOS] = [G] - [F] = 2[G] - [ART] \quad (15)$$

em que  $[ART]$ ,  $[F]$ ,  $[G]$  e  $[FOS]$  representam as concentrações de açúcares redutores totais, frutose, glicose e FOS, respectivamente, expressas em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Em um tubo de 15 mL foi adicionado 0,05 g de micélio úmido juntamente com 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e pH 5,5. Iniciou-se a reação enzimática pela adição de 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v) previamente termostatizada a 50 °C até atingir equilíbrio térmico (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012)

A reação foi conduzida por 60 min a 50 °C e 190 rpm em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) e interrompida pela fervura (água em ebulição) durante 10 min, seguida por banho de água e gelo (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012). Ao término, o meio reacional foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais e glicose pelos métodos DNS (tópico 4.3.2) e GOD-PAP (tópico 4.3.3), respectivamente. Posteriormente, com a concentração destes açúcares, foi possível determinar as concentrações de frutose pela Equação (14) e de FOS pela Equação (15).

As atividades miceliais de transfrutossilacção ( $A_T$ ) e hidrolítica ( $A_H$ ) foram calculadas, respectivamente, pelas Equações (16) e (17).

$$A_T = \frac{[FOS] \cdot V_R}{t_R \cdot m \cdot m_{ef}} \quad (16)$$

$$A_H = \frac{[F] \cdot V_R}{t_R \cdot m \cdot m_{ef}} \quad (17)$$

em que  $[FOS]$  representa a concentração de FOS em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $[F]$  representa a concentração de frutose em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $V_R$  o volume do meio reacional em litros (L),  $t_R$  o tempo da reacção em minutos (min),  $m$  a massa de micélio úmido em gramas (g) e  $m_{ef}$  o teor de massa seca presente no micélio úmido.

#### 4.3.2 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

A concentração dos açúcares redutores totais (ART), presentes no meio reacional, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013).

A solução DNS (*Reagente A*) foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ ) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol.L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (*Reagente B*) constituída por 600 g.L<sup>-1</sup> de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambos os reagentes (*A* e *B*) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico.

A quantificação dos ART foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reacção enzimática, em 1,0 mL da solução preparada (*Reagentes A + B*) sob agitação vigorosa. A reacção foi conduzida em banho maria a 100 °C por 10 min e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 8,0 mL de água destilada.

Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotómetro (EduTec®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorbâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos ART mediante auxílio da curva analítica obtida para o método DNS (Figura 19, Apêndice A).

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reacção enzimática de transfrutossilacção, por água destilada.

#### 4.3.3 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP, conforme utilizado no trabalho de Oliveira (2007), Vega e Zúniga-Hansen (2011), Ganaie et al. (2014) e Cunha (2017). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato.

A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®.

A quantificação da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 40  $\mu$ L da amostra, oriunda da reação enzimática, em 4 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 minutos. A coloração final foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, visando obter as absorbâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações de glicose, por meio da curva analítica obtida para o método GOD-PAP (Figura 20, Apêndice A).

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada.

#### 4.3.4 Determinação do teor de massa efetiva ( $m_{ef}$ )

Para obtenção do teor de massa efetiva presente no micélio úmido ( $m_{ef}$ ), pesou-se 0,15 g das biomassas úmida livre (obtido no tópico 4.1.3) e imobilizada (obtido no tópico 4.2.2) e manteve-se essas amostras em estufa (ProLab®) a 60 °C até a obtenção de massa constante. O procedimento foi realizado em quadruplicata, tanto para a biomassa livre como para a biomassa imobilizada. Os valores obtidos foram utilizados para cálculo da fração de massa efetiva presente nas amostras de micélio úmido em cada biomassa. O  $m_{ef}$  calculado para cada amostra foi aplicado nas Equações (16) e (17) para obtenção das atividades enzimáticas.

#### 4.4 Caracterização das biomassas catalíticas livre e imobilizada

##### 4.4.1 *Influência da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutosilação*

Uma vez determinada as melhores condições de imobilização da biomassa (tópico 4.2.2), cuja FTase micelial exibiu, respectivamente, os menores e maiores valores de atividades hidrolítica e de transfrutosilação, foram realizados estudos para verificar os efeitos da temperatura do meio reacional sobre a atividade enzimática.

Os ensaios de atividade foram realizados pela adição, em tubo Falcon, de 0,05 g de biomassa (livre ou imobilizada) em solução constituída por 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v). Foram avaliadas as temperaturas nos valores de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C, com intuito de se determinar a temperatura de máxima atividade de transfrutosilação da FTase presente nas biomassas livre e imobilizada. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as atividades enzimáticas determinadas conforme método descrito no tópico 4.3.1.

##### 4.4.2 *Ensaio de estabilidade térmica das biomassas catalíticas livre e imobilizada e determinação dos parâmetros termodinâmicos*

Uma vez determinada as melhores condições de imobilização da biomassa (tópico 4.2.2), cuja FTase micelial exibiu, respectivamente, os menores e maiores valores de atividades hidrolítica e de transfrutosilação, foram realizados estudos de estabilidade térmica da biomassa catalítica. Os ensaios foram conduzidos por meio da adição, em tubo Falcon, de 0,05 g de biomassa (livre ou imobilizada) em solução constituída por 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e pH 5,5. O tubo foi acondicionado em água termostatizada. Foram avaliadas as temperaturas de 30, 40 e 50 °C durante intervalos de tempo de 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 25 horas. Após o repouso, as atividades enzimáticas foram determinadas conforme método descrito no tópico 4.3.1.

Mediante os resultados experimentais obtidos, foram calculados a constante de inativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) conforme as Equações (7) e (8), respectivamente. Com a determinação de  $k_d$  para as temperaturas avaliadas, foi calculada a energia de inativação térmica ( $E_D$ ) por meio da Equação (7) e, posteriormente, as variações de

entalpia padrão ( $\Delta H_D^*$ ), energia de Gibbs ( $\Delta G_D^*$ ) e entropia ( $\Delta S_D^*$ ) para a inativação térmica, por meio das Equações (10), (11) e (12), respectivamente, descritas no tópico 3.4.3.

#### *4.4.3 Influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção*

Uma vez determinada as melhores condições de imobilização da biomassa (tópico 4.2.2), cuja FTase micelial exibiu, respectivamente, os menores e maiores valores de atividades hidrolítica e de transfrutossilacção, foram realizados estudos para verificar os efeitos do pH do meio reacional sobre a atividade enzimática.

Os ensaios de atividade foram realizados pela adição, em tubo Falcon, de 0,05 g de biomassa (livre ou imobilizada) em solução constituída por 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L<sup>-1</sup> e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v). Foram avaliados valores de pH iguais a 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5 com intuito de se determinar o pH de máxima atividade de transfrutossilacção da FTase presente nas biomassas livre e imobilizada. Os ensaios foram conduzidos em duplicata e as atividades enzimáticas determinadas conforme método descrito no tópico 4.3.1.

#### *4.4.4 Ensaios de estabilidade ao pH das biomassas catalíticas livre e imobilizada*

Foram adicionados, em tubo Falcon, 0,05 g de biomassa (livre ou imobilizada) em 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L<sup>-1</sup> em pH 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5 por 24 horas a 4 °C. Após os diferentes tempos de repouso, foi adicionado, no mesmo tubo, 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v), pré-aquecida a 50 °C, e determinadas as atividades enzimáticas (tópico 4.3.1). Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### *4.4.5 Influência da concentração de substrato e determinação dos parâmetros cinéticos*

O efeito da concentração de sacarose (substrato) na cinética enzimática foi avaliado por meio da adição de 0,05 g de biomassa (livre ou imobilizada) em 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) com concentrações de 10, 20, 35, 50, 63,6 e 80 % (m/v), obtendo-se, após a mistura, as concentrações finais no meio reacional de 75,5, 151,0, 264,3, 377,5, 480,2 e 604,1 g.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em duplicata e as atividades enzimáticas determinadas conforme método

descrito no tópico 4.3.1. Com os resultados obtidos, foram estimados os parâmetros cinéticos apresentados no tópico 3.4.1.

#### **4.5 Avaliação da estabilidade operacional das biomassas catalíticas livre e imobilizada visando a produção de FOS**

Após obtida a melhor condição de imobilização (tópico 4.2.2) e realizados os ensaios de caracterização das propriedades catalíticas da biomassa (micélio) imobilizada (tópico 4.4), avaliou-se a estabilidade operacional dos biocatalisadores na produção de frutooligossacarídeos (FOS). Para isso, 0,05 g de biomassa (livre ou imobilizada) contendo a enzima FTase foi adicionada em meio reacional contendo 3,7 mL de solução de sacarose P.A 63,6 % (m/v) (Synth®) e 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (Synth®). A reação foi conduzida por 60 minutos a 190 rpm, sob condições de temperatura e pH previamente definidos conforme métodos descritos nos tópicos 4.4.1 e 4.4.3, respectivamente. Ao final de cada ciclo reacional, o biocatalisador foi removido do meio por filtração e lavado com 100 mL de água destilada para a remoção das moléculas de reagentes e/ou produtos do seu microambiente. Após estas etapas, o biocatalisador foi introduzido em um novo meio reacional. Assim, foram elaborados gráficos de atividade enzimática em função do número de ciclos reacionais. Os experimentos foram realizados em duplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos de imobilização da biomassa catalítica

Neste tópico são descritos os resultados obtidos nos ensaios de imobilização da biomassa e otimização das atividades enzimáticas (transfrutossilação e hidrolítica) em função do pH de imobilização e concentração de glutaraldeído, bem como a comparação das atividades enzimáticas antes e após a imobilização.

#### *5.1.1 Otimização das atividades enzimáticas em função do pH de imobilização e concentração de glutaraldeído por planejamento experimental*

Foi aplicado um planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional  $2^2$ , com quatro pontos centrais para avaliação do erro puro, a fim de investigar os efeitos do pH e da concentração de glutaraldeído durante a etapa de imobilização sobre as atividades enzimáticas da FTase micelial presente na biomassa imobilizada.

Os níveis utilizados, com os valores codificados e reais e suas respectivas respostas para as atividades de transfrutossilação ( $A_T$ ), hidrolítica ( $A_H$ ) e razão entre as atividades ( $A_T/A_H$ ) estão apresentadas na Tabela 4. Todas as respostas foram analisadas estatisticamente mediante aplicação do modelo quadrático com interação. Nas condições estudadas, os valores de  $A_T$  variaram entre 357,38 U.g<sup>-1</sup> e 844,08 U.g<sup>-1</sup> e os pontos centrais apresentaram baixa variação, o que indica uma boa reprodutibilidade do processo.

Tabela 4 - Matriz do delineamento e respostas para otimização da imobilização da biomassa.

Valores Codificados (Reais)		Respostas		
Concentração de glutaraldeído [GLU] (% , v/v)	pH de imobilização	$A_T$ (U.g <sup>-1</sup> )	$A_H$ (U.g <sup>-1</sup> )	$A_T/A_H$
-1 (1,2)	-1 (6,4)	558,54	176,46	3,17
1 (3)	-1 (6,4)	464,46	150,08	3,09
-1 (1,2)	1 (9,4)	554,85	199,23	2,78
1 (3)	1 (9,4)	357,38	156,15	2,29
-1,414 (0,83)	0 (7,9)	675,85	282,38	2,39
1,414 (3,37)	0 (7,9)	594,54	199,31	2,98
0 (2,1)	-1,414 (5,78)	420,69	149,00	2,82
0 (2,1)	1,414 (10,01)	363,46	83,46	4,35
0 (2,1)	0 (7,9)	785,85	118,92	6,61
0 (2,1)	0 (7,9)	809,31	135,54	5,97
0 (2,1)	0 (7,9)	844,08	134,46	6,28
0 (2,1)	0 (7,9)	843,31	116,23	7,26

$A_T$ : atividade de transfrutossilagem;

$A_H$ : atividade hidrolítica

Fonte: do autor.

#### 5.1.1.1 Atividade de transfrutossilagem ( $A_T$ )

Na Tabela 5 observou-se, com exceção dos termos linear do pH e da interação entre as duas variáveis (concentração de glutaraldeído x pH de imobilização), que os demais efeitos foram significativos para o modelo quadrático na atividade de transfrutossilagem ( $A_T$ ) da biomassa imobilizada, a um nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ). O Diagrama de Pareto (Figura 2) indica que a um nível de significância de 0,05, apenas os termos linear do pH e o de interação entre as duas variáveis (concentração de glutaraldeído x pH) não foram significativos. Desta forma, estes termos foram excluídos do modelo gerado, apresentado pela Equação (18).

$$A_T = 820,63 - 50,81. ([GLU]) - 100,17. ([GLU])^2 - 221,73. (pH)^2 \quad (18)$$

em que  $A_T$  refere-se à atividade de transfrutossilagem da biomassa imobilizado,  $[GLU]$  e  $pH$  representam a concentração de glutaraldeído e o pH na etapa de imobilização, respectivamente.

Tabela 5 - Efeitos estimados, erro padrão e *p*-valor para avaliação dos efeitos da concentração de glutaraldeído e pH na atividade de transfrutossilagem após a etapa de imobilização da biomassa.

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	<i>p</i> -valor
Média	820,64	18,47	0,000
[GLU] (L)*	<b>-101,63</b>	<b>26,12</b>	<b>0,008</b>
[GLU] (Q)**	<b>-200,36</b>	<b>29,21</b>	<b>0,0005</b>
pH (L)*	-47,93	26,12	0,116
pH (Q)**	<b>-443,48</b>	<b>29,21</b>	<b>0,000005</b>
[GLU] x pH	-51,69	36,94	0,21

\* L refere-se ao termo linear do modelo estatístico

\*\*Q refere-se ao termo quadrático do modelo estatístico

Fonte: do autor.

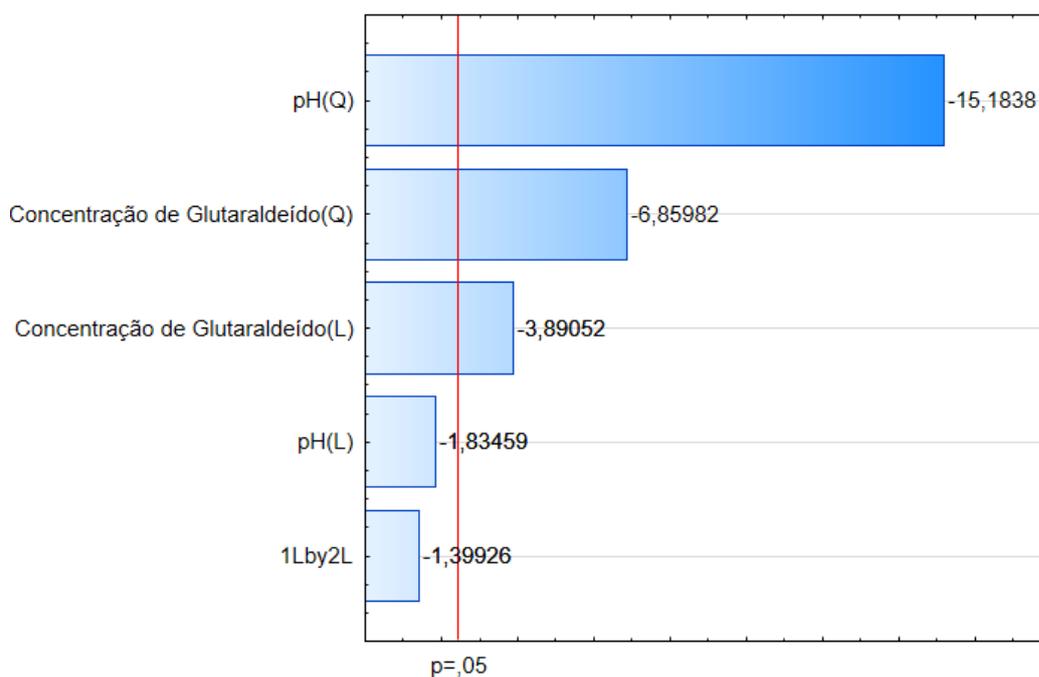


Figura 2 - Diagrama de Pareto para as variáveis concentração de glutaraldeído e pH na atividade de transfrutossilagem da biomassa imobilizada.

Fonte: do autor.

O *Teste F*, dado pela Equação (19), possibilitou verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais. O valor calculado pela Equação (19) foi comparado com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência ( $F_{\text{Graus}}$  de liberdade do modelo; Graus de liberdade do desvio; Nível de significância) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

$$\text{Teste } F = \frac{\text{Quadrados Médios da Regressão}}{\text{Quadrados Médios dos Resíduos}} \quad (19)$$

Na Tabela 6 é apresentada a análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático com interação aplicado para a atividade de transfrutossilação ( $A_T$ ) da biomassa (micélio) imobilizada. O ajuste do modelo foi avaliado por meio do coeficiente de determinação de erro ( $R^2$ ). Cerca de 95,84 % da variabilidade das respostas observadas podem ser explicadas pelo modelo ajustado pela Equação (18), valor este muito satisfatório, uma vez que valores acima de 90 % são considerados como muito bons (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 6 - Resultado da análise de variância para a regressão quadrática com interação para a avaliação dos efeitos de pH e concentração de glutaraldeído na atividade de transfrutossilação da biomassa (micélio) imobilizada.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
<i>Regressão</i>	356113,50	3	118704,5	61,44	<0,0001
<i>Resíduos</i>	15455,60	8	1931,95		
<i>Falta de ajuste</i>	13053,60				
<i>Erro Puro</i>	2402,10				
<i>Total</i>	371569,10	11			
<b>R<sup>2</sup>= 0,958</b>	<b>F<sub>3;8;0,05</sub> =4,07</b>				

Fonte: do autor.

Como o coeficiente de variação explicada foi elevado e o valor tabelado de  $F$  para nível de significância de 5 % foi de 4,07, inferior ao valor de 61,44 obtido com o modelo, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é maior que a variação não explicada e, portanto, o modelo pode ser considerado válido. Desta forma, o modelo de regressão pode ser utilizado para se gerar a superfície de resposta (Figura 3-A) e a curva de contorno (Figura 3-B). Observou-se a formação de uma região ótima em que foram obtidos os maiores valores para as atividades de transfrutossilação, entre as regiões de pH 7,5 e 8,3 e concentração de glutaraldeído de 1,65 % a 2,3 % (v/v).

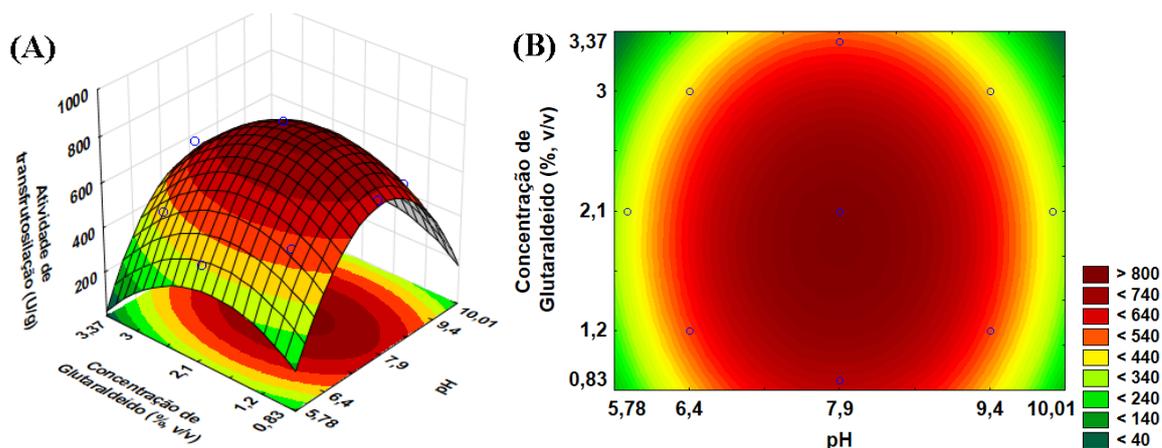


Figura 3 - Atividade de transfrutossilação em função da concentração de glutaraldeído e do pH durante a etapa de imobilização: (A) superfície de resposta e (B) curva de contorno.

Fonte: do autor.

#### 5.1.1.2 Atividade hidrolítica ( $A_H$ )

Na Tabela 7 observou-se que o pH de imobilização não apresentou nenhum termo significativo, bem como não foi significativo o termo de interação entre as duas variáveis. Foram significativos apenas os termos dos efeitos da concentração de glutaraldeído, linear e quadrático, na atividade hidrolítica da biomassa (micélio) imobilizada, a um nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ), conforme mostrado pelo Diagrama de Pareto apresentado na Figura 4.

Tabela 7 - Efeitos estimados, erro padrão e  $p$ -valor para avaliação dos efeitos da concentração de glutaraldeído e pH na atividade hidrolítica após a etapa de imobilização da biomassa.

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	126,2875	10,35	0,00002
[GLU] (L)*	<b>-46,7347</b>	<b>14,64</b>	<b>0,019</b>
[GLU] (Q)**	<b>110,5287</b>	<b>16,37</b>	<b>0,0005</b>
pH (L)*	-15,9619	14,64	0,32
pH (Q)**	-14,0862	16,37	0,42
[GLU] x pH	-8,35	20,70	0,7

\* L refere-se ao termo linear do modelo estatístico

\*\*Q refere-se ao termo quadrático do modelo estatístico

Fonte: do autor.

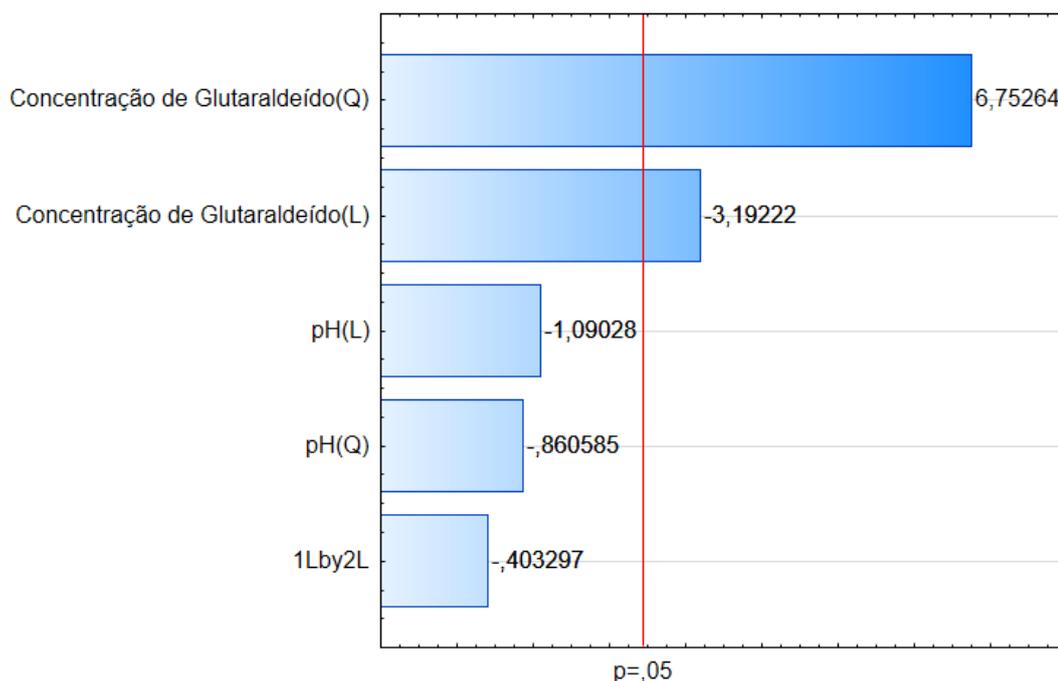


Figura 4- Diagrama de Pareto para as variáveis concentração de glutaraldeído e pH na atividade hidrolítica da biomassa (micélio) imobilizada.

Fonte: do autor.

Desta forma, os termos não significativos foram eliminados do modelo gerado, representado pela Equação (20).

$$A_H = 120,65 - 23,367. ([GLU]) + 56,67. ([GLU])^2 \quad (20)$$

em que  $A_H$  refere-se à atividade hidrolítica da biomassa imobilizada e  $[GLU]$  representa a concentração de glutaraldeído na etapa de imobilização da biomassa.

Na Tabela 8 é apresentada a análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático com interação aplicado para a atividade hidrolítica da biomassa imobilizada. O ajuste do modelo foi avaliado por meio do coeficiente de determinação de erro ( $R^2$ ). Cerca de 88,14 % da variabilidade das respostas observadas podem ser explicadas pelo modelo ajustado pela Equação (20), valor este que também pode ser considerado satisfatório.

Tabela 8 - Resultado da análise de variância para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos de pH e concentração de glutaraldeído na atividade hidrolítica da biomassa imobilizada.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
<i>Regressão</i>	25780,46	2	12890,23	33,44	<0,0001
<i>Resíduos</i>	3468,78	9	385,42		
<i>Falta de ajuste</i>	3160,95				
<i>Erro Puro</i>	307,83				
<i>Total</i>	29249,24	11			
<b>R<sup>2</sup>= 0,8814</b>	<b>F<sub>2;9;0,05</sub>=4,26</b>				

Fonte: do autor.

Considerando o elevado valor do coeficiente de variação explicada e que o valor de  $F$  calculado para o modelo foi de 33,44, superior ao valor de 4,26 para  $F$  tabelado a um nível de significância de 5 %, pode-se usar o modelo para explicar os dados experimentais. Desta forma, o modelo de regressão desenvolvido foi representado graficamente por meio da superfície de resposta (Figura 5-A) e sua curva de contorno (Figura 5-B). De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o pH da imobilização não afetou a atividade hidrolítica. Os valores mais baixos de atividade hidrolítica foram determinados na região cujas concentrações de glutaraldeído estiveram compreendidas entre 2,0 % a 2,5 % (v/v).

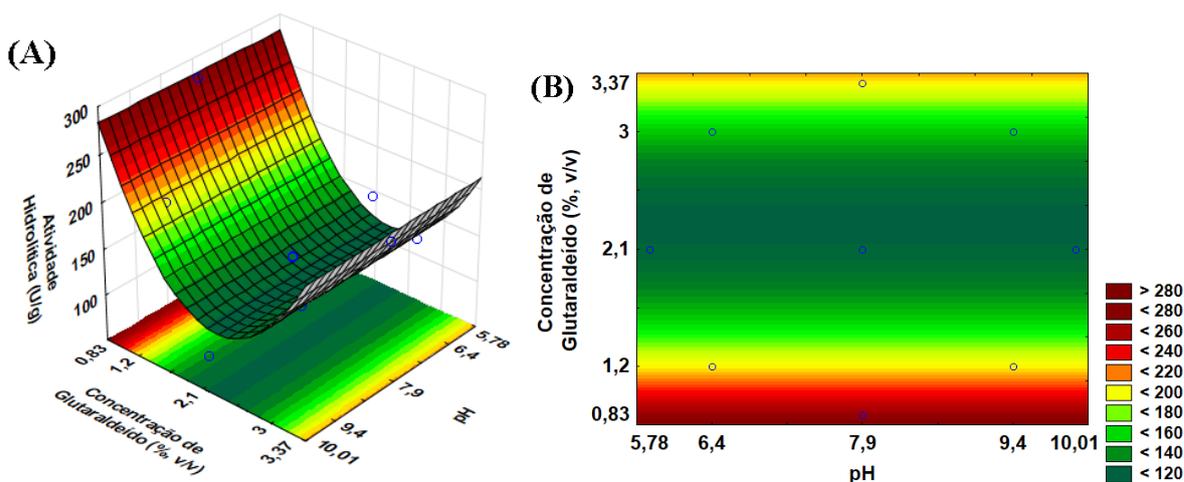


Figura 5 - Atividade hidrolítica em função do pH e da concentração de glutaraldeído durante a etapa de imobilização: (A) superfície de resposta e (B) curva de contorno.

Fonte: do autor.

### 5.1.1.3 Razão entre as atividades de transfrutossilacção e hidrolítica ( $A_T/A_H$ )

Ao se avaliar os valores obtidos para a resposta razão ( $A_T/A_H$ ) pode-se concluir, por meio do teste de aderência de Shapiro-Wilk quanto a normalidade da população (RODRIGUES; IEMMA, 2009), que os resultados obtidos não constituem uma distribuição normal (distribuição de Gauss). Como o planejamento experimental baseia-se em estatística paramétrica e, portanto, é fortemente dependente da normalidade dos dados analisados, resultados provenientes de uma análise feita por um delineamento central composto rotacional não seriam confiáveis para a resposta razão ( $A_T/A_H$ ). Desta forma, somente foi possível a análise pontual das respostas obtidas.

Ao se analisar a Tabela 4, foi possível observar que os maiores valores obtidos para a resposta razão ( $A_T/A_H$ ) são de 6,61; 5,97; 6,28 e 7,26; todos obtidos quando a concentração de glutaraldeído utilizada foi de 2,1 % (v/v) e o pH utilizado foi de 7,9. Condições estas em que também foram obtidas as maiores atividades de transfrutossilacção e as menores atividades hidrolítica, já avaliadas nos tópicos 5.1.1 e 5.1.2, respectivamente. Desta forma, pode-se concluir que ao se avaliar a resposta razão ( $A_T/A_H$ ), as condições de 2,1 % (v/v) de concentração de glutaraldeído e pH 7,9 podem ser consideradas as melhores condições de imobilização entre todas as condições estudadas.

### 5.1.2 Comparação das atividades enzimáticas antes e após a imobilização da biomassa catalítica

Uma vez estabelecidas as condições ótimas de concentração de glutaraldeído e pH para a etapa de imobilização, realizou-se um ensaio a fim de se comparar possíveis mudanças nas atividades enzimáticas (transfrutossilação e hidrolítica) após imobilização da biomassa. Assim, a imobilização foi conduzida em triplicata nas condições ótimas obtidas (pH 7,9 e 2,1 % (v/v) de glutaraldeído) e as atividades da biomassa imobilizada foram quantificadas. Obtiveram-se também as atividades da biomassa livre (sem adição de glutaraldeído) após sua incubação em pH 7,9 por 90 minutos (tempo este igual ao tempo de incubação da biomassa imobilizada). Os valores para as atividades, para ambos as condições, assim como a relação entre as biomassas imobilizada e livre, estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de atividades enzimáticas (transfrutossilação e hidrolítica) para as biomassas livre e imobilizada.

<b>Condição</b>	<b>A<sub>T</sub> (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>A<sub>H</sub> (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>A<sub>T</sub>/A<sub>H</sub></b>
	779,73	122,61	6,36
<b>Biomassa livre</b>	653,31	75,52	8,65
	708,09	115,55	6,13
<i>Atividade média</i>	713,61 ± 63,40	104,56 ± 25,40	7,05 ± 1,39
	819,92	64,46	12,72
<b>Biomassa imobilizada</b>	810,49	58,11	13,95
	821,06	65,08	12,62
<i>Atividade média</i>	817,16 ± 5,80	62,55 ± 3,86	13,09 ± 0,75
<b>Relação de biomassa (Imobilizada / livre)</b>	1,14	0,60	1,86

A<sub>T</sub>: atividade de transfrutossilação; A<sub>H</sub>: atividade hidrolítica.

Fonte: do autor.

Observa-se que todos os valores das atividades de transfrutossilação determinados para a biomassa imobilizada foram maiores que os valores da mesma atividade obtidos para a biomassa livre, indicando que, com a imobilização da biomassa (micélio) com glutaraldeído, foi possível obter um ganho de aproximadamente 14% na atividade. De acordo com López-Gallego et al. (2005c), a presença do glutaraldeído pode, muitas vezes, aumentar a estabilidade

enzimática, tornando a enzima menos vulnerável à perda de atividade ao longo de uma reação. Desta forma, é possível que a imobilização tenha aumentado a estabilidade da enzima, fazendo com que esta retenha sua atividade por mais tempo em relação à enzima presente na biomassa livre (sem imobilização), resultando em valores finais superiores de atividade de transfrutossilação. A reticulação da biomassa com glutaraldeído muitas vezes ocorre por meio de ligações entre grupos amino das células e os grupos aldeídos por meio da formação de bases de Schiff (grupos imina) (MIGNEAULT et al., 2004b; MONSAN, 1978). Estas ligações podem ainda se estender aos grupos amino de resíduos de lisina presente em muitas proteínas, de modo que a reticulação do conjunto enzima e biomassa pode aumentar a estabilidade enzimática, proporcionando até mesmo um aumento da resistência da enzima à extração por água durante o processo de lavagem do micélio, reduzindo as perdas da enzima por arraste, assim como observado por Long et al. (1996) durante a imobilização por reticulação de lipase aderida ao micélio de *Aspergillus flavus*. Desta forma, a biomassa imobilizada apresenta  $A_T$  maior que a biomassa livre possivelmente devido ao fato do processo de reticulação reduzir as perdas de FTase por arraste durante o processo de lavagem realizado em ambos os biocatalisadores antes dos ensaios de atividade.

Todos os valores obtidos para a atividade hidrolítica foram inferiores aos exibidos, para a mesma atividade, pela biomassa livre (Tabela 9), indicando, portanto, que a imobilização da biomassa do fungo possibilitou reduzir em 40 % a hidrólise enzimática das moléculas de sacarose. De acordo com Hidaka, Hirayama e Sumi (1988) e Cuervo-Fernández et al. (2007), ocorre uma competição entre a molécula de água e da sacarose na transferência do grupo frutossil, competição esta dependente da afinidade entre enzima e substrato. Assim, a redução da atividade hidrolítica após a imobilização da biomassa pode ser explicada por um aumento da afinidade entre a enzima e o substrato (sacarose) como acceptor causadas por alterações na estrutura enzimática. Esta mudança de afinidade faz com que se torne mais frequente as reações de transferência de um grupo frutossil para uma molécula de sacarose após a reticulação, aumentando a atividade de transfrutossilação e reduzindo a transferência de grupos frutossil para o meio aquoso (atividade hidrolítica). De acordo com Mattiasson e Hahn-Hagerdal (1982), o processo de imobilização celular pode reduzir a atividade da água devido ao aumento de sua pressão osmótica no interior das células após a imobilização. Assim, as concentrações alteradas de metabólitos desencadeiam caminhos metabólicos alternativos, podendo aumentar a produtividade de uma determinada substância, similar ao que ocorre com os lactobacilos que aumentam a produção de diacetil e reduzem a produção de lactato quando a presença da água no interior das células é reduzida (TROLLER; STINSON, 1981). Como a FTase micelial

apresenta, concomitantemente, atividades de transfrutossilacção e hidrolítica, a redução da presença da água no interior celular reduz a atividade hidrolítica e esta redução favorece maiores rendimentos para a produção de frutooligossacarídeos (HIDAKA et al., 1988; MARESMA et al., 2010; OLIVEIRA, 2007).

Todos os valores obtidos para a razão ( $A_T/A_H$ ) da biomassa imobilizada mostraram-se superiores aos valores obtidos para a biomassa livre (Tabela 9), o que indica que a imobilização da biomassa com glutaraldeído proporcionou o aumento da razão entre as atividades da FTase presente na biomassa imobilizada. Uma vez que a razão ( $A_T/A_H$ ) depende, além da concentração de sacarose, da afinidade da FTase com a sacarose como acceptora, é possível que houve um aumento da afinidade entre a enzima e a sacarose devido a reticulação com glutaraldeído, proporcionando um aumento na razão ( $A_T/A_H$ ). Este ganho de atividade, aproximadamente 86 %, é vantajoso em termos de processo, uma vez que há maior predominância da atividade de transfrutossilacção sobre a atividade hidrolítica, tornando possível maiores rendimentos voltados à produção de frutooligossacarídeos (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; GHAZI et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; OLIVEIRA, 2007).

### 5.1.3 Determinação do teor de massa efetiva ( $m_{ef}$ ) no micélio úmido

Na Tabela 10 estão dispostos os resultados obtidos nos ensaios de determinação do teor de massa seca presente no micélio úmido. Foi determinado como teor de massa efetiva ( $m_{ef}$ ) a fração de biomassa presente na amostra de micélio úmido nas condições livre e imobilizada. Os valores médios obtidos foram utilizados nas Equações (16) e (17) para o cálculo das atividades enzimáticas.

Tabela 10 – Resultados obtidos na determinação do teor de massa presente no micélio úmido.

Condição	Massa úmida (g)	Massa seca (g)	Teor de massa seca (%)	$m_{ef}$
Livre	0,1507	0,0196	13,04	0,127 ± 0,006
	0,1603	0,0194	12,10	
	0,1951	0,0241	12,35	
	0,1508	0,0202	13,40	
Imobilizado	0,1486	0,0186	12,52	0,130 ± 0,007
	0,142	0,0195	13,73	
	0,1684	0,0207	12,29	
	0,1678	0,0227	13,53	

Fonte: do autor.

## 5.2 Estudos de caracterização das biomassas catalíticas livre e imobilizada

Neste tópico, são apresentados os resultados de caracterização enzimática da FTase microbiana presente nas biomassas livre e imobilizada. Foram investigados a influência da temperatura, pH e concentração de substrato do meio reacional, as estabilidades térmica e frente ao pH e obtidos valores para os parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

### 5.2.1 *Influência da temperatura do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutosilação*

Foi avaliado a influência da temperatura do meio reacional nas atividades enzimáticas, conforme descrito no Tópico 4.4.1. Analisando a Figura 6, o aumento da temperatura proporcionou um aumento na atividade de transfrutosilação, possivelmente este aumento deve-se ao maior número de colisões entre os sítios ativos da enzima e o substrato em elevadas temperaturas (FIELDS, 2001; SHULER; KARGI, 2002). Para as temperaturas de 60 °C e 65 °C, também houve um aumento da atividade hidrolítica, resultado este atribuído a faixa de temperatura ótima para a hidrólise enzimática das moléculas de sacarose (60°C a 65 °C), conforme reportado nos trabalhos de Almeida et al. (2005) e Ganaie, Lateef e Gupta (2014).

Quanto ao comportamento da razão entre as atividades ( $A_T/A_H$ ) foi observado que, para as temperaturas compreendidas entre 30 °C e 55 °C, a razão se manteve relativamente alta (maior que 6,0), com valor máximo de  $9,44 \pm 0,82$  para a temperatura de 50 °C. Por outro lado, para as temperaturas de 60 °C e 65 °C, notou-se uma redução expressiva da razão ( $A_T/A_H$ ) devido ao aumento da atividade hidrolítica (ALMEIDA et al., 2005; SCHÜÜRMAN et al., 2014). Ressalta-se que, apesar dos elevados valores de atividade de transfrutosilação obtidos para as temperaturas de 60 °C e 65 °C, estas não são consideradas temperaturas ótimas para a atividade da FTase uma vez que, para as mesmas temperaturas, tem-se maiores atividades hidrolíticas e, conseqüentemente, baixos valores de razão ( $A_T/A_H$ ). Portanto, para a biomassa livre, a melhor condição para a atividade de transfrutosilação ocorreu para a faixa de temperatura compreendida entre 45 °C e 55 °C, justificada pelos maiores valores de razão ( $A_T/A_H$ ).

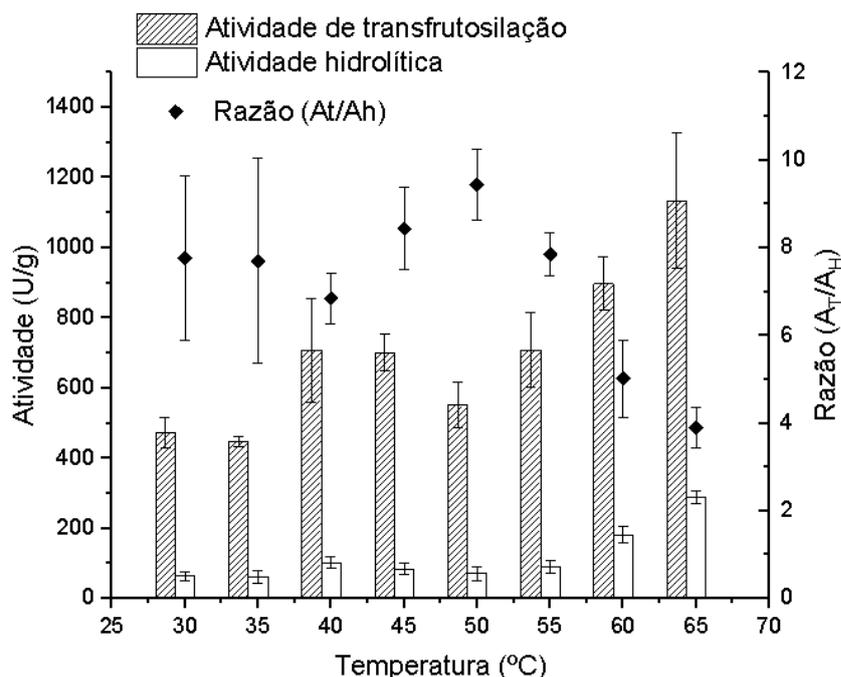


Figura 6- Influência da temperatura nas atividades hidrolítica (A<sub>H</sub>), de transfrutossilação (A<sub>T</sub>) e razão (A<sub>T</sub>/A<sub>H</sub>) da FTase aderida à biomassa livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 5,5.

Fonte: do autor.

O comportamento da FTase presente na biomassa imobilizada está ilustrado na Figura 7. Foi observado que, assim como para a biomassa livre, houve um aumento das atividades hidrolítica e de transfrutossilação ocasionado pela aumento das temperaturas do meio reacional. Em maior parte, os valores das atividades de transfrutossilação da biomassa imobilizada superaram os valores obtidos para a biomassa livre. Entretanto, verificou-se uma redução da atividade de transfrutossilação a 65 °C, diferentemente do observado, na mesma temperatura, para a biomassa livre. Enquanto a biomassa imobilizada exibiu aumento da sua atividade de transfrutossilação até 60 °C com redução a 65 °C, a biomassa livre manteve a atividade elevada para as mesmas temperaturas. Portanto, reações de transfrutossilação, utilizando a biomassa imobilizada, são favorecidas para uma faixa de temperatura compreendida entre 50 °C e 55 °C devido aos elevados valores de razão (A<sub>T</sub>/A<sub>H</sub>), tornando possível obter maiores rendimentos na produção de FOS (HIDAKA et al., 1988; MARESMA et al., 2010; OLIVEIRA, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles alcançados por Cunha (2017) em que se obteve a máxima atividade de transfrutossilação (entre 260 U.g<sup>-1</sup> e 333,88 U.g<sup>-1</sup>) para uma faixa de temperatura de 45 °C a 60 °C utilizando biomassa livre de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Ganaie et al., (2014), por sua vez, com o encapsulamento da

biomassa de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364 em alginato de sódio, obtiveram um aumento da temperatura ótima para a enzima FTase micelial, em que elevadas atividades de transfrutossilação ( $45 \text{ U.mL}^{-1}$ ) foram obtidas para temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto a FTase oriunda desta mesma biomassa apresentou na forma livre maior atividade de transfrutossilação a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $35 \text{ U.mL}^{-1}$ ).

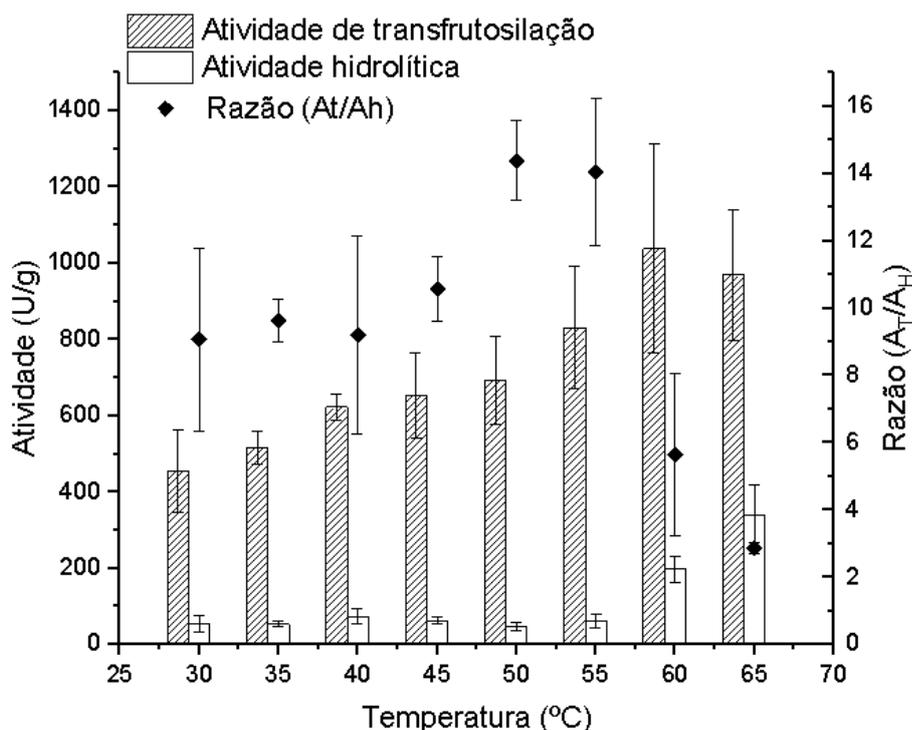


Figura 7- Influência da temperatura nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilação ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa imobilizada. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5,5.

Fonte: do autor.

Hirayama, Sumi e Hidaka (1989) em seus estudos de caracterização enzimática obtiveram as maiores atividades de transfrutossilação ( $419,32 \text{ U.g}^{-1}$ ) para uma faixa de temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , para a biomassa seca de *Aspergillus niger* ATCC20611. Resultados similares foram obtidos por Cuervo-Fernández et al. (2004), com  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  como a temperatura ótima para produção de FOS, obtendo maior atividade de transfrutossilação (cerca de  $1000 \text{ U.g}^{-1}$ ) utilizando a biomassa úmida de *Aspergillus* sp 27H. Ning et al. (2010) também obtiveram a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  as maiores atividades de transfrutossilação ( $80 \text{ U.g}^{-1}$ ) para a biomassa úmida de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Quando avaliado o comportamento da razão entre atividades ( $A_T/A_H$ ) para a biomassa imobilizada (Figura 7), foram obtidos valores maiores que 8,0 para as temperaturas compreendidas entre 30 °C e 55 °C, com valor máximo de razão igual a  $14,38 \pm 1,19$  a 50 °C. Com exceção do ocorrido na temperatura de 65 °C, todos os valores de razão ( $A_T/A_H$ ) observados para a biomassa imobilizada foram maiores que os obtidos para a biomassa livre na mesma temperatura.

O aumento da razão ( $A_T/A_H$ ) a 50 °C, de  $9,44 \pm 0,82$  (biomassa livre) para  $14,38 \pm 1,19$  (biomassa imobilizada), é expressivo em termos de aplicação deste biocatalisador. Nos estudos de Cuervo-Fernández et al. (2007) foram listadas razões entre atividades ( $A_T/A_H$ ) de 16 linhagens distintas de *Aspergillus* modificadas geneticamente para a produção de FOS. O maior valor encontrado foi de 13,72 para a biomassa catalítica de *Aspergillus niger* ATCC 20611, valor este inferior ao obtido no presente trabalho ( $14,38 \pm 1,19$ ). Além disso, no mesmo estudo, os autores reportaram uma razão ( $A_T/A_H$ ) de 10,86 para a biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Os resultados mostram, portanto, que a técnica de imobilização de biomassa microbiana por meio da reticulação com glutaraldeído é favorável ao aumento e redução das atividades de transfrutoseilação e hidrolítica, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos, a temperatura de 50 °C para o meio reacional foi selecionada para se realizar ensaios de estabilidade operacional com as biomassas catalíticas livre e imobilizada visando a produção de FOS.

### 5.2.2 Estabilidade térmica das biomassas catalíticas livre e imobilizada e determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os estudos de estabilidade térmica das biomassas catalíticas livre e imobilizada foram realizados para três diferentes temperaturas. Os parâmetros, obtidos a partir de resultados experimentais dispostos nas Figuras 8, 9 e 10, como o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), o fator de estabilidade (FE), a quantidade mínima de energia para que ocorra a inativação ( $E_D$ ) e as variações de entalpia de desnaturação ( $\Delta H^*$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) durante a inativação térmica e de entropia ( $\Delta S^*$ ) associada a desnaturação térmica estão disponíveis na Tabela 11. Os dados das curvas de desnaturação térmica (Figuras 8 e 9) foram ajustados por meio de modelo exponencial e  $E_D$  foi obtido pelo ajuste linear da Equação de Arrhenius (Figura 10).

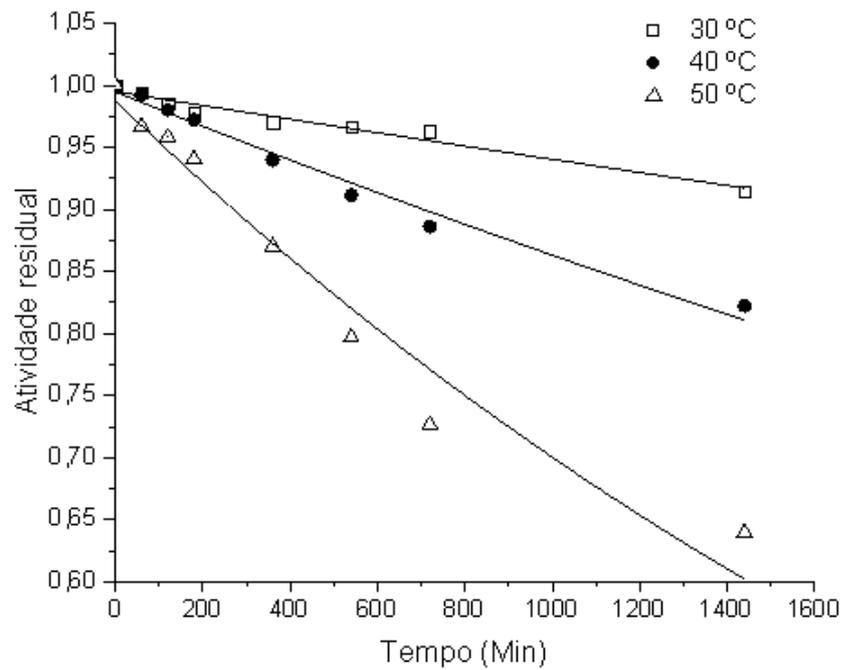


Figura 8- Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutoseilação residual da FTase aderida à biomassa (micélio) livre.

Fonte: do autor.

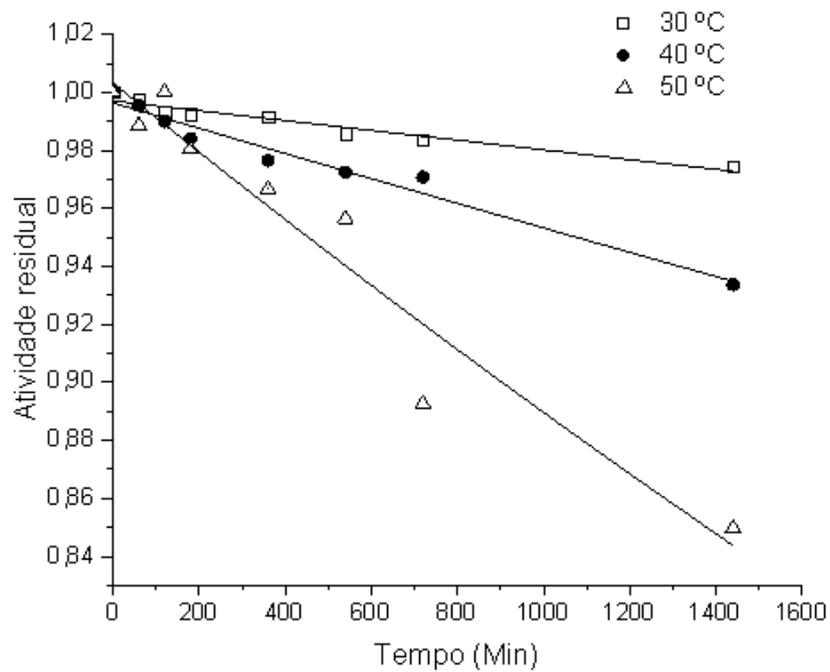


Figura 9- Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutoseilação residual da FTase aderida à biomassa (micélio) immobilizada.

Fonte: do autor.

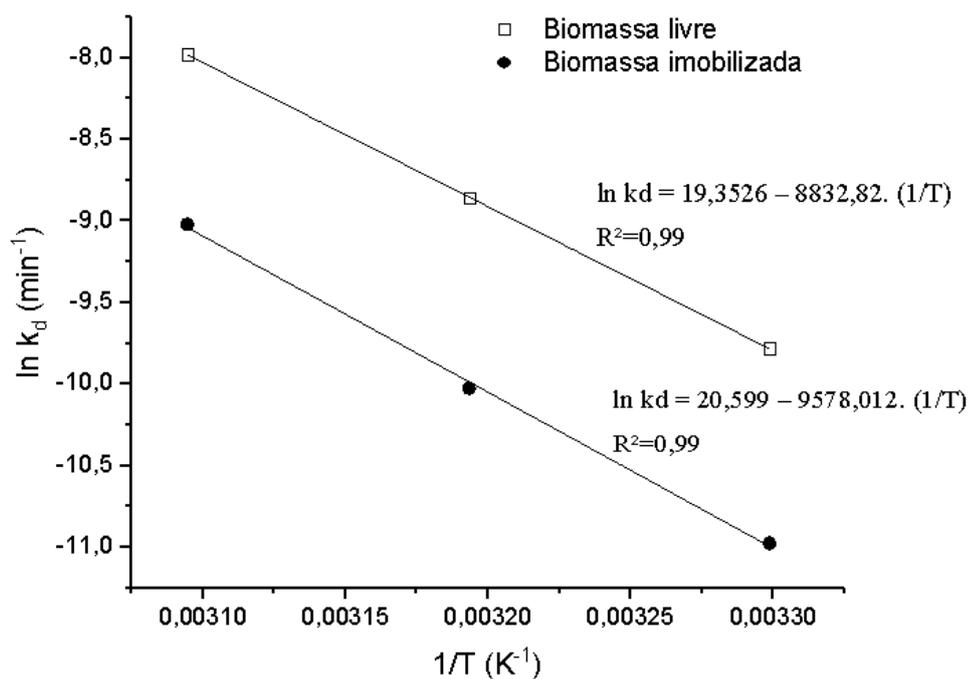


Figura 10- Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de inativação ( $E_D$ ) da FTase presente nas biomassas catalíticas livre e imobilizada.

Fonte: do autor.

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a FTase presente nas biomassas livre e imobilizada, incubada em diferentes temperaturas.

Parâmetros	FTase	Temperatura (°C)		
		30	40	50
$R^2$	L	0,95	0,97	0,95
	I	0,94	0,96	0,92
$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	L	0,000057	0,00014	0,00034
	I	0,000017	0,000044	0,00012
$t_{1/2}$ (min)	L	12268,1	4881,3	2020,8
	I	40534,9	15682,1	5728,5
Fator de estabilidade (FE)		3,3	3,2	2,8
$E_D$ (kJ/mol)	L		73,44	
	I		79,63	
$\Delta H_D^*$ (kJ/mol)	L	70,92	70,83	70,75
	I	77,11	77,03	76,94
$\Delta G_D^*$ (kJ/mol)	L	109,26	110,55	111,79
	I	112,27	113,59	114,59
$\Delta S^*$ (kJ/mol.K)	L	-0,13	-0,13	-0,13
	I	-0,12	-0,12	-0,12

L: FTase aderida à biomassa livre; I: FTase aderida à biomassa reticulada.

Fonte: do autor.

Por definição, o tempo de meia vida representa o tempo em que a enzima perde 50 % de sua atividade inicial a uma dada temperatura, de forma que quanto maior o seu valor, maior é a capacidade da enzima em resistir a uma determinada temperatura por mais tempo (SOUZA et al., 2015). Com o processo de imobilização, foi obtido um aumento do tempo de meia vida, com valores positivos para o fator de estabilidade (FE) em todas as temperaturas investigadas, indicando maior estabilidade da biomassa imobilizada. Para as temperaturas avaliadas, notou-se maior estabilidade térmica para as biomassas imobilizadas quando comparadas às biomassas livres, isto é, foram obtidas biomassas com valores de 3,3, 3,2 e 2,8 vezes mais estáveis para as temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, respectivamente.

O valor do tempo de meia vida reduziu com o aumento da temperatura para as biomassas livre e imobilizada devido ao aumento da desnaturação da enzima. A 30 °C foi obtido para o tempo de meia vida da enzima imobilizada (40534,9 min) um valor aproximadamente 7 vezes maior que o obtido para a enzima imobilizada a 50 °C (5728,5 min).

De acordo com a análise realizada, pode-se observar que a imobilização proporcionou um aumento da energia de inativação térmica ( $E_D$ ) da FTase. Desta forma, a reticulação da biomassa com glutaraldeído possibilitou uma melhoria na termoestabilidade da enzima micelial, uma vez que é necessário fornecer uma maior quantidade de energia térmica para que a enzima seja inativada após a imobilização. Esta melhora na termoestabilidade enzimática também ficou evidenciada ao se analisar os parâmetros termodinâmicos obtidos. Para a variação da entalpia de desnaturação térmica ( $\Delta H^*$ ), foram obtidos maiores valores para a FTase micelial da biomassa imobilizada do que para a enzima da biomassa livre em todas as temperaturas analisadas. Altos valores para a variação da entalpia de desnaturação térmica ( $\Delta H^*$ ) estão diretamente associados a uma elevada estabilidade térmica da enzima (SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015). A extensão da inativação também depende da variação de entropia ( $\Delta S^*$ ) associada a desnaturação térmica, que expressa a quantidade de energia envolvida na transição do estado nativo da enzima para um estado inativado da enzima. Conforme mostrado na Tabela 11, todos os valores de  $\Delta S^*$  foram negativos para a FTase micelial aderida às biomassas livre e imobilizada, o que indica que houve uma redução do grau de aleatoriedade com a inativação enzimática. De acordo com Saqib et al. (2010) algumas enzimas, na inativação térmica, podem apresentar um estado de transição mais ordenado, de forma que  $\Delta S^*$  apresenta valores negativos e indica que este não é um processo natural, demandando energia ( $E_D$ ) para se levar a enzima ao estado de desnaturação.

Os valores obtidos para a variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) foram levemente maiores para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada. Este parâmetro consiste na forma mais precisa e confiável de se avaliar a estabilidade de uma enzima, por considerar simultaneamente as contribuições da entalpia e da entropia. Quanto menor ou negativo for seu valor, pode-se considerar que mais espontaneamente a enzima torna-se menos estável e se desnatura. Desta forma, o aumento da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) com a imobilização indica que a enzima aumentou sua estabilidade térmica com o processo de reticulação com glutaraldeído. Além disso, pode-se observar que a FTase apresentou valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) superiores a 100 kJ/mol tanto na forma livre como imobilizada, portanto, dentro do intervalo de valores (100 a 115 kJ/mol) descritos em literatura para várias enzimas consideradas termoestáveis (SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

Desta forma, após a análise de todos os parâmetros avaliados neste tópico, pode-se afirmar que a imobilização da biomassa microbiana por reticulação possibilitou maior estabilidade térmica da FTase micelial, além do aumento de seu tempo de meia vida.

### *5.2.3 Influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilagem*

Foi avaliado a influência do pH do meio reacional nas atividades enzimáticas, conforme descrito no Tópico 4.4.3. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para a biomassa livre. Pode-se observar que na condição mais ácida (pH 3,5), a atividade hidrolítica foi predominante e apresentou seu maior valor ( $707 \pm 102 \text{ U.g}^{-1}$ ). De acordo com Oliveira (2007), em condições de pH inferior a 4,0 a atividade hidrolítica pode ser atribuída à hidrólise ácida da sacarose, o que justifica os elevados valores de atividade hidrolítica obtidos nestas condições.

A atividade de transfrutossilagem se mostrou estável em condições de pH entre 4,5 e 6,0, apresentando nesta faixa um valor médio de  $707 \pm 140 \text{ U.g}^{-1}$ , com um valor máximo de  $803 \pm 34 \text{ U.g}^{-1}$  para pH 5,5 apresentando uma queda de atividade em condições de pH superior a 6,5.

Foi observado a presença de uma região com maiores valores de razão ( $A_T/A_H$ ) entre pH 5,5 e 7,5, com um máximo de  $7,49 \pm 0,36$  na condição de pH 5,5. A queda na razão ( $A_T/A_H$ ) nas condições mais ácidas de pH se deve, possivelmente, à ocorrência da hidrólise ácida da sacarose em conjunto com a atividade hidrolítica elevada (OLIVEIRA, 2007).

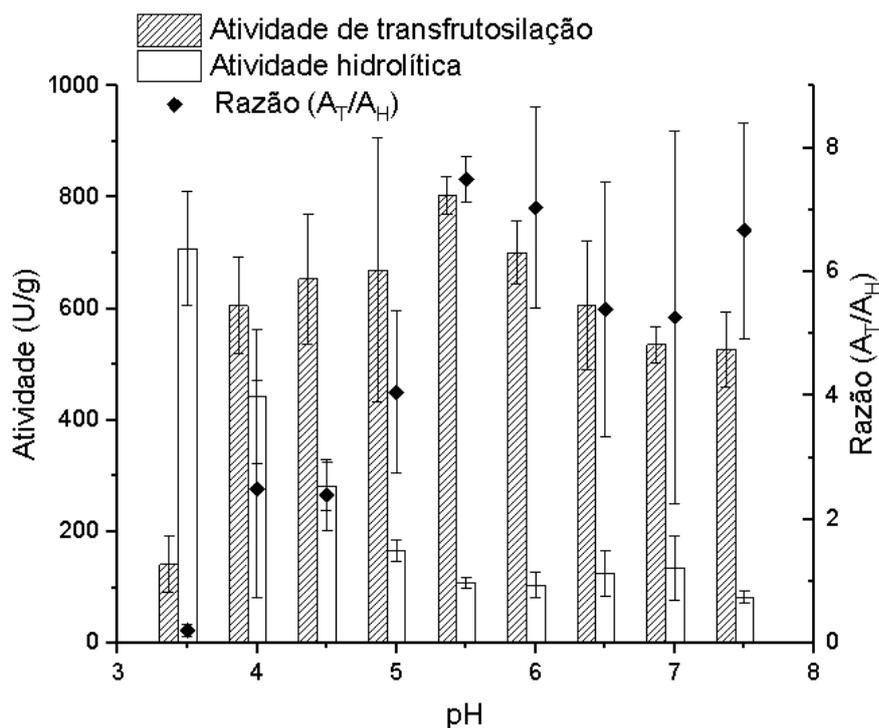


Figura 11- Influência do pH nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutossilação ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, a 50 °C.

Fonte: do autor.

Na Figura 12, pode-se observar o comportamento da FTase aderida à biomassa imobilizada. Verificou-se que a atividade hidrolítica apresentou máximo valor ( $1174 \pm 257 \text{ U.g}^{-1}$ ) na condição mais ácida (pH 3,5). Os altos valores de atividade hidrolítica obtidos nas condições de pH 3,5 e 4,0 podem ser atribuídos à ocorrência da hidrólise ácida da sacarose (OLIVEIRA, 2007). Com relação a atividade de transfrutossilação, foi observado um valor máximo ( $1492 \pm 111 \text{ U.g}^{-1}$ ) para pH 5,5 do meio reacional. Observou-se, ainda, a presença de uma faixa ótima entre pH 5,0 e 7,0, com uma atividade de transfrutossilação média de  $1234 \pm 159 \text{ U.g}^{-1}$  e uma predominância da atividade de transfrutossilação sobre a atividade hidrolítica, confirmando assim essa região como a região ótima. Ao se comparar as atividades de transfrutossilação da biomassa livre (Figura 11) com as atividades da biomassa imobilizada (Figura 12), nota-se que a atividade de transfrutossilação apresentada pela biomassa imobilizada foi maior em todos os valores de pH avaliados. Este fato mostra que o processo de reticulação micelial minimizou os efeitos de queda de atividade da FTase devido à influência do pH, possivelmente por tornar a enzima menos susceptível às variações das forças iônicas do meio

reacional, devido às novas ligações cruzadas presentes entre enzima e micélio geradas no processo de reticulação da biomassa (LONG et al., 1996; SHULER; KARGI, 2002).

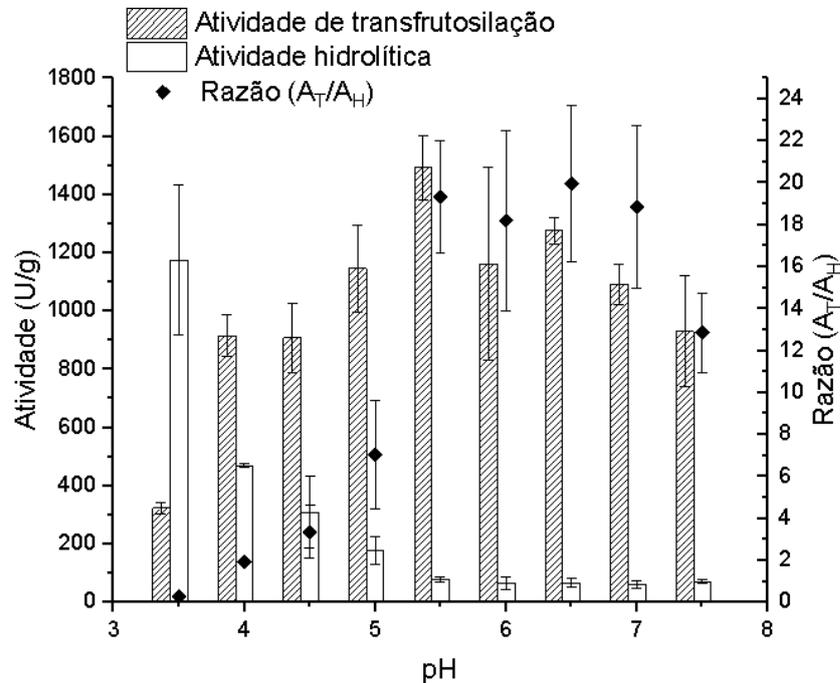


Figura 12- Influência do pH nas atividades hidrolítica ( $A_H$ ), de transfrutoseilação ( $A_T$ ) e razão ( $A_T/A_H$ ) da FTase aderida à biomassa (micélio) imobilizada. Meio reacional constituído por solução de sacarose 48,02 % (m/v) e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, a 50 °C.

Fonte: do autor.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles alcançados por Cunha (2017) em que obteve para a FTase presente na biomassa úmida de *Aspergillus oryzae* IPT-301 uma faixa ótima de atividade de transfrutoseilação entre os valores de pH de 4,5 e 6,0, com uma atividade de transfrutoseilação máxima (333,88 U.g<sup>-1</sup>) em pH 5,5. Cuervo-Fernández et al. (2004) obtiveram em suas pesquisas um máximo de atividade de transfrutoseilação para a biomassa úmida de *Aspergillus oryzae* 27H também na condição de pH 5,5 (900 U.g<sup>-1</sup>), com a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase apresentando estabilidade em uma faixa compreendida entre pH 5,0 e 6,5.

Valores próximos foram obtidos por Ganaie et al. (2014) para a biomassa de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364, apresentando uma faixa ótima de pH entre 5,0 e 7,0, com um máximo em pH 6,0 (40 U.mL<sup>-1</sup>). Após um processo de imobilização dessa biomassa em alginato de sódio,

a enzima apresentou um aumento da estabilidade em pH básico, sendo estável na faixa de pH compreendido entre 5,0 e 8,0 e passando a apresentar atividade de transfrutoseilação máxima em pH 7,0 (45 U.mL<sup>-1</sup>).

Em seus estudos, Ning et al. (2010) reportaram um máximo de atividade de transfrutoseilação para a  $\beta$ -frutofuranosidase presente na biomassa úmida de *Xanthophyllomyce dendrorhous* na condição de pH 7,0 (15 U.g<sup>-1</sup>), valor de pH este superior ao apresentado por outros micro-organismos produtores de  $\beta$ -frutofuranosidase, como o *Aureobasidium pullulans* e *Aspergillus niger*, que apresentaram pH ótimo de 5,0 e 5,5, respectivamente. Em uma revisão a respeito das características das enzimas produtoras de FOS, Ganaie, Lateef e Gupta (2014) trazem um levantamento do pH ótimo da FTase purificada oriunda de 7 distintos micro-organismos e para todos o pH de maior atividade de transfrutoseilação esteve entre 5,0 e 6,5.

Quanto a razão ( $A_T/A_H$ ), foi observado uma região entre pH 5,5 e 7,0 em que os valores se mostraram elevados, com um máximo de  $19,97 \pm 3,74$  em pH 6,5. Para pH 5,5, o valor obtido para a razão ( $A_T/A_H$ ) foi de  $19,33 \pm 2,68$ , valor este expressivamente maior que o reportado por Cuervo-Fernández et al. (2004), de 11,25, para a FTase micelial de *Aspergillus oryzae*. Nos estudos de Ning et al. (2010), a maior razão ( $A_T/A_H$ ) (5,27) para a biomassa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi obtida em meio reacional de pH 8,0. A razão ( $A_T/A_H$ ) obtida no presente trabalho ( $19,33 \pm 2,68$ ) é superior a todas as razões listadas por Cuervo-Fernández et al. (2007) em seus estudos a respeito de 16 linhagens distintas de *Aspergillus*, no qual foi apresentada como maior razão ( $A_T/A_H$ ) o valor de 13,72. Desta forma, os resultados obtidos mostram, novamente, que a imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 favorece o aumento da razão ( $A_T/A_H$ ) e conseqüentemente favorece a produção de FOS.

Com base nos resultados obtidos, o pH 5,5 do meio reacional foi selecionado para os estudos de estabilidade operacional por exibir a maior atividade de transfrutoseilação e apresentar razão elevada entre as atividades ( $A_T/A_H$ ).

#### 5.2.4 Efeito do pH na estabilidade das biomassas catalíticas livre e imobilizada

O efeito do pH na estabilidade das biomassas catalíticas livre e imobilizada foi avaliado para as atividades de transfrutoseilação utilizando uma faixa de pH compreendida 3,5 e 8,5, conforme método descrito no Tópico 4.4.4.

Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 13. Foi observado que ambos os biocatalisadores se mostraram estáveis (atividades relativas superiores a 80 %) para os valores

de pH de 4,5 a 7,5, apresentando uma pequena queda da atividade em pH 8,5. Na condição de pH 3,5, as biomassas livre e imobilizada apresentaram atividade de transfrutossilção nula, não sendo, portanto, estáveis nesta condição. Enzimas estáveis a uma ampla faixa de pH fornecem vantagens por reduzir custos com estocagem e ser viável para aplicação em processos industriais (XU et al., 2015).

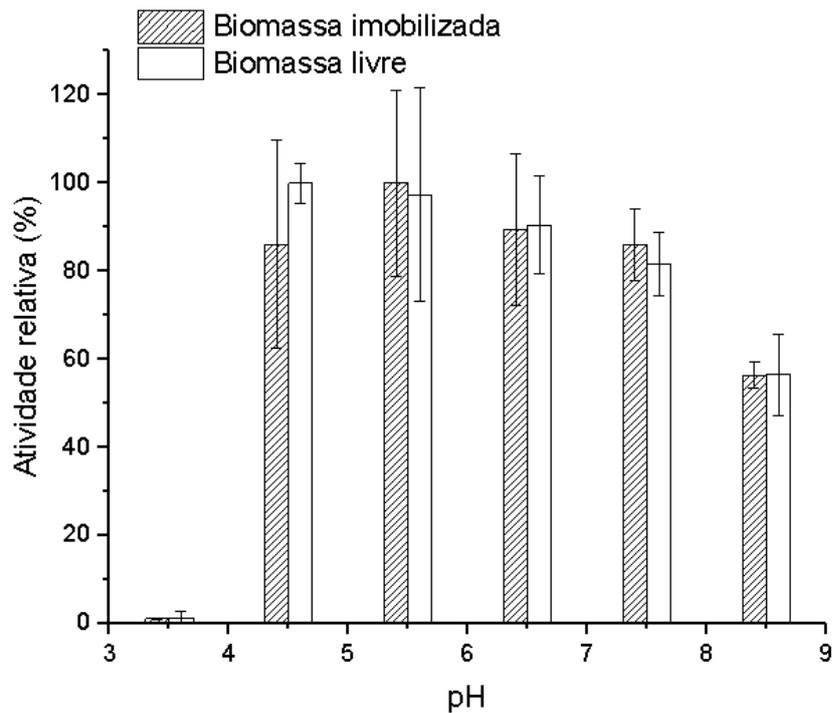


Figura 13- Estabilidade da FTase micelial presente nas biomassas catalíticas livre e imobilizada frente ao pH. Incubação por 24 horas em solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> a 4 °C.

Fonte: do autor.

Nos estudos de Cunha (2017), a FTase micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301, presente na biomassa livre, mostrou-se estável para faixa de pH de 6,0 a 8,0, com atividade residual superior a 80 % (atividade de transfrutossilção a 100 % de  $189 \pm 38$  U.g<sup>-1</sup>). Huang et al. (2016) reportaram a estabilidade da FTase micelial de *Aspergillus aculeatus* M105 para uma faixa ampla de pH (5,0 a 11,0), em que a atividade residual manteve-se acima de 80 %. Em uma revisão a respeito das características das enzimas produtoras de FOS, Ganaie, Lateef e Gupta (2014) descreveram a estabilidade de FTases miceliais de *Aspergillus niger* (AS0023), *Aspergillus oryzae* CFR 202 e *Aspergillus niger* para faixas de pH de 4,5 a 11,0, 5,0 a 7,0 e 5,5 a 6,5, respectivamente.

### 5.2.5 Efeito da concentração de substrato nas atividades das biomassas catalíticas livre e imobilizada e determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de substrato (75,5 a 604,1 g.L<sup>-1</sup>) nas atividades hidrolítica e de transfrutossilação foi avaliado conforme método descrito no tópico 4.4.5. Na Figura 14 pode-se observar os resultados obtidos para a biomassa livre. A atividade de transfrutossilação se mostrou sensível à mudança e concentração do substrato, apresentando uma faixa de maior atividade (acima de 600 U.g<sup>-1</sup>) entre as concentrações de 264,3 e 480,2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com uma pequena queda para a concentração 604 g.L<sup>-1</sup>. Valores relativamente baixos de atividade de transfrutossilação também foram obtidos para as concentrações de 75,5 e 151 g.L<sup>-1</sup> de substrato. Desta forma, pode-se diminuir a concentração de sacarose utilizada para até 377,5 g.L<sup>-1</sup> sem perdas de atividade de transfrutossilação.

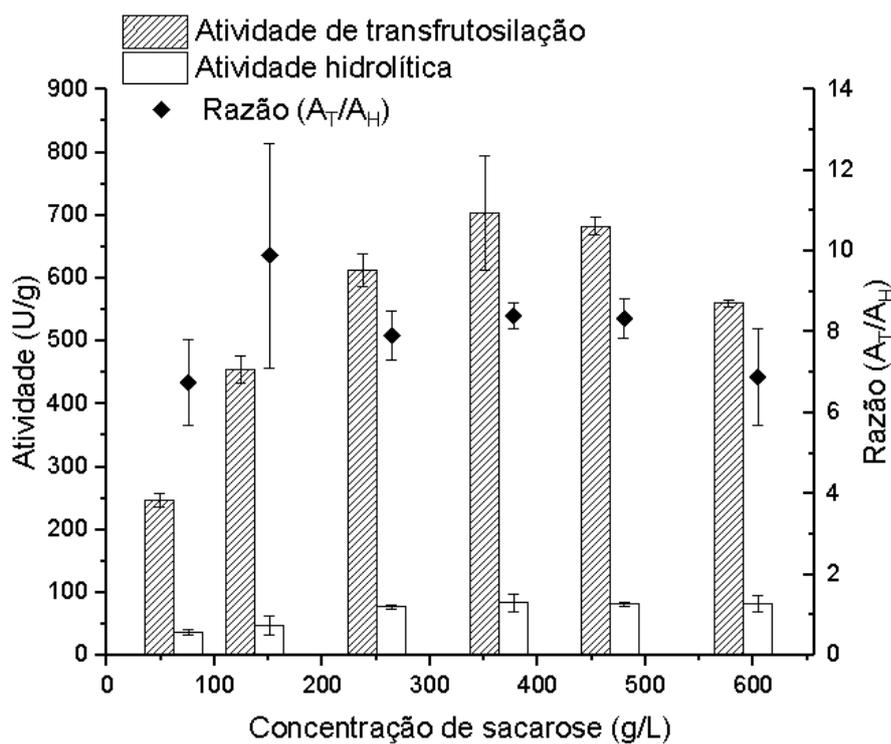


Figura 14- Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica, de transfrutossilação e na razão entre atividades ( $A_T/A_H$ ) da FTase micelial aderida a biomassa livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> pH 5,5 a 50 °C.

Fonte: do autor.

Com relação a atividade hidrolítica, foram obtidos menores valores para baixas concentrações de sacarose (75,5 e 151 g.L<sup>-1</sup>), com um mínimo de  $36,9 \pm 4,2$  U.g<sup>-1</sup> na concentração de 75,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e, para concentrações mais elevadas do substrato, foram obtidas as maiores atividades hidrolíticas, de aproximadamente 80 U.g<sup>-1</sup>.

A razão ( $A_T/A_H$ ) apresentou seu maior valor ( $9,9 \pm 2,8$ ) para a concentração de sacarose de 151 g.L<sup>-1</sup>. Entretanto, para esta concentração, a atividade de transfrutossilacção se mostrou inferior às atividades apresentadas em concentrações mais elevadas. Entre as faixas de concentração de substrato de 264,3 e 480,2 g.L<sup>-1</sup> foi obtida uma razão média de  $8,2 \pm 0,7$ .

A cinética enzimática da transfrutossilacção da biomassa catalítica livre foi avaliada de acordo com os modelos de Hill e de Michaelis-Menten por meio do software Origin® 2017. O ajuste ao modelo de Hill apresentou um coeficiente de determinação de erro ( $R^2$ ) de 0,940, indicando que o modelo explica 94,0 % das variações da velocidade de transfrutossilacção para a FTase micelial livre. O ajuste ao modelo de Michaelis-Menten apresentou um coeficiente de determinação de erro ( $R^2$ ) de 0,910 (Tabela 12) e, portanto, ajustou-se de modo menos satisfatório aos dados que o modelo de Hill. Ambos os ajustes estão representados na Figura 15.

Na Tabela 13 podem ser vistos os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill. O valor de 2,33 para o coeficiente de Hill ( $n$ ) indica uma cooperatividade positiva, ou seja, ocorre um aumento da afinidade dos demais sítios ativos da enzima com o substrato após a reação da primeira molécula de substrato com um sítio ativo.

Tabela 12 – Coeficiente de determinação de erros obtidos para diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial aderida à biomassa livre.

<b>Modelo</b>	<b>Coeficiente de Determinação (<math>R^2</math>)</b>
Hill	0,940
Michaelis-Menten	0,910

Fonte: do autor.

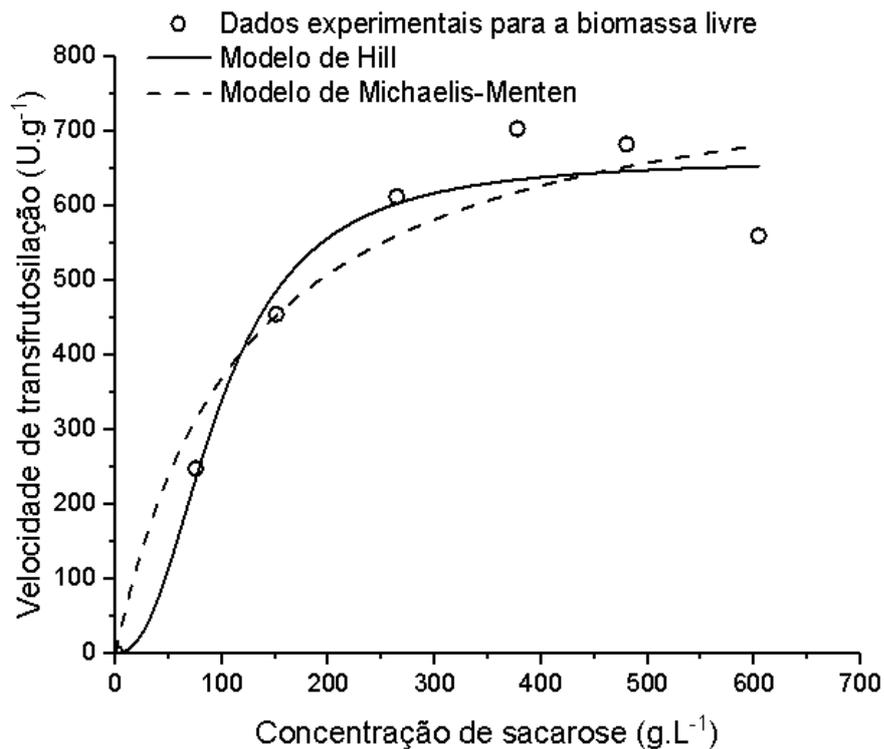


Figura 15- Comparação dos resultados experimentais e previstos pelos modelos cinéticos de Hill e Michaelis-Menten para a FTase micelial aderida à biomassa livre.

Fonte: do autor.

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para a FTase micelial aderida à biomassa livre

Parâmetros Cinéticos	Modelo de Hill	Modelo de Michaelis-Menten
$V_{\text{máx}}$ (U.g <sup>-1</sup> )	662,34	817,5
$K_{0,5}$ (g.L <sup>-1</sup> )	97,8	-
$K_m$ (g.L <sup>-1</sup> )	-	121,5
$n$	2,33	-

Fonte: do autor.

O efeito da concentração de substrato sobre as atividades da biomassa imobilizada também foi avaliado e os resultados estão apresentados na Figura 16. O comportamento da atividade de transfrutossilção foi similar ao apresentado pela biomassa livre, com uma região de maiores atividades (acima de 750 U/g) entre as concentrações de 264,3 e 480,2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. As menores atividades de transfrutossilção apresentadas foram para as menores concentrações de substrato avaliadas, sendo de 392,03 U.g<sup>-1</sup> e 544,6 U.g<sup>-1</sup> para as concentrações de 75,5 e 151,0 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

O comportamento exibido pela atividade hidrolítica da biomassa imobilizada foi diferente do apresentado pela biomassa livre. Assim como observado por Zeng et al. (2016), a atividade hidrolítica aumentou com a diminuição da concentração de substrato, sofrendo uma grande redução com o aumento da concentração de substrato. Para baixas concentrações, atividades hidrolíticas foram altas, com um máximo de  $174,4 \text{ U.g}^{-1}$  para a concentração de  $151,0 \text{ g.L}^{-1}$ . Com o aumento da concentração, este valor foi reduzido, apresentando um mínimo de  $56,7 \text{ U.g}^{-1}$  na concentração de  $480,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Nesta concentração consequentemente foi obtida a maior razão ( $A_T/A_H$ ), de  $15,1 \pm 3,3$ .

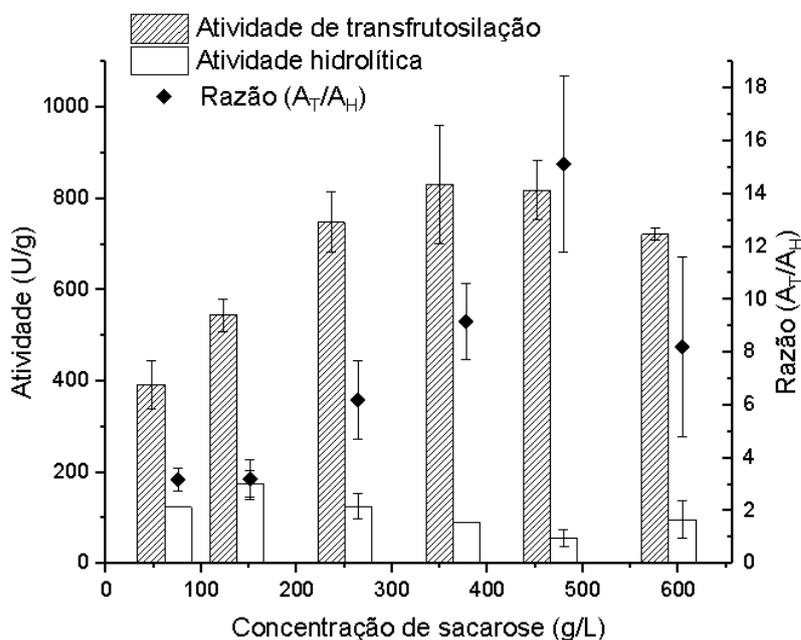


Figura 16- Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica, de transfrutossilção e na razão entre atividades ( $A_T/A_H$ ) da FTase micelial aderida a biomassa imobilizada. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 5,5 a  $50^\circ\text{C}$ .

Fonte: do autor.

A cinética enzimática da FTase micelial aderida à biomassa imobilizada também foi avaliada de acordo com o modelo de Hill, o qual apresentou um coeficiente de determinação de erro ( $R^2$ ) de 0,957, indicando que o modelo explica 95,7 % das variações da velocidade de transfrutossilção para a FTase micelial livre. O modelo cinético de Michaelis-Menten também foi ajustado aos dados experimentais, sendo obtido também um alto valor de coeficiente de determinação de erro ( $R^2$  de 0,954) (Tabela 14). Ambos os ajustes estão representados na Figura

17. De acordo com Ghazi et al. (2007), é comum o modelo de Hill apresentar um bom ajuste aos dados quando se trabalha com enzimas que transferem grupos frutossil. Uma vez que o modelo de Hill é adequado quando há um efeito causado pela primeira ligação entre sítio catalítico e a enzima sobre os demais sítios catalíticos e tal fato ocorre mais comumente em enzimas que apresentam mais de um sítio catalítico e múltiplas subunidades (WEISS, 1997), o ajuste do modelo de Hill ao comportamento da FTase já poderia ser esperado uma vez que, segundo alguns autores, a FTase é mais comumente encontrada na forma dimérica (AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2011; LÜSCHER et al., 1996). Os parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Hill e para o modelo de Michaelis-Menten podem ser vistos na Tabela 15.

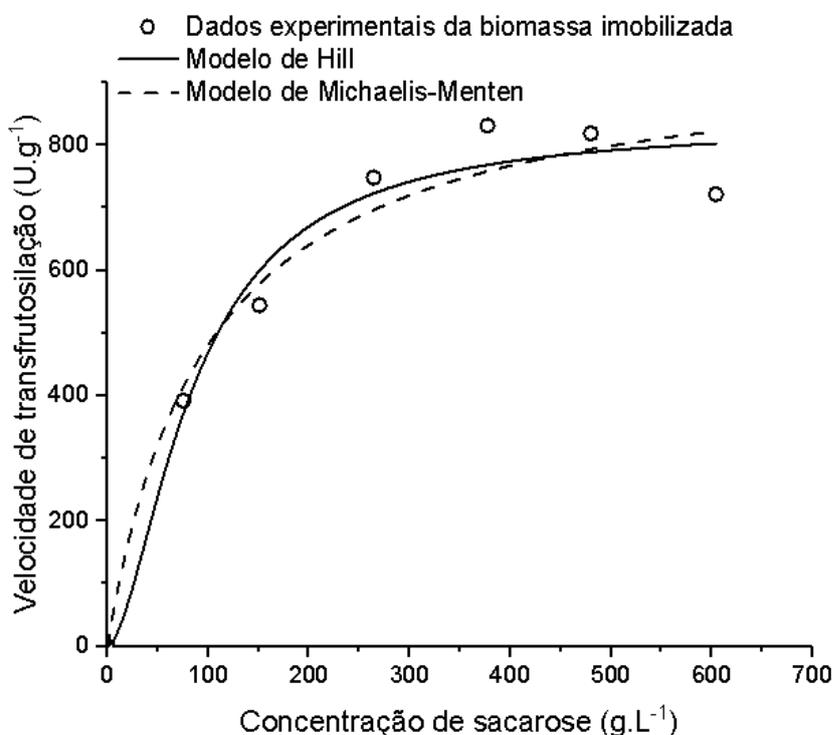


Figura 17 – Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo cinético de Hill e Michaelis-Menten para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada.

Fonte: do autor.

Tabela 14 – Coeficiente de determinação de erros obtidos para diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada

Modelo	Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )
Hill	0,957
Michaelis-Menten	0,954

Fonte: do autor.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos para a FTase micelial aderida à biomassa imobilizada

<b>Parâmetros Cinéticos</b>	<b>Modelo de Hill</b>	<b>Modelo de Michaelis-Menten</b>
$V_{\text{máx}}$ (U.g <sup>-1</sup> )	833,08	956,06
$K_{0,5}$ (g.L <sup>-1</sup> )	85,9	-
$K_m$ (g.L <sup>-1</sup> )	-	98,5
$n$	1,67	-

Fonte: do autor.

Assim como o ocorrido para a FTase presente na biomassa livre, o coeficiente de Hill obtido para a FTase presente na biomassa imobilizada (1,67) foi positivo e indica, portanto, um comportamento cooperativo positivo, ou seja, a primeira molécula de sacarose que reage com a enzima causa um aumento da afinidade entre o resto dos sítios ativos e o substrato. O fato do coeficiente de Hill ser maior para a FTase aderida à biomassa livre do que para a imobilizada, indica que a cooperatividade na biomassa imobilizada é menor. Portanto são menores os erros de um modelo que desconsidera essa cooperatividade, o que justifica o melhor ajuste obtido pelo modelo cinético de Michaelis-Menten para a FTase aderida à biomassa imobilizada (0,954) do que para a biomassa livre (0,910).

Ao se comparar os resultados obtidos, pode-se observar que o valor de  $K_{0,5}$  obtido para a biomassa livre (97,8 g.L<sup>-1</sup>) foi superior ao obtido para a biomassa imobilizada (85,9 g.L<sup>-1</sup>), indicando que houve um aumento da afinidade com o substrato com o processo de reticulação com glutaraldeído. Ao se comparar as constantes de Michaelis-Menten obtidas, pode-se observar que o  $K_m$  obtido para a biomassa livre (121,5 g.L<sup>-1</sup>) é superior ao encontrado para a biomassa imobilizada (98,5 g.L<sup>-1</sup>), o que também indica um aumento da afinidade com o substrato obtido após o processo de imobilização (SHULER; KARGI, 2002). Este aumento de afinidade com a sacarose pode explicar as mudanças de atividade encontradas após o processo de reticulação. O aumento da atividade de transfrutossilagem e redução da atividade hidrolítica (e conseqüentemente aumento da razão  $A_T/A_H$ ) pode ser provocado pelo aumento da afinidade entre a FTase micelial e a sacarose. Assim, há um aumento da transferência de grupos frutossil para a molécula de sacarose como aceptora (atividade de transfrutossilagem) e redução da transferência de grupos frutossil para o meio aquoso (atividade hidrolítica). Em termos de processo, este aumento da afinidade entre substrato e enzima obtido com a imobilização da biomassa aumenta o rendimento possível do processo e torna mais vantajoso o uso da enzima

na produção de FOS. Este fato é corroborado pelas maiores velocidades máximas de produção de FOS obtida para a biomassa imobilizada em ambos os ajustes ( $833,08 \text{ U.g}^{-1}$  e  $956,06 \text{ U.g}^{-1}$ ) em comparação com a biomassa livre ( $662,34 \text{ U.g}^{-1}$  e  $817,5 \text{ U.g}^{-1}$ ) (GHAZI et al., 2007; HUANG et al., 2016; SOUZA et al., 2015).

### 5.3 Estudos de estabilidade operacional

#### 5.3.1 Avaliação da estabilidade operacional das biomassas catalíticas livre e imobilizada visando a produção de FOS

A avaliação da estabilidade operacional das biomassas catalíticas livre e imobilizada foi realizada conforme método descrito no tópico 4.5, durante 12 ciclos consecutivos (modo batelada). As condições reacionais foram estabelecidas para aplicação dos biocatalisadores de acordo com os resultados de caracterização descritos no Tópico 5.2. Os resultados obtidos para a atividade relativa de transfrutossilação em função do número de ciclos avaliados estão disponíveis na Figura 18.

Foi possível observar que os perfis de atividade de transfrutossilação para as biomassas livre e imobilizada apresentaram comportamentos distintos. Ao decorrer de 12 ciclos, verificou-se que a biomassa imobilizada perdeu pouca atividade atingindo, ao término de 12 ciclos, atividade relativa de  $88,9 \pm 2,2 \%$ . Por outro lado, a biomassa livre sofreu uma queda acentuada de atividade alcançando, ao final dos ciclos avaliados, atividade relativa de  $50,3 \pm 3,9 \%$ . Resultados similares foram obtidos por Sun et al. (2010a), que obtiveram um grande aumento da estabilidade operacional após a reticulação de *Rhizopus oryzae* com glutaraldeído, de forma que o micro-organismo, que antes apresentava apenas 10 % da atividade inicial após 10 ciclos, passou a apresentar alta atividade na metanólise para produção de biodiesel por até 15 ciclos de produção sem considerável queda de atividade.

Os resultados indicam que um dos principais objetivos de um processo de imobilização foi atingido de maneira satisfatória, pois a estratégia adotada de imobilização proporcionou a manutenção da atividade enzimática e o aumento da estabilidade operacional do biocatalisador (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 2012). O uso da biomassa imobilizada por reticulação com glutaraldeído aumentou o potencial de reuso da biomassa catalítica, o que de acordo com Ganaie et al. (2014) é fator chave na redução de custos no uso industrial de um biocatalisador na produção de FOS por diminuir a necessidade de produção de biomassa. De acordo com Komesu et al. (2009), a obtenção de um biocatalisador estável que possa ser utilizado em

bateladas sequenciais sem grande perda de eficiência catalítica pode viabilizar, a um custo mais acessível, seu uso em bioprocessos industriais. Com a reticulação possivelmente ocorreu a formação de ligações entre o aldeído e grupos amino da proteína e da biomassa celular que provocaram um aumento da interação entre enzima e biomassa e são associadas ao aumento da estabilidade enzimática (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 2012; MONSAN, 1978). De acordo com Long et al. (1996) e Sun et al. (2010a), o aumento da estabilidade operacional da biomassa catalítica após o processo de reticulação com glutaraldeído pode ser associado à redução da perda de enzimas durante o processo de lavagem da biomassa após cada ciclo, oriunda de uma maior resistência à extração da enzima por água que também é proporcionada pelas novas ligações impostas pela reticulação.

Desta forma, com os resultados obtidos fica evidenciado o ganho de aplicabilidade do biocatalisador na produção de FOS com o processo de imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por reticulação com glutaraldeído adotado neste trabalho.

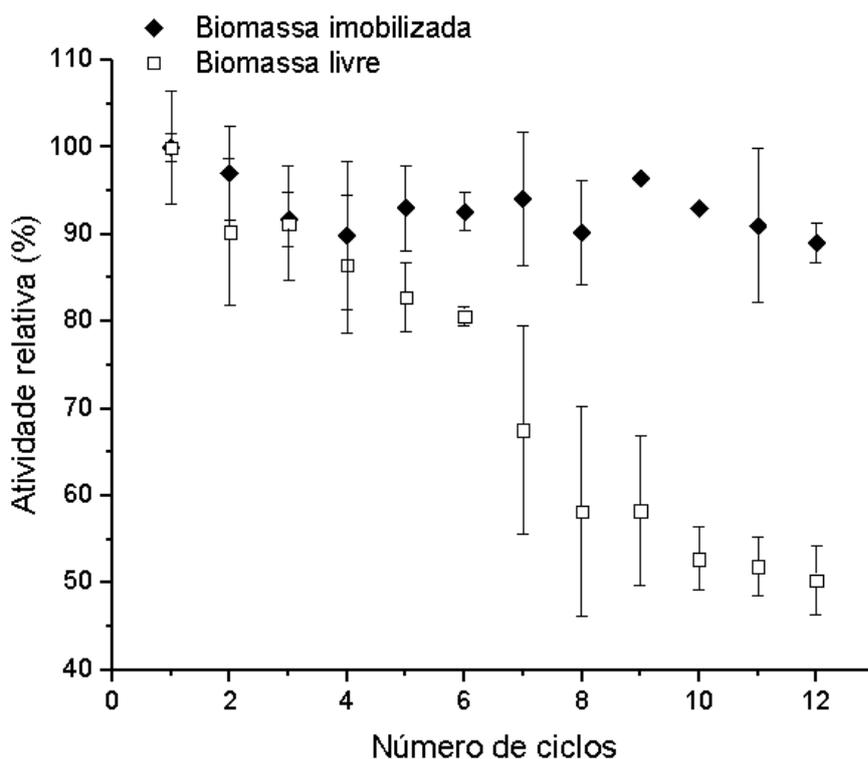


Figura 18- Avaliação da estabilidade operacional das biomassas livre e imobilizada ao decorrer de 12 ciclos batelada, totalizando 12 horas de reação de transfrutossilacção. Meio reacional constituído por 3,7 mL de solução de sacarose 63,6 % (m/v) e 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> pH 5,5, a 50 °C.

Fonte: do autor.

## 6 CONCLUSÕES

A biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT 301, rica em FTase micelial, foi produzida por fermentação submersa aeróbia em meio de cultura sintético.

Por meio da otimização das condições de imobilização, ficou evidenciado que o uso de 2,1 % (v/v) de glutaraldeído em pH 7,9 na reação de imobilização da biomassa resultou nas melhores respostas para a imobilização, proporcionando com a biomassa imobilizada um ganho de 14 % na atividade de transfrutossilação, redução de 40 % na atividade hidrolítica e aumento em 86 % da razão ( $A_T/A_H$ ) quando comparada com a biomassa livre (sem imobilização). Assim, estas condições reacionais na imobilização foram definidas para continuidade do trabalho nas etapas de caracterização da biomassa imobilizada.

Na avaliação da influência da temperatura nas atividades enzimáticas, a biomassa livre apresentou maiores razões ( $A_T/A_H$ ) com alta atividade de transfrutossilação entre as temperaturas de 45 e 55 °C, enquanto a biomassa imobilizada apresentou, entre as temperaturas de 50 e 55 °C, as melhores respostas de atividade de transfrutossilação e razão ( $A_T/A_H$ ), sendo assim definida a temperatura de 50 °C como a melhor condição reacional para se comparar ambos os biocatalisadores nos ensaios de estabilidade operacional.

A análise da estabilidade térmica dos biocatalisadores mostrou por meio dos parâmetros termodinâmicos obtidos que a imobilização micelial proporcionou um aumento na energia necessária para a inativação térmica da FTase, aumentando sua termoestabilidade. Assim, em todas as temperaturas avaliadas foi obtido um aumento no tempo de meia vida enzimática pós imobilização, conseqüentemente foi observado um Fator de estabilidade positivo, com a enzima passando a ser 2,8 vezes mais estável a 50 °C após o processo de imobilização da biomassa.

Quando avaliada a influência do pH nas atividades enzimáticas, a biomassa livre apresentou maiores razões ( $A_T/A_H$ ) na faixa de pH entre 5,5 e 7,5, enquanto as maiores atividades de transfrutossilação foram obtidas entre o pH 4,5 e 6,0. Os melhores resultados para a biomassa imobilizada foram obtidos entre o pH 5,5 e 7,0, com a maior razão ( $A_T/A_H$ ) e atividade de transfrutossilação em pH 5,5. Desta forma, o pH de 5,5 foi definido como a melhor condição reacional para se comparar ambos os biocatalisadores nos ensaios de estabilidade operacional.

Os biocatalisadores livre e imobilizado se mostraram estáveis (atividade relativa superior a 80 %) entre o pH 4,5 a 7,5. Os ensaios de avaliação do efeito da concentração de substrato no meio reacional enzimático mostraram que ambos os biocatalisadores se ajustaram satisfatoriamente ao modelo cinético de Hill e ambos apresentam uma cooperatividade positiva

entre enzima e sítios catalíticos. Com a determinação dos parâmetros cinéticos, foi possível observar um aumento da afinidade com o substrato quando avaliado o modelo de Hill, com o  $K_{0,5}$  diminuindo de  $97,8 \text{ g.L}^{-1}$  para  $85,9 \text{ g.L}^{-1}$  após a imobilização da biomassa, sendo também observado um aumento no valor de  $V_{\text{máx}}$  com a imobilização, de inicialmente  $662,34 \text{ U.g}^{-1}$  para  $833,08 \text{ U.g}^{-1}$ . A avaliação por meio da cinética de Michaelis-Menten também apontou um aumento da afinidade entre enzima e substrato, com o  $K_m$  diminuindo de  $121,5$  para  $98,5 \text{ g.L}^{-1}$  e a velocidade máxima de produção de FOS aumentando com a imobilização da biomassa, passando de  $817,5$  para  $956,06 \text{ U.g}^{-1}$ .

Por fim, a aplicação dos biocatalisadores nos ensaios de estabilidade operacional mostrou que ocorreu um aumento da estabilidade da biomassa com a imobilização, com esta apresentando  $88,9 \pm 2,2 \%$  da atividade relativa após 12 ciclos de produção de FOS. Já a biomassa livre apresentou apenas  $50,3 \pm 3,9 \%$  da atividade inicial após 12 ciclos de produção de FOS, ficando evidenciado o ganho de aplicabilidade da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 na produção de FOS com o processo de imobilização da biomassa catalítica por reticulação com glutaraldeído.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões obtidas, propõem-se algumas sugestões para a continuidade deste trabalho. São elas:

- a) Avaliar a influência dos parâmetros (i) tempo de reação, (ii) temperatura e (iii) agitação nos estudos de imobilização da biomassa microbiana por reticulação.
- b) Caracterizar, por técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), possíveis modificações da biomassa microbiana após processo de imobilização por reticulação com glutaraldeído;
- c) Aplicar outras técnicas de imobilização da biomassa microbiana reticulada, como estudos de encapsulamento em alginato visando a produção contínua de FOS.
- d) Implementar o uso da biomassa microbiana imobilizada (reticulada com glutaraldeído e encapsulada em alginato) em reator de leito fixo.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E. et al. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 363–372, 2011.
- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 3, 2010.
- ALMEIDA, A. C. S. DE et al. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 54–62, 2005.
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1654–1662, 2010.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. **Immunochemistry**, v. 6, p. 43–52, 1969.
- BARBOSA, G. N. DE O. **Produção de frutossiltransferase por *Rhodotorula* sp.** 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- BRENDA. **Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig**. 2018. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9>>. Acesso em: 22 fev. 2018.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.36, p.48-57, 2006.
- CASTRO, C. C. et al. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82–90, 2017.
- CATANA, R. et al. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 260–266, 2006.
- CHIEN, C. S.; LEE, W. C.; LIN, T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4–5, p. 252–257, 2001.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of enzyme kinetics**. London: Portland Press, 1995.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143, 2007.

CRUZ, J. et al. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 7–14, 2012.

CUERVO-FERNÁNDEZ, R. et al. Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 268–272, 1 mar. 2004.

CUERVO-FERNÁNDEZ, R. et al. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 87–93, 2007.

CUNHA, J. DE S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de frutooligossacarídeos**. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012.

FERREIRA, M. M. **Avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, visando seu emprego na produção de ácidos graxos concentrados**. 2017. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 129, n. 2–3, p. 417–431, 2001.

FLORES-MALTOS, D. A. et al. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 259–267, 2016.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligossacarídeos e inulina no organismo humano : estudo baseado em evidências. **Ciência Saúde**, v. 20, n. 3, p. 241–252, 2010.

GANAIE, M. A. et al. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 840–844, 2014.

GANAIE, M. A.; GUPTA, U. S. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides.

**Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 253–258, 2014.

GANAI, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2143–2159, 2014.

GHAZI, I. et al. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, n. 1–3, p. 19–27, 2005.

GHAZI, I. et al. Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2964–2968, 2006.

GHAZI, I. et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 1, p. 204–211, 2007.

GUISAN, J. M.; BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HIDAKA, H. et al. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 5, n. 1, p. 37–50, 1986.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 2061 1. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, n. 5, p. 1181–1187, 1988.

HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing beta-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 667–673, 1989.

HOU, H.; DI VONA, M. L.; KNAUTH, P. Building bridges: crosslinking of sulfonated aromatic polymers-A review. **Journal of Membrane Science**, v. 423–424, p. 113–127, 2012.

HUANG, M. P. et al. Highly Efficient Synthesis of Fructooligosaccharides by Extracellular Fructooligosaccharide-Producing Enzymes and Immobilized Cells of *Aspergillus aculeatus* M105 and Purification and Biochemical Characterization of a Fructosyltransferase from the Fungus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 33, p. 6425–6432, 2016.

JAY, J.; LOESSNER, M.; GOLDEN, D. **Modern food microbiology**. 7. ed. Las Vegas: Springer, 2005.

KAMIMURA, E. S. et al. Immobilization of fructosyltransferase from *Pichia pastoris* in blend of alginate and gelatin. **New Biotechnology**, v. 25, p. 149, 2009.

KOMESU, A. et al. Preparação de derivados de xilanase por imobilização em agarose e

quitosana derivatizadas. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 7, 2009, Uberlândia, **Anais...** Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2009. p. 1–6.

KRASŇAN, V. et al. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2535–2553, 2016.

KUMAR, D. et al. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51–61, 2013.

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by beta-fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 1–2, p. 236–239, 1996.

L'HOCINE, L. et al. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 73–84, 2000.

LONG, K. et al. In situ crosslinking of *Aspergillus flavus* lipase: improvement of activity, stability and properties. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1169–1174, 1996.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005a.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 7, p. 750–756, 2005b.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70–75, 2005c.

LÜSCHER, M. et al. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. **FEBS Letters**, v. 385, n. 1–2, p. 39–42, 1996.

MARESMA, B. G. et al. Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* IPT-301 to improve the production of  $\beta$ -fructofuranosidase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 186–195, 2010.

MATTIASSON, B.; HAHN-HAGERDAL, B. Microenvironmental Effects on Metabolic Behaviour of Immobilized Cells A Hypothesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 52–55, 1982.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

- MIGNEAULT, I. et al. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1367–1378, 2004a.
- MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004b.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p. 371–384, 1978.
- MUSSATTO, S. I. et al. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 6, p. 795–800, 2009.
- NING, Y. et al. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7472–7478, 2010.
- NOBRE, C. et al. Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 58–64, 2018.
- OLIVEIRA, A. E. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula Sp* . e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- OTTONI, C. A. et al. Media Optimization for  $\beta$ -Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49–59, 2012.
- PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385–390, 2003.
- PLATKOVÁ, Z. et al. Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 6, p. 469–472, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: AMIC, 2009.
- RUEDA, N. et al. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: a mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016.
- SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeos por inulinases de *Kluyveromyces bulgaricus***. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- SAQIB, A. A. N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus*

grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SCHÜRMANN, J. et al. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8031–8046, 2014.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, Inc., 2002.

SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2008.

SOCOL, C. R.; FRANÇA, L. R.; RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2016.

SOUZA, P. M. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

SUN, T. et al. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1192–1195, 2010a.

SUN, T. et al. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 514–518, 2010b.

SZCZESNA-ANTCZAK, M. et al. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, n. 1–6, p. 163–171, 2004.

TROLLER, J. A.; STINSON, J. V. Moisture Requirements for Growth and Metabolite Production by Lactic Acid Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 42, n. 4, p. 682–687, 1981.

VAŇKOVÁ, K. et al. Design and economics of industrial production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 375–381, 2008.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico. **Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa**, p. 1–59, 2013.

VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M. E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10180–10186, 2011.

VESCOVI, V. et al. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-

attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055–2066, 2016.

WANG, T. Synthesis of Neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v. 5, p. 1–6, 2015.

WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 2, p. 835–841, 1997.

WHENDHAUSEN JUNIOR, R. **Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções**. 1998. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927–938, 2008.

XU, Q. et al. Purification and biochemical characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1237–1246, 2015.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 107–117, 1996.

YUN, J. W.; SONG, S. K. Continuous production of fructooligosaccharides using fructofuranosidase immobilized on ion exchange resin. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, v. 1, p. 18–21, 1996.

ZENG, X. A. et al. Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as catalyst for bio-transformation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 1072–1079, 2016.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A - Curvas analíticas

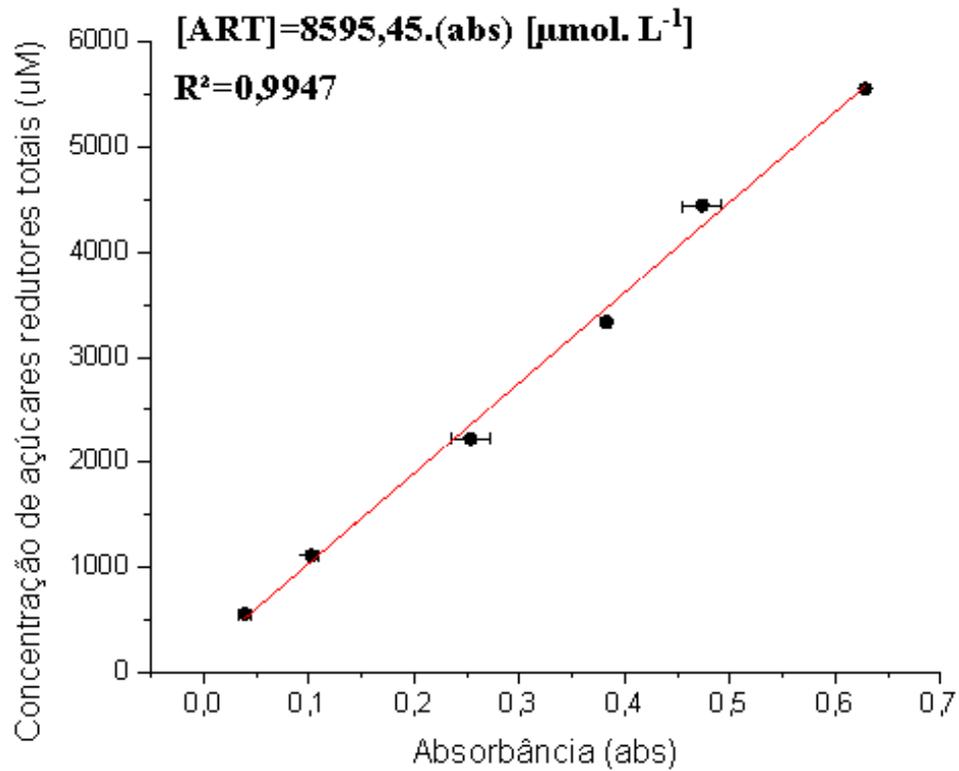


Figura 19 – Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais (ART).

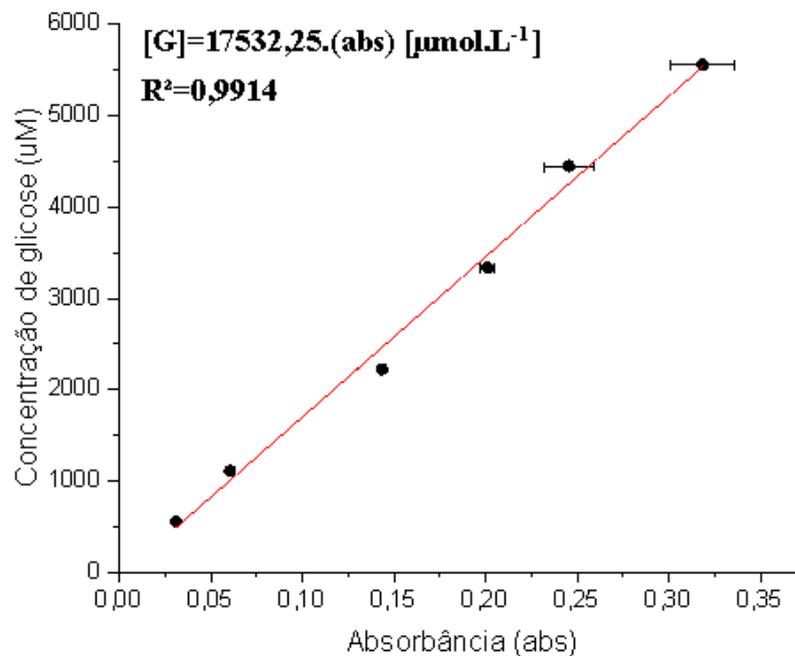


Figura 20 – Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G).