

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LARISSA LEMOS FARIA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM SÍLICA-GEL PARA PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2019

LARISSA LEMOS FARIA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DE
Aspergillus oryzae IPT-301 EM SÍLICA-GEL PARA PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Poços de Caldas / MG

2019

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

F224i Faria, Larissa Lemos.

Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de
Aspergillus oryzae IPT-301 em sílica-gel para produção de
frutooligossacarídeos / Larissa Lemos Faria. – Poços de Caldas/MG,
2019.

88 f. –

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.

Bibliografia.

1. Cinética de enzimas. 2. Enzimas imobilizadas. 3. *Aspergillus
oryzae*. 4. Sílica-gel. I. Perna, Rafael Firmani. II. Título.

CDD – 660

LARISSA LEMOS FARIA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE
EXTRACELULAR DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 EM SÍLICA-GEL
PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

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

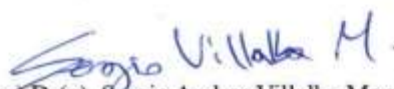
Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 08 de março de 2019.



Prof(a.) Dr(a). Rafael Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Sergio Andres Villalba Morales

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Cristiane Angélica Ottoni

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP/Campus Litoral Paulista – Unidade São Vicente)

*Dedico a Deus,
Ao meu sobrinho afilhado Davi
A minha família e a todos que participaram dessa conquista.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir realizar esse trabalho, por ser meu sustento e minha força nos momentos difíceis, por me abençoar e por iluminar toda a minha jornada no mestrado.

Aos meus pais, irmãos, familiares e amigos que sempre me apoiaram, me motivaram e acreditaram em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, por todo o ensinamento, confiança, incentivo e apoio.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano, pelo acompanhamento e pelas dicas valiosas.

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa, por sempre tornarem meus dias mais alegres e leves durante esses dois anos.

Ao José Pedro Zanetti Prado, por ter colaborado para a realização desse trabalho.

Aos mestres: Josivan de Sousa Cunha, Rogério Lopes Garcia e Marcela Fernandes de Oliveira, pelos ensinamentos sobre a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Morales, que desde o começo participou e colaborou para esse estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pelos conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos e funcionários da UNIFAL-MG que sempre estiveram dispostos a colaborar para o andamento da pesquisa.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), por me acolher ao programa NOVOS TALENTOS, pelo suporte e pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio e apoio financeiro.

Sou grata a oportunidade e a todos que participaram dessa caminhada!

“O que não te desafia não te muda”

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos de baixa caloria que apresentam diversos benefícios à saúde humana. Há um grande interesse na aplicação de FOS como substitutos dos edulcorantes convencionais, o que torna necessário o desenvolvimento de processos, em escala industrial, de produção destes componentes, desenvolvidos no Brasil. Estes açúcares podem ser produzidos pela reação de transfrutossilacção da sacarose, catalisada por enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase E.C.2.4.1.9), de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de imobilização da enzima FTase microbiana extracelular, utilizando sílica-gel como suporte, para produção de FOS. Para tanto, foram realizados testes de imobilização, por adsorção física, em diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C), durante 6 horas, com agitação de 175 rpm, 10 mL de caldo fermentado pH 5,5, contendo a enzima microbiana extracelular, e 1,0 g de sílica-gel. Após obter os perfis cinéticos de adsorção, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² variando a temperatura e pH do meio reacional, com o intuito de definir as condições ótimas de reação para a enzima imobilizada. Em acréscimo, para a caracterização do biocatalisador imobilizado, foram realizados ensaios de estabilidade frente ao pH, estabilidade térmica, avaliação da influência da concentração de substrato na reação enzimática e ensaios de estabilidade operacional. Os perfis cinéticos de imobilização indicaram que a atividade de transfrutossilacção (A_t), presente no caldo fermentado, decresceu com o aumento do tempo de imobilização e que, o maior rendimento de imobilização, cerca de 85 %, foi obtido para uma temperatura de 35 °C. A partir do planejamento experimental, foi possível definir as condições ótimas de reação para a enzima imobilizada obtendo-se valores de pH e temperatura iguais a 5,5 e 50 °C, respectivamente. A avaliação da concentração de substrato indicou que as melhores condições para a reação enzimática foram alcançadas para concentrações de sacarose compreendidas entre 400 a 600 g.L⁻¹ e a cinética enzimática foi melhor ajustada ao modelo cooperativo de Hill. Além disso, os ensaios de estabilidade ao pH mostraram que a enzima imobilizada foi estável (A_t relativa próximo a 100 %) na faixa de pH entre 5,0 e 6,5 e, a análise de estabilidade térmica mostrou, por meio dos parâmetros termodinâmicos avaliados, que a imobilização proporcionou um aumento na energia necessária para a desativação enzimática, aumentando sua termoestabilidade, de modo a aumentar o tempo de meia vida da enzima FTase imobilizada em 2,5 vezes, para a temperatura de 30°C, em relação ao biocatalisador na sua forma livre. Dos ensaios de estabilidade operacional, constatou-se que a enzima pode ser reutilizada por 2 ciclos batelada consecutivos sem perdas de atividade. Ao caracterizar o suporte sílica-gel foi possível comprovar a adsorção da enzima em sua superfície. Portanto, a partir dos estudos de imobilização e caracterização foi possível concluir que a FTase extracelular foi satisfatoriamente imobilizada em sílica-gel.

Palavras-chave: Frutossiltransferase. Imobilização. Sílica-gel. Caracterização Enzimática.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are low-calorie prebiotic sugars that present several benefits for human health. There is a growing interest in the application of FOS as substitute for conventional sweeteners, which makes it necessary to develop processes, in industrial-scale, for the production of these components, developed in Brazil. They are produced by transfructosylation reaction of sucrose, catalyzed by microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase E.C.2.4.1.9), from *Aspergillus oryzae* IPT-301. Thus, the present work focused on the studies of the immobilization process of the enzyme extracellular microbial FTase, using silica gel as support, for the production of FOS. For this purpose, immobilization tests were performed, by physical adsorption, at different temperatures (20 ° C, 25 ° C, 30 ° C and 35 ° C) for 6 hours, with agitation of 175 rpm, 10 mL fermented broth pH 5.5, containing the extracellular microbial enzyme, and 1.0 g of silica gel. After obtaining the adsorption kinetic profiles, a central composite design (CCD) 2^2 was performed, varying the temperature and pH of the reaction medium, in order to define the optimal reaction conditions for the immobilized enzyme. Besides these studies, to characterize the immobilized biocatalyst, tests were carried out for stability to pH, thermal stability, evaluation of the influence of substrate concentration on the enzymatic reaction and operational stability tests. The kinetic immobilization profiles indicated that the transfructosylation activity (A_T), present in the fermented broth, decreased with the increase of the immobilization time and that the highest immobilization yield, about 85% was obtained for an immobilization temperature of 35 °C. From the experimental design, it was possible to define the optimal reaction conditions for the immobilized enzyme, obtaining pH and temperature values of 5.5 and 50°C, respectively. The evaluation of the substrate concentration indicated that the best conditions for the enzymatic reaction were reached for sucrose concentrations between 400 and 600 g.L⁻¹ and enzymatic kinetics were better fitted to the cooper Hill model. In addition, pH stability assays showed that the immobilized enzyme was stable (A_t relative to about 100%) in the pH range of 5.0 to 6.5 and the thermal stability analysis showed, by means of the thermodynamic parameters evaluated, that immobilization provided an increase in energy required for enzymatic deactivation, increasing its thermostability, so as to increase the half-life of the FTase enzyme immobilized at 2.5 times relative to the biocatalyst in its free form. From the operational stability tests, it was verified that the enzyme can be reused for 2 consecutive batch cycles without loss of activity. By characterizing the silica gel support, it was possible to prove the adsorption of the enzyme on its surface. Therefore, from the immobilization and characterization studies it was possible to conclude that extracellular FTase was satisfactorily immobilized on silica gel.

Keywords: Fructosyltransferase. Immobilization. Silica gel. Enzymatic characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas da sacarose e dos principais frutanos: (A) sacarose, (B) kestose, (C) nistose, (D) frutofuranosilnistose, (E) 6-kestose, (F) 6,6-nistose, (G) neokestose, (H) neonistose e (I) neofrutofuranosilnistose.	17
Figura 2 - Esquema da reação de transfrutossilacão.	23
Figura 3 - Esquema da reação de hidrólise de sacarose ou FOS.	24
Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas.	33
Figura 5 - Estrutura da sílica e os grupamentos presentes.	37
Figura 6 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em sílica-gel comercial em função do tempo: monitoramento da atividade de transfrutossilacão no sobrenadante.	46
Figura 7 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em sílica-gel comercial em função do tempo: monitoramento da atividade hidrolítica no sobrenadante.	48
Figura 8 - Diagrama de Pareto para as variáveis pH e temperatura na atividade de transfrutossilacão da FTase imobilizada.	51
Figura 9 - Atividade de transfrutossilacão em função da temperatura e do pH: (A) superfície de resposta e (B) curvas de contorno.	53
Figura 10 - Diagrama de Pareto para as variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da FTase extracelular imobilizada.	54
Figura 11 - Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutossilacão, hidrolítica e na razão entre atividades (A_t/A_n) da FTase extracelular imobilizada.	58
Figura 12 – Modelo de Hill para a FTase extracelular imobilizada.	59
Figura 13 - Estabilidade da FTase extracelular livre e imobilizada frente ao pH.	61
Figura 14 - Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutossilacão relativa da FTase extracelular livre.	62
Figura 15 - Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutossilacão relativa da FTase extracelular imobilizada.	63
Figura 16 - Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desativação (E_D) da FTase extracelular livre.	63
Figura 17 - Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desativação (E_D) da FTase extracelular imobilizada.	64

Figura 18 - Avaliação da estabilidade operacional da FTase imobilizada em 6 ciclos batelada.	67
Figura 19 - Difratoograma da sílica-gel pura.	69
Figura 20 - Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras de sílica-gel pura e sílica-gel com enzima.....	69
Figura 21 - Micrografia da sílica sem enzima.	71
Figura 22 - Micrografia da sílica com enzima.	73
Figura 23 - Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais (ART).....	88
Figura 24 - Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas estabelecida pela IUB.	21
Tabela 2 - Matriz de experimentos para execução do planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional 2 ² (DCCR).	43
Tabela 3 - Rendimentos de imobilização.	47
Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental e respostas.....	50
Tabela 5 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na atividade de transfrutoseilação da FTase extracelular imobilizada.	51
Tabela 6 - Análise de variância para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH na atividade de transfrutoseilação da FTase extracelular imobilizada.	52
Tabela 7 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na atividade hidrolítica da FTase extracelular imobilizada.	54
Tabela 8 - Análise de variância para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH na atividade hirolítica da FTase extracelular imobilizada.	55
Tabela 9 – Razão entre as atividades enzimáticas antes e depois da imobilização.	56
Tabela 10 – Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular imobilizada.....	60
Tabela 11 - Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular livre e imobilizada, incubada em diferentes temperaturas.	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 FOS: DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS	17
3.2 ENZIMAS E FTASE: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS	20
3.2.1 Atividade de transfrutossilção (A_t).....	22
3.2.2 Atividade hidrolítica (A_h)	24
3.2.3 Razão A_t/A_h	25
3.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	25
3.3.1 Efeitos da temperatura na cinética enzimática	27
3.3.2 Estabilidade térmica enzimática	28
3.3.3 Efeitos do pH na cinética enzimática	29
3.3.4 Efeitos da concentração dos substratos na cinética enzimática.....	29
3.4 ENZIMAS IMOBILIZADAS.....	30
3.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	32
3.5.1 Adsorção física	33
3.6 TIPOS DE SUPORTES.....	34
3.6.1 Sílica-gel.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA	38
4.1.1 Preparo do inóculo: micro-organismo e condições de cultivo	38
4.1.2 Fermentação submersa: meio de cultura e produção de FTase extracelular	38
4.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA.....	39
4.2.1 Imobilização da FTase extracelular microbiana em sílica-gel	39

4.2.2 Parâmetros de imobilização enzimática	40
4.3 ENSAIOS ANALÍTICOS	40
4.3.1 Determinação das atividades de transfrutossilação e hidrolítica da enzima livre e imobilizada	40
4.3.2 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)	41
4.3.3 Determinação da concentração de glicose (G)	42
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR IMOBILIZADA	43
4.4.1 Avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na reação enzimática.....	43
4.4.2 Avaliação do efeito da concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos	44
4.4.3 Ensaios de estabilidade enzimática frente ao pH.....	44
4.4.4 Ensaios de estabilidade térmica.....	45
4.4.5 Ensaios de estabilidade operacional	45
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SUPORTE SÍLICA-GEL	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 PERFIS CINÉTICOS DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM SÍLICA-GEL	46
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	49
5.2.1 Efeitos do pH e temperatura do meio reacional sobre as atividades da enzima imobilizada	49
5.2.2 Efeito da concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos.....	57
5.2.3 Estabilidade frente ao pH da FTase extracelular livre e imobilizada.....	60
5.2.4 Estabilidade térmica da FTase extracelular livre e imobilizada.....	62
5.2.5 Estabilidade operacional: avaliação do reuso da enzima imobilizada.....	67
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SUPORTE SÍLICA-GEL	68
5.3.1 Difração de raios X (DRX).....	68
5.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	69
6 CONCLUSÕES.....	74

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos encontrados principalmente em alguns produtos de origem vegetal (HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOUTS, 1997). São açúcares não convencionais, e devido a suas características funcionais, aspectos fisiológicos e propriedades físicas, sua utilização nas indústrias alimentícia e farmacêutica vem aumentando gradativamente (SPIEGEL et al., 1994).

Ademais, devido ao aumento da preocupação da sociedade com a saúde e qualidade de vida, acentuou-se a busca por alimentos mais saudáveis com baixo valor calórico. Dessa forma, alimentos funcionais, especialmente prebióticos e probióticos, estão sendo acrescentados à dieta humana, a fim de fornecerem nutrição básica e saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (SAAD, 2006).

Tais oligossacarídeos apresentam propriedades funcionais, anticancerígenas, atuam no controle do colesterol e dos triglicerídeos, colaboram no tratamento de enfermidades como anemia, osteoporose, hipertensão, diabetes, intolerância à lactose e insuficiência renal (PASSOS; PARK, 2003; SIQUEIRA et al., 2008). Além disso, apresentam propriedades não cariogênicas e baixo teor calórico, visto que a digestão enzimática animal ou humana dessas moléculas não é possível (CABRAL et al., 1993; SANTOS, 2002; STEINBERG et al., 2002; YUN, 1996).

Vale ressaltar que, segundo FORTES (2006), os FOS não possuem cor ou odor, não provocam sensação de secura na boca nem precipitam, são capazes de melhorar o *flavour* nos alimentos e aprimorar suas características físico-químicas. Tais oligossacarídeos proporcionam sabor semelhante e cerca de 40 a 60% do poder edulcorante da sacarose (BORNET, 1994).

Assim, os FOS podem ser substitutos da sacarose. E, por apresentarem maior viscosidade e estabilidade térmica em solução, quando em mesma proporção que a sacarose, despertam grande interesse na indústria, sendo utilizados como componentes de produtos funcionais (ANDERSSON et al., 1999; MARX et al., 2000; RIVERO-URGEL e SANTAMARIA-ORLEANS, 2001; SPIEGEL et al., 1994).

FOS podem ser produzidos de forma relativamente simples e são obtidos comercialmente pela hidrólise enzimática de inulina ou pela reação enzimática de transfrutossilacção da sacarose. Eles são produzidos principalmente pela ação enzimática da frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), da β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) e da inulinase (EC 3.2.1.7) (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; MONSAN; PAUL, 1995;

MUTANDA et al., 2014). As enzimas citadas são de origem vegetal e microbiana, no entanto, enzimas microbianas são mais aplicadas, haja vista o ciclo de vida curto dos micro-organismos, baixo custo de produção da enzima e ausência de sazonalidade (HERNALSTEENS, 2006).

Na etapa da síntese de FOS, uma forma possível de intensificar a produção do açúcar pode ser o desenvolvimento de processos biotecnológicos utilizando a FTase extracelular imobilizada em suportes, enzima esta previamente recuperada do meio fermentado mediante filtração a vácuo. A imobilização consiste, basicamente, no processo em que se fixa a enzima de interesse em um suporte para que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente, ou seja, é uma forma de proteção contra condições adversas do meio (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

O uso de enzimas imobilizadas, na condição de biocatalisadores heterogêneos, torna possível o seu reuso em processos contínuos, elimina a necessidade de separação entre as enzimas e os produtos obtidos, além de poder aumentar, consideravelmente, a estabilidade enzimática. Permite ainda, o reaproveitamento do material, a utilização do complexo enzima-suporte em diferentes solventes, pHs e temperaturas e, principalmente, reduz o custo de operação. Tais características possibilitam uma grande vantagem operacional quando comparado ao uso das enzimas livres (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; SHELDON, 2007).

Vale ressaltar que, na literatura, não foram encontrados relatos da imobilização da FTase, por adsorção, em sílica-gel, sendo estas alternativas interessantes a serem exploradas, visto que as vantagens proporcionadas por este suporte e método de imobilização não foram exploradas para a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo estudar o processo de imobilização, por adsorção, da enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301, utilizando sílica-gel como suporte, para produção de frutooligossacarídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir a enzima FTase extracelular microbiana por fermentação submersa utilizando meio de cultura sintético;
- b) Imobilizar a enzima FTase extracelular, separada do meio fermentado, em sílica-gel com carga enzimática elevada e atividade de transfrutossililação;
- c) Obter os perfis cinéticos de imobilização e determinar a temperatura de imobilização, visando obter FTase imobilizada com elevada atividade de transfrutossililação;
- d) Determinar os parâmetros de imobilização: atividade oferecida (AO), rendimento de imobilização (RI), atividade desaparecida (AD) e atividade recuperada (AR);
- e) Caracterizar as enzimas imobilizadas quanto aos efeitos do pH e temperatura ótimos do meio reacional por planejamento de experimentos;
- f) Avaliar os efeitos da concentração de substrato (sacarose) do meio reacional na atividade de transfrutossililação e obter os parâmetros cinéticos da enzima;
- g) Avaliar as estabilidades térmica, operacional e frente ao pH da enzima FTase extracelular imobilizada e obter seus parâmetros termodinâmicos;
- h) Produzir frutooligossacarídeos (FOS), em pequena escala, mediante avaliação de reuso da enzima imobilizada;
- i) Caracterizar, fisicamente, o suporte sílica-gel para a imobilização de FTase extracelular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FOS: DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS

Os FOS são oligômeros de frutose com grau de polimerização entre 2 e 20, o que os define como oligossacarídeos de cadeia curta. Eles consistem em uma molécula de sacarose, a qual é alongada por uma cadeia de unidades de frutossil, que são conectadas por ligações glicosídicas e possuem estrutura genérica GF_n , em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e n ao número de unidades do grupo frutossil (YUN et al., 1990). Nesses oligossacarídeos, 1 ou 4 moléculas de frutose estão ligadas na posição β -(2 \rightarrow 1) da sacarose e os principais componentes dos FOS são: kestose, nistose e 1-frutossilnistose, conforme ilustrado pela Figura 1.

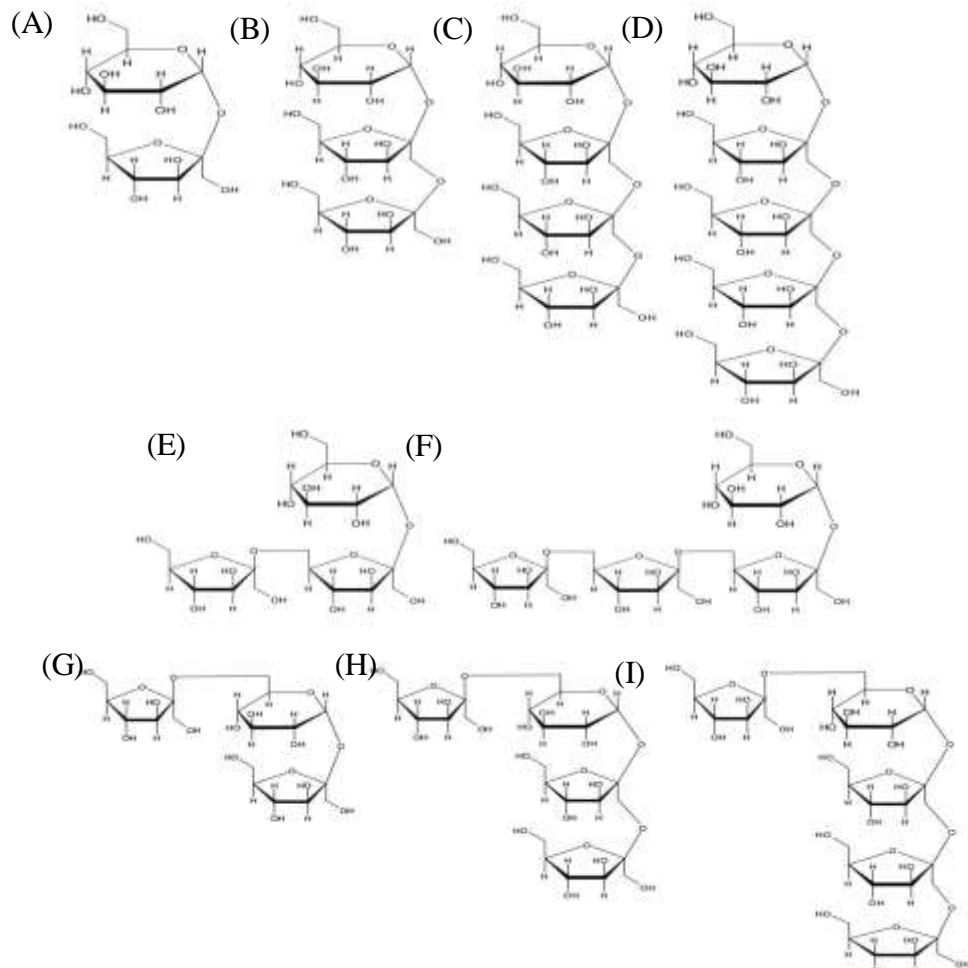


Figura 1 - Estruturas químicas da sacarose e dos principais frutanos: (A) sacarose, (B) kestose, (C) nistose, (D) frutofuranosilnistose, (E) 6-kestose, (F) 6,6-nistose, (G) neokestose, (H) neonistose e (I) neofrutofuranosilnistose.

Fonte: Cunha (2017, p.18).

Uma vez que FOS são polímeros de frutose, com ligações do tipo frutossil-frutose, estes são denominados frutanos, sendo o termo FOS empregado para descrever misturas de frutanos de cadeia curta sintetizados a partir da sacarose (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001). Na natureza, existem diversos tipos de frutanos, os quais podem ser distinguidos por meio das ligações glicosídicas entre os resíduos de frutose.

Segundo Roberfroid (2007) e Saad (2006), oligofrutoses e FOS são termos sinônimos para denominar frutanos com grau de polimerização inferior a 10. No entanto, o termo oligofrutose é mais comum na literatura para descrever inulinas de cadeia curta

Por não serem absorvidos no intestino delgado, os FOS chegam ao intestino grosso, de forma a exercer suas propriedades funcionais estimulando o crescimento de microflora benéfica, o que os classifica como alimentos prebióticos (GIBSON, et al., 2004; LASKIN, 1985; PASSOS; PARK, 2003; TOMOMATSU, 1994).

De acordo com Fortes e Muniz (2009) alimentos prebióticos são ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, sendo benéficos à saúde e ao bem-estar. Para considerar um alimento como prebiótico, ele deve ser resistente à acidez gástrica, não sofrer hidrólise por enzimas de mamíferos e não ser absorvido pelo trato gastrointestinal, bem como favorecer o crescimento de bactérias intestinais benéficas à saúde humana (ROBERFROID, 2007).

Dentre os alimentos que possuem propriedades prebióticas estão os edulcorantes, dos quais os mais estudados e consumidos são os oligossacarídeos. Esses oligossacarídeos são carboidratos formados por resíduos de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas, apresentando grau de polimerização entre 2 a 10. Tais substâncias são encontradas em diversos produtos naturais, ou podem ser obtidas por processos químicos ou enzimáticos.

Naturalmente, os FOS podem ser encontrados em algumas frutas, vegetais e alimentos com alta reserva de carboidratos como aspargos, beterraba, chicória, alho, cebola, alcachofra de Jerusalém, trigo, banana, mel, cevada, tomate e centeio (MUSSATO; MANCILHA, 2007; SANGEETHA et al., 2005; YUN, 1996).

De acordo com estudos realizados por Mutanda et al. (2014), FOS podem ser produzidos por meio de ação de enzimas com atividade de transferência dos grupos frutossil, de modo a alongar a molécula de sacarose ou podem ser obtidos por hidrólise enzimática da inulina. Em qualquer uma dessas vias de obtenção de FOS, são formados frutose e glicose como subprodutos (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Neste processo, os FOS são obtidos pela ação das enzimas usadas diretamente como biocatalisadores, as quais, em condições ótimas de atividade, podem ser empregadas sem a preocupação do efeito destas sobre o micro-organismo produtor.

Sendo assim, a produção de FOS por enzimas com elevada atividade de transfrutossilação deve ser realizada em duas etapas. Na primeira, otimiza-se o processo fermentativo para que os micro-organismos produzam as máximas quantidades de enzimas com elevada atividade de transfrutossilação, as quais após a separação e recuperação do caldo fermentado, serão usadas na etapa posterior. Na segunda etapa, utilizando parâmetros ótimos para sua atividade, as enzimas livres ou imobilizadas, sintetizam os FOS a partir de meios reacionais ricos em sacarose, utilizada como substrato (CHIEN et al., 2001).

A produção de FOS por via sintética iniciou-se no Japão, em 1980, por Meija Seika Kaisha Limited, com o nome de Meioligo®. Em seguida, mais países começaram a produzir FOS em grande escala e comercializá-los por diferentes marcas, como Nutraflora® (Estados Unidos), Raftilose (Bélgica), Actlight® (Beghin-Meiji Industries, França) e F.O.S® (Nutramed Produtos Funcionais, Brasil) (FORTES; MUNIZ, 2009; GANAIE et al., 2014; HARTEMINK et al., 1997).

Esses produtos eram constituídos de uma mistura de FOS de graus de polimerização entre 2 a 6. Entretanto, os FOS comercializados são exclusivamente do tipo inulino-FOS, apresentando baixo grau de polimerização, de 3 a 9 (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

Contudo, Vega e Zuninga-Hansen (2011) relataram que há uma pequena quantidade de FOS de cadeia curta, visto que as enzimas capazes de os produzir não são comercialmente disponíveis. Em meio aos FOS de cadeia curta, a 1-kestose possui maior poder edulcorante. Sendo assim, xaropes compostos por 1-kestose podem substituir a sacarose em dietas características para diabéticos (YUN, 1996).

Na literatura é possível constatar que, os FOS são estáveis em pH entre 4,0 e 7,0 e, também, sua viscosidade em solução e estabilidade térmica são superiores as da sacarose, em mesmas proporções. Por exemplo, a 25°C e concentração de 20%, a viscosidade da solução de FOS é cerca de 6 vezes maior que a viscosidade da solução de sacarose (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

3.2 ENZIMAS E FTASE: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS

Enzimas são proteínas capazes de catalisar reações químicas. São biodegradáveis, atóxicas e atuam em condições específicas de temperatura e pH (ASGUER et al., 2014; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Elas podem ser de origem vegetal, animal e microbiana. As enzimas microbianas, provenientes de fungos e leveduras, apresentam maior interesse industrial devido a facilidade de ampliação de escala e a grande variedade microbiana, o que possibilita diversos estudos na área (SANTOS, 2012).

No geral, as enzimas podem sofrer desnaturação pela ação da temperatura, ou seja, ocorrem alterações em sua conformação tridimensional, inativando-as. A estabilidade térmica da enzima está relacionada com a resistência à desnaturação pela ação da temperatura e é avaliada por meio de parâmetros termodinâmicos (SAQIB et al., 2010).

Dessa forma, a quantificação de enzima presente em um processo em termos absolutos (massa, miligramas) pode considerar uma certa quantidade de enzima inativa. Logo, o parâmetro mais apropriado é a atividade da enzima, que é medida por unidades de atividade (U) e é definida pela quantidade de enzimas que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto de reação (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB), as enzimas são classificadas em seis classes de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das enzimas estabelecida pela IUB.

Classificação	Reação que catalisam	Enzimas
1. Oxido-redutases	Reações de óxidoredução. Transferência de átomos de O e H ou elétrons de um substrato para o outro.	Hidrogenase; Oxidase; Peroxidase; Hidroxilases; Oxigenases.
2. Transferases	Reações de transferência de grupos específicos de um composto para o outro.	Aminotransferases; Acetiltransferase; Cinases; Fosforilases; Frutosiltransferase.
3. Hidrolases	Reações hidrolíticas.	Lipases; Proteases; Amilases; Pectinases.
4. Liases	Reações reversíveis, não hidrolíticas, de remoção de grupos da molécula de substrato.	Descarboxilases; Aldolases.
5. Isomerasas	Reação de isomerização. Transformam isômeros entre si (cis e trans).	Glicose-isomerase.
6. Ligases	Reação de síntese de novos compostos, derivados da junção de duas moléculas.	Piruvato carboxilase.

Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2002).

Conforme essa classificação, a enzima frutosiltransferase (FTase), estudada nesse trabalho, é classificada como uma *Transferase*. As enzimas dessa classe catalisam a transferência de um átomo ou grupo de átomos entre duas moléculas, entretanto não liberam água ou oxigênio, que são características de uma reação de hidrólise ou oxi-redução (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

As enzimas empregadas na síntese de FOS são: as inulinases (EC 3.2.1.7), enzimas capazes de hidrolisar a inulina, as frutosiltransferases (FTase, EC 2.4.1.9), que transferem grupos frutosil para moléculas de sacarose e as β -frutofuranosidases (FFase, EC 3.2.1.26), que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose. Tais enzimas são oriundas de fontes microbianas ou vegetais (GANAIE et al., 2014).

Enzimas com atividade de transfrutosilação estão presentes em algumas plantas, como por exemplo: aspargos, alcachofra de Jerusalém, chicória, cebola, batata doce, mas também podem ser produzidas por micro-organismos (GOTO et al., 1995; YUN, 1996). Devido as condições sazonais, há uma limitação na quantidade de enzimas produzidas por plantas, assim

as enzimas microbianas são mais apropriadas para aplicação industrial (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; HERNALSTEENS, 2006).

A FTase é capaz de catalisar a transferência de um grupo frutossil, tanto de uma molécula de sacarose quanto de um frutoligossacarídeo, em casos em que FOS com cadeias maiores já estão formados. Tal enzima apresenta baixa afinidade pela água como aceptor, o que implica em uma baixa atividade hidrolítica, bem como a possibilidade obtenção de altos rendimentos de produção de FOS, mesmo utilizando soluções diluídas de substrato (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

A atividade de transfrutossilação das FTases se deve a sua ação na ligação β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, deste modo, transferindo uma molécula de frutose para um aceptor, que pode ser outra molécula de sacarose, levando à formação de FOS e liberando uma molécula de glicose no meio reacional (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; GANAIE et al. 2013; MUNIZ-MÁRQUEZ et al. 2016).

Comparando treze cepas de fungos produtores de FTase com atividade de transfrutossilação, Cuervo-Fernandez *et al.* (2007) reportaram que o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 produziu enzimas com maior atividade de transfrutossilação, 17 U.mL⁻¹, e a terceira maior razão entre as atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H), igual a 5,2, para a enzima extracelular.

Otimizando a composição do meio de cultura visando a produção de enzimas com elevada atividade de transfrutossilação a partir do cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em agitadores orbitais tipo shaker, Ottoni et al. (2012) reportaram a sacarose como a melhor dentre as fontes de carbono analisadas, verificando que sua concentração tem influência direta na produção de biomassa e na atividade da enzima.

3.2.1 Atividade de transfrutossilação (A_t)

Segundo o banco de dados ExplorEnz da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2016), a reação promovida pela FTase (EC 2.4.1.9) é a transferência de grupos frutossil, conforme esquematizado na Figura 2.

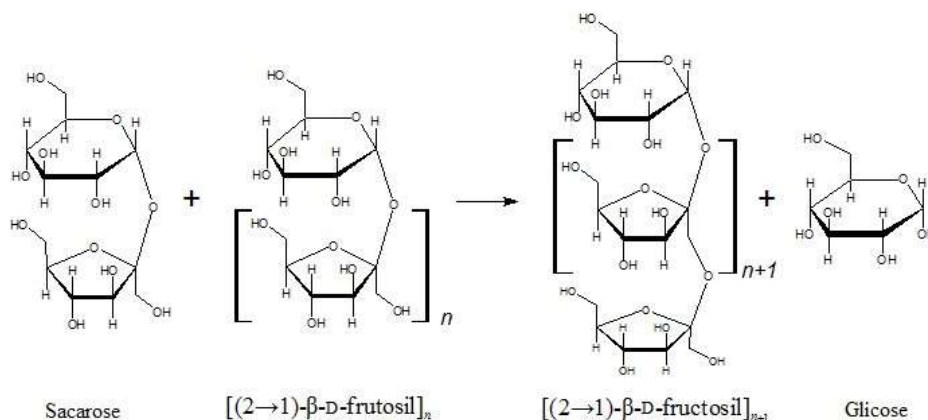


Figura 2 - Esquema da reação de transfrutossilação.
 Fonte: Cunha (2017, p. 25).

A reação de transfrutossilação sobre a sacarose consiste em clivar as ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1), que liga a metade frutossil à metade glicosil da molécula, e transfere o grupo frutossil de um doador ativado para uma molécula aceptora apropriada, que pode ser sacarose ou outras moléculas de FOS e como subproduto é liberada uma molécula de glicose (ANTOSOVÁ et al., 2008; JUNG et al., 1989; YUN et al., 1996).

Segundo Ghazi et al. (2006) e Feng et al. (2005), as transglicosidases são enzimas que transferem o resíduo de glicosil ou frutossil para outro açúcar aceptor (reação de transferência), mas também podem utilizar a água como aceptor nucleófilo, do intermediário glicosil-enzima (reação de hidrólise).

Normalmente, na transglicosilação os FOS de cadeia curta obtidos são potenciais substratos da reação, e também podem ser degradados pela ação da β -frutofuranosidase (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; MONSAN; PAUL, 1995).

Otoni et al. (2012) e Cuervo-Fernandez et al. (2007) definem a atividade de transfrutossilação (A_t) como a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto. Desta forma, a concentração de FOS é constituída por 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose. Já Ganaie e Gupta (2014) definem como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto.

Outros estudos propõem que a atividade de transfrutossilação é a quantidade de enzima necessária para transferir um micromol de frutose por minuto (CHEN; LIU, 1996; HAYASHI et al., 1990; KURAKAKE et al., 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

Sendo assim, a concentração de frutose transferida é obtida indiretamente pelo seguinte balanço de massa:

$$[ART] = [F] + [G] \quad (1)$$

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

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

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

Com a concentração de frutose transfrutossilada (F_t) obtida pela Equação 3, é possível calcular a atividade de transfrutossilagem (A_t) da FTase extracelular, por meio da Equação 4.

$$A_t = \frac{[F_t]V_R}{t_R V_{enzimático}} \quad (4)$$

Em que $[F_t]$ representa a concentração de frutose transfrutossilada ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo de reação (min) e $V_{enzimático}$ o volume do caldo fermentado utilizado na reação enzimática (mL).

3.2.2 Atividade hidrolítica (A_h)

A hidrólise da sacarose pode ocorrer por rota enzimática ou por ácidos diluídos, promovendo a liberação de glicose e frutose, que são os monossacarídeos constituintes da sacarose. Esta reação é denominada como inversão da sacarose (WANG, 2015), e está ilustrada na Figura 3.

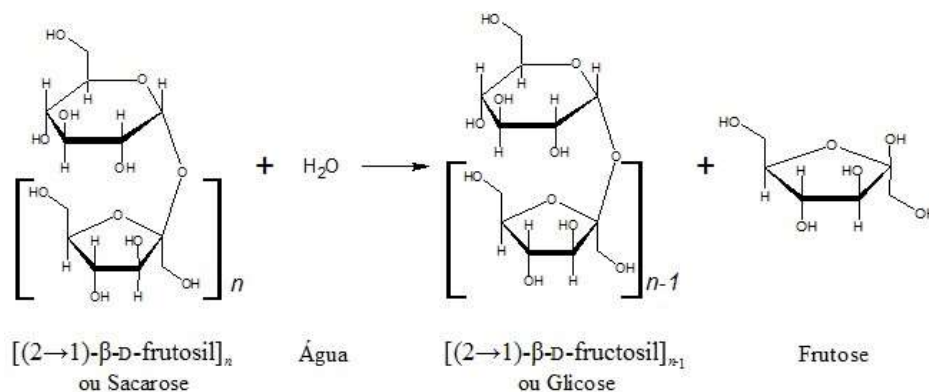


Figura 3 - Esquema da reação de hidrólise de sacarose ou FOS.
Fonte: Cunha (2017, p. 27).

A enzima que catalisa a hidrólise da sacarose e dos FOS é a β -frutofuranosidase (FFase) (E.C. 3.2.1.26), conhecida como invertase (WANG, 2015).

Sendo assim, a atividade hidrolítica (A_h) está relacionada com a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um dos produtos da hidrólise por minuto.

De acordo com Cuervo-Fernandez et al. (2007); Ottoni et al. (2012), a atividade hidrolítica é a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de frutose por minuto, enquanto que Ganaie e Gupta (2014) definem como atividade hidrolítica a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto.

Dessa forma, é possível obter atividade hidrolítica (A_h) da FTase extracelular, por meio da Equação 5.

$$A_h = \frac{[F]V_R}{t_R V_{enzimático}} \quad (5)$$

Em que $[F]$ representa a concentração de frutose ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo de reação (min) e $V_{enzimático}$ o volume do caldo fermentado utilizado na reação enzimática (mL).

3.2.3 Razão A_t/A_h

A razão A_t/A_h indica a predominância da atividade de transfrutossilação sobre a atividade hidrolítica, visto que há competição entre a hidrólise e a transfrutossilação nos processos de síntese de FOS, sendo desejável elevados valores de A_t/A_h para maior eficiência na produção de FOS. Sendo assim, deseja-se que a FTase seja empregada em condições operacionais que apresentem maiores valores de razão A_t/A_h (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; OLIVEIRA, 2007). Segundo Ghazi et al. (2007), a razão A_t/A_h está relacionada com a concentração de sacarose utilizada na reação e com propriedades intrínsecas da enzima, como sua capacidade de se ligar com o nucleófilo (receptor da frutose) e excluir a água.

3.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é estudada com o intuito de avaliar como diferentes condições de processo influenciam na velocidade das reações catalisadas por enzimas, como a temperatura de reação, o pH, a concentração de reagentes, de enzimas, além da presença ou ausência de ativadores e inibidores. Diante disso, para descrever a resposta enzimática aos fatores que afetam sua cinética, equações empíricas ou modelos matemáticos são obtidos. E um dos

modelos matemáticos, conhecido por descrever a cinética de diversas enzimas, é o modelo de Michaelis-Menten (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; OLIVEIRA, 2007).

Tal modelo apresenta relação de 1º ordem entre a velocidade de formação do complexo enzima-substrato ([ES]) e a concentração enzimática e outra relação de 1º ordem em relação a concentração de substrato. Nesse modelo, é feita uma consideração de que a etapa de formação e dissociação do complexo [ES] ocorre com grande velocidade, a fim de desprezar a ocupação dos sítios ativos pelo complexo [ES].

Sendo assim, a relação da velocidade inicial de reação (V) com a concentração de substrato (S) e a validade da aplicação do modelo cinético de Michaelis-Menten são demonstradas pela Equação 6.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S]+K_m} \quad (6)$$

Em que K_m (constante de Michaelis-Menten) descreve a afinidade entre a enzima e o substrato e representa a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima e $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de reação.

Esses valores, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, podem ser obtidos linearizando a Equação 6, como proposto por Lineweaver-Burk, Eadie-Hanes e Hofstee. No entanto, algumas reações enzimáticas não são bem representadas pelo modelo de Michaelis-Menten, o que implica em correções na equação cinética, de modo a considerar a presença de inibidores ou cooperatividade (ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010; SHULER; KARGI, 2002).

No modelo de Michaelis-Menten, as enzimas apresentam cinética hiperbólica, logo, quando a cinética não apresenta essa forma e segue uma curva do tipo sigmoide, são necessárias correções na equação. Isso acontece devido a uma ligação entre o substrato e o sítio ativo da enzima, o que afeta as próximas uniões entre substrato e enzima. Tal fato é comum em enzimas com múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos, definidas como alostéricas. Esta cooperatividade pode ser positiva, quando aumenta a afinidade dos demais sítios ativos depois da ligação da primeira molécula de substrato. Contudo, pode ser negativa quando a primeira molécula de substrato reduz a afinidade dos demais sítios ativos (WEISS, 1997).

Um modelo que considera a cooperatividade é o modelo de Hill, representado pela Equação 7.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]^n}{[S]^n+(K_{0,5})^n} \quad (7)$$

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

O coeficiente de Hill (n) representa a cooperatividade da ligação entre enzima e substrato. A cooperatividade é positiva quando n assume valores maiores do que 1, indicando a presença de mais de um sítio de ligação na enzima ou a possibilidade de formação de subunidades múltiplas da enzima, cada uma com um sítio de ligação com o substrato. Quando o valor do coeficiente de Hill (n) é 1, a Equação 7 passa a representar uma cinética de Michaelis-Menten (WEISS, 1997).

3.3.1 Efeitos da temperatura na cinética enzimática

Ao aumentar a temperatura, bem como a energia cinética das enzimas, a taxa reacional também aumenta até certo ponto. Em baixas temperaturas, as enzimas movimentam-se lentamente em direção ao substrato, o que compromete a catálise. Já o aumento gradativo da temperatura, favorece as colisões entre os sítios ativos das enzimas e o substrato, de forma a aumentar taxa de reação. Entretanto, em uma certa temperatura a estrutura enzimática pode ser alterada, ou seja, ocorre a desnaturação da enzima, o que impede o encaixe específico com o substrato. Sendo assim, existe uma temperatura ideal para cada enzima, na qual a taxa reacional é máxima, seja para a enzima livre ou imobilizada (FIELDS, 2001; SHULER; KARGI, 2002).

Para o estudo dessa temperatura, destaca-se a Equação de Arrhenius, em que estão descritas a ativação térmica e a desativação térmica da enzima pelas Equações 8 e 9, respectivamente:

$$k_a = A_a \cdot e^{-E_a/RT} \quad (8)$$

$$k_d = A_d \cdot e^{-E_D/RT} \quad (9)$$

Em que k_a representa a constante de ativação térmica e k_d a constante de desativação 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 desativação térmica, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta (MIRANDA et al., 2014).

A energia de desativação térmica (E_D) é a energia necessária para a desativação térmica da enzima. Dessa forma, deseja-se valores altos de E_D , por sugerirem maior termoestabilidade para a enzima (CATANA et al., 2006).

3.3.2 Estabilidade térmica enzimática

O tempo de meia vida enzimática, $t_{1/2}$, explicitado pela Equação 10, é o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática à metade do seu valor original, e é inversamente proporcional à constante de desativação térmica (k_d) (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; SHULER; KARGI, 2002).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (10)$$

Para determinar a eficiência de imobilização por meio do fator de estabilidade (FE) (Equação 11), é considerado o tempo de meia vida da enzima antes e após um processo de imobilização, em que $t_{1/2 \text{ imobilizada}}$ representa o tempo de meia vida da enzima imobilizada e $t_{1/2 \text{ livre}}$ o tempo de meia vida da enzima livre (SOCCOL; FRANÇA; RESENDE, 2016).

$$FE = \frac{t_{1/2 \text{ imobilizada}}}{t_{1/2 \text{ livre}}} \quad (11)$$

A variação de entropia (ΔS^*), entalpia (ΔH^*) e energia livre de Gibbs (ΔG^*), são parâmetros termodinâmicos fundamentais para a avaliação da estabilidade das enzimas, livres ou imobilizadas. Quando ocorre a desnaturação térmica da enzima, há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia. Para ocorrer essa transição, de forma irreversível, é preciso fornecer uma quantidade mínima de energia, em forma de calor, para a enzima, denominada energia de desnaturação (E_D). A entalpia de ativação da desnaturação (ΔH_D) está descrita pela Equação 12 e representa a energia necessária para a desnaturação da enzima. Dessa forma, altos valores de entalpia indicam uma maior termoestabilidade da enzima (FERREIRA, 2017; SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

$$\Delta H_D^* = E_D - RT \quad (12)$$

A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação (ΔG_D^*), representada pela Equação 13 é considerada a forma mais confiável para quantificar a estabilidade enzimática, pelo fato de considerar entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima. Valores menores e mais negativos de energia livre de Gibbs,

evidenciam maior tendência de desnaturação da enzima. Desse modo, valores elevados indicam uma maior estabilidade térmica da enzima (KUMAR et al., 2013; SAQIB et al., 2010).

$$\Delta G_D^* = -RT \cdot \ln \left(\frac{k_d h}{k_B T} \right) \quad (13)$$

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 (ΔS_D^*) pode ser quantificada por meio da Equação 14. Esse fator está relacionado com a aleatoriedade do processo de desnaturação da enzima, de forma que, quanto maior a aleatoriedade, maior e positivo será o valor da entropia de desnaturação térmica da enzima. (KUMAR et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

$$\Delta S_D^* = \frac{\Delta H_D^* - \Delta G_D^*}{T} \quad (14)$$

3.3.3 Efeitos do pH na cinética enzimática

Geralmente, as enzimas possuem grupos iônicos em seus sítios ativos, os quais precisam estar em condições ideais específicas, ácidas ou básicas, para atuarem, de forma satisfatória, como catalisadores. Assim, possíveis alterações na forma desses grupos iônicos podem variar a taxa reacional da enzima e uma das causas dessas alterações é a mudança do pH do meio reacional, o que também pode alterar a estrutura tridimensional da enzima. Além disso, o substrato também pode apresentar grupos iônicos. Portanto, mudanças no pH do meio afetam diretamente a afinidade entre enzima e substrato e, existe uma faixa de pH ótimo, em que a enzima é capaz de exercer corretamente sua função de catalisador. Para definir a faixa de pH ótimo para certa enzima, deve-se considerar as características de seus sítios ativos, o que, normalmente, é definido de forma empírica (SHULER; KARGI, 2002).

3.3.4 Efeitos da concentração dos substratos na cinética enzimática

Ao estudar a influência da concentração de um substrato na atividade de uma determinada enzima, as demais condições de ensaio são fixadas e analisa-se como a atividade varia em relação a concentração desse substrato. Inicialmente, com o aumento da concentração

de substrato, aumenta-se a velocidade da reação. Todavia, quando a concentração de substrato é relativamente alta à concentração de enzima, a velocidade da reação não aumenta mais e a enzima pode estar saturada de substrato (FONTES, 2005).

3.4 ENZIMAS IMOBILIZADAS

De acordo com Bickerstaff (1997) e Rosevear (1984), a imobilização é uma técnica que consiste em confinar a enzima, com atividade catalítica de interesse, em um sistema, de forma que ela não migre para o meio onde se encontram o substrato e produto. Este sistema é denominado biorreator e é composto pela enzima e pelo suporte, no qual ela está aderida física ou quimicamente.

Resumidamente, a imobilização é o confinamento da proteína em um suporte sólido, insolúvel tanto em meio aquoso quanto em solventes orgânicos. Tal técnica é considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a seletividade, atividade, especificidade e estabilidade das enzimas (MATEO et al., 2007).

Geralmente, enzimas livres são sensíveis a solventes, agitação, temperatura, pH, dentre outros fatores. Além disso, a utilização de enzimas solúveis apresenta dificuldades como o alto custo de produção e purificação, a instabilidade da estrutura tridimensional ao isolar a enzima de seu ambiente, a perda de atividade devido às condições do processo e inibição pelo substrato ou produto. Esses fatores implicam em um tempo de meia-vida operacional curto, bem como um alto custo. Ademais, o emprego de enzimas solúveis, em meio aquoso (catálise homogênea), pode causar contaminação do produto desejado e podem não ser recuperadas do meio reacional (KRAJEWSKA, 2004).

Dessa forma, a imobilização é um recurso utilizado para melhorar a estabilidade enzimática e possibilitar aplicação em larga escala, bem como em processos contínuos. Ademais, há possibilidade de reutilização das enzimas, diminuição do custo operacional e facilidade de separação do biocatalisador (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Vale ressaltar que, o uso de enzima livre implica na presença do biocatalisador no meio reacional, o que pode gerar alteração de *flavor* e ser um fator de riscos alérgicos, quando presentes em produtos finais como alimentos e medicamentos. Além disso, não é possível reaproveitar a enzima, portanto sempre é necessária uma nova batelada de biocatalisador (SANGEETHA et al., 2005).

Shuler e Kargi, (1992) apresentam algumas vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, sendo elas: altas concentrações por espaço e alta produtividade por volume; reutilização do suporte e redução de custos com o processo contínuo; em alguns casos, melhor desempenho do biocatalisador e ausência de riscos de mutação genética. Outras vantagens da imobilização de enzimas são: o aumento da resistência a mudanças do ambiente reacional, influências de temperatura, pH e solventes orgânicos, possibilidade de reutilização do biocatalisador; fácil separação do catalisador e do produto, bem como a facilidade de interrupção da reação ao atingir determinado grau de conversão (BRADY; JORDAN, 2009; MENDES et al., 2011). Sendo assim, a imobilização tem sido cada vez mais utilizada visando o emprego industrial.

No entanto, deve-se considerar o custo do suporte e do método de imobilização, a estabilidade do derivado imobilizado e a possibilidade de perdas de atividade, já que outros materiais particulados, como células, também podem ser imobilizados no suporte e dificultar o alcance do substrato ao sítio reativo (BRODELIUS; MOSBACH, 1982; HULST; TRAMPER, 1989).

Tanto o método de imobilização de enzimas quanto o suporte a ser escolhido, dependem das características da enzima e das condições de uso do sistema. Portanto, é importante conhecer a reação, as condições do meio reacional, as variações causadas na estabilidade enzimática, pH e outros fatores. Sendo assim, o método e o suporte mais adequados são aqueles que fornecem a melhor atividade recuperada após a imobilização, bem como maior estabilidade térmica e maior faixa de pH de atuação enzimática (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011; SANTOS, 2012).

Vale ressaltar que, a utilização de aditivos ou solventes durante a imobilização tem sido muito estudada, com o intuito de melhorar a eficiência do processo (GOGOI et al., 2006). Como exemplo, tem-se a resina de troca iônica, Dowex que foi utilizada como suporte de imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (POLLARD; WOODLEY, 2007). O processo foi realizado sem um pré-tratamento do suporte, resultando em baixa adsorção. Já com adição de 50% de um solvente polar, como etanol ou iso-propanol, a adsorção aumentou consideravelmente, para 96-97%. Montero et al. (1993) também observou melhoria no processo de imobilização com adição de solvente, o que indica que o solvente polar é capaz de “absorver” moléculas de água do suporte, de forma a facilitar a adsorção da enzima.

Na literatura há relatos da imobilização da FTase extracelular, como por exemplo, o estudo de Yun e Song (1996) sobre a produção contínua de FOS, em que a enzima foi

imobilizada em uma resina com alta porosidade denominada Diaioa HPA 25®. Como resultado, foi obtido um biocatalisador com maior resistência a variações de pH, com possibilidade de reutilização por até trinta dias e queda de 8% da atividade de transfrutossilção inicial. Além disso, os valores de temperatura e pH ótimos para a reação de síntese de FOS, foram inalterados com a imobilização.

Outro estudo sobre a imobilização da FTase extracelular foi realizado por Kamimura et al. (2009). A enzima foi produzida a partir de *Pichia pastoris* e imobilizada em uma mistura de gelatina, alginato de sódio e cloreto de cálcio, possibilitando sua reutilização, com retenção de 20% da atividade inicial. Aguiar Oliveira e Maugeri (2010), também imobilizaram a FTase extracelular de *Rhodotorula* sp., por adsorção, em minério de nióbio, de forma a produzir um biocatalisador com conversão semelhante à enzima livre, razão entre as atividades (A_i/A_h) de aproximadamente 1,6 e tempo de meia vida de 24 dias a 50 °C, possibilitando o reuso da enzima na produção de FOS.

3.5 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Enzimas podem ser imobilizadas por diversos métodos, sendo que não existe um método ou suporte de imobilização que seja adequado para todas as enzimas. Cada enzima apresenta diferentes características físico-químicas, assim como os substratos e produtos, que também apresentam propriedades e aplicações únicas. Desse modo, as condições ideais de imobilização para determinada enzima são determinadas empiricamente, testando-se diferentes métodos, em busca de se obter maior retenção da atividade enzimática, estabilidade operacional e durabilidade (KRAJEWSKA, 2004).

Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens e a escolha deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (ILLANES, 2012; MENDES et al, 2011).

De modo geral, os métodos de imobilização são agrupados em: por confinamento da enzima (encapsulamento e microencapsulamento), por ligação em superfície sólida (adsorção física, covalente e iônica) e por ligação cruzada da enzima com um material insolúvel multifuncional (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; DALLA-VECCHIA;

NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011;). Um esquema dos métodos é apresentado pela Figura 4.

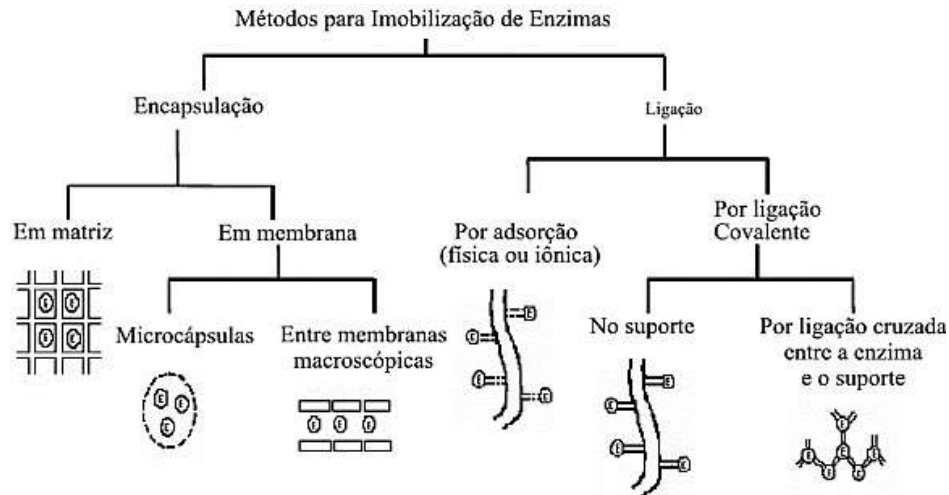


Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas.
Fonte: Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, (2004).

3.5.1 Adsorção física

A adsorção, método de imobilização estudado neste trabalho, é um dos mais utilizados, haja vista sua simplicidade. Nesse método, a enzima é imobilizada em um suporte sólido por interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações iônicas e o processo é favorecido pela agitação suave do sistema. Todavia, a enzima pode ser desorvida do suporte por variações de temperatura, pH e força iônica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011).

Apesar da baixa estabilidade de enzimas imobilizadas por adsorção devido as fracas forças de interação entre enzima e suporte, o método de adsorção é um dos métodos mais aplicados por ser simples e apresentar baixo custo em relação a outros métodos, como por exemplo, a ligação covalente (WISEMAN, 1985).

Como vantagens da imobilização por adsorção pode-se citar a facilidade da técnica, o baixo custo devido a não necessidade de ativação do suporte e a possibilidade de reutilizar o suporte depois de vários ciclos. Outro ponto positivo é que a adsorção provoca pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, pois nesse processo a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação preferencial e energeticamente favorável (ZHOU et al., 2012). Já como desvantagens, destacam-se a aleatoriedade da interação enzima-

suporte e a possibilidade de dessorção da enzima, em casos de variações de temperatura, pH e força iônica (ARICA et al, 2009; BRADY; JORDAN, 2009; GUIDINI et al, 2010; MENDES et al, 2011). Entretanto, existem técnicas que visam reduzir a dessorção da enzima, sendo elas: a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros (REIS; WITULA; HOLMBERG, 2008). Ainda, em outros estudos, há sugestões de que a hidrofobização do suporte pode reduzir a lixiviação e melhorar a atividade enzimática (SERRA et al., 2008).

A eficiência da adsorção de determinada enzima, na superfície de um suporte, está relacionada a diversos parâmetros como tamanho da proteína, área superficial do adsorvente, porosidade e tamanho dos poros (MANECKE, 1972). Outro fator relevante é a concentração da enzima, uma vez que a quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta à medida que a concentração de enzima aumenta, até atingir a saturação do adsorvente (DEREWENDA et al., 1992).

No geral, o processo de imobilização por adsorção é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas, as quais podem seguir as equações de Langmuir ou Freundlich (DEREWENDA et al., 1992).

Oliveira (2007) estudou a imobilização a FTase extracelular de *Rhodotorula* sp., por adsorção, em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite, e obteve eficiência de imobilização de 97,76%. Outro estudo sobre adsorção física foi realizado por Sugahara e Varéa (2014), que estudaram a imobilização da lipase de *Beauveria bassiana*, em sílica-gel, obtendo um rendimento de imobilização de 94,8%.

3.6 TIPOS DE SUPORTES

O bom desempenho da enzima imobilizada está relacionado, principalmente, ao suporte, e, apesar de existirem diversos materiais que podem ser utilizados, deve-se considerar as características da enzima e das condições de uso do biocatalisador imobilizado (MILITIÉ et al., 2009).

Assim, a escolha do suporte deve considerar características como: estabilidade frente aos parâmetros de processo; baixa desnaturação; funcionalidade química; resistência mecânica; retenção da atividade enzimática inicial; durabilidade e capacidade de reutilização; compatibilidade aceitável com a enzima e substrato; custo e facilidade de manuseio (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Além disso, deve-se levar em conta a área

superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, e natureza hidrofílica/hidrofóbica do suporte (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES et al., 2011).

Caso a afinidade da enzima com o suporte não seja estável o suficiente, é possível que haja perda de enzima para o meio, no decorrer do processo. E, caso a afinidade da enzima com o suporte seja maior do que com o substrato, pode-se comprometer a eficiência do processo. Logo, deve-se considerar o tipo do reator, substrato, produto e os parâmetros de processo (LASKIN, 1985).

Os suportes podem ser classificados, quanto à sua morfologia, em porosos, não porosos e de estrutura em gel (MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011).

Os materiais porosos apresentam elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Todavia, o diâmetro dos poros deve ser suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Deve-se atentar, também, as limitações difusionais, visto que o substrato precisa se difundir da solução para a superfície externa, e, também para o interior dos poros do suporte, onde há grande parte de moléculas do catalisador. Além disso, as enzimas no interior dos poros podem ser protegidas de condições adversas do meio reacional (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007).

Em suportes não porosos, as moléculas de enzima acomodam-se apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do substrato com o catalisador. Contudo, a pequena área superficial pode ser uma desvantagem (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007).

Diversos materiais, sintéticos ou naturais, podem ser utilizados como suportes, os quais são classificados em orgânicos e inorgânicos.

- a) Suportes orgânicos: polímeros naturais, polímeros sintéticos e proteínas.
- b) Suportes inorgânicos: minerais, como areia e celite; manufaturados como óxidos metálicos, cerâmicas e géis de sílica, etc.

Nesse trabalho, o suporte estudado é a sílica-gel, um suporte inorgânico e mesoporoso (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

3.6.1 Sílica-gel

A sílica (SiO_2) é um material com alto potencial de aplicação para imobilização, principalmente devido à possibilidade de modificação da superfície deste suporte, o qual possui estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; SOARES et al., 2006).

A sílica pode ser obtida de forma natural ou sintética, sendo micro, meso ou macroporosa, cristalina ou amorfa. Além disso, esse material apresenta propriedades polares, que são sítios de adsorção apropriados para imobilização de enzimas, o que implica em estabilidade química e térmica ao biocatalisador imobilizado (BENVENUTTI et al.; 2009).

É possível adquirir a sílica comercialmente ou produzi-la por diferentes técnicas, como por exemplo a técnica sol-gel que é a mais utilizada para imobilização de enzimas (SOARES et al., 2006).

Diferentes grupos podem ser ligados quimicamente à superfície da sílica. Dentre eles, os compostos organosilícios, que são capazes de alterar as características superficiais como hidrofiliabilidade e hidrofobicidade. O principal objetivo desses tratamentos é evitar limitações de transferência de massa, de forma a melhorar o processo de difusão de substratos e produtos (CRUZ et al., 2010).

A técnica sol-gel é o método de preparação de sílica mais utilizado, no qual ocorre a hidrólise, policondensação e a gelação dos solventes, permitindo a coexistência de espécies orgânicas e inorgânicas no sistema, seguido pela secagem convencional ou por meio pressurizado (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Sendo assim, se a secagem for a temperatura ambiente, forma-se uma rede porosa de sílica, denominada xerogel. E, em caso de secagem por meio pressurizado, a sílica seca é definida como aerogel (BARBOSA et al., 2014).

Vale destacar que, na superfície da sílica-gel existem grupos OH (hidroxilas) ligados quimicamente, que agem como pontos reacionais com os grupos de ativação do suporte ou diretamente com os grupos de ligação da enzima (LIU et al., 2010). Essas hidroxilas podem ser centros de adsorção molecular ou centros de reação, os quais formam ligações Si-O-X, quando interagem com adsorventes que formam ligações de hidrogênio ou interações doador-receptor (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Os grupos OH da superfície são divididos conforme a Figura 5, na forma livre – OH formando os poros na partícula de sílica (a), grupo siloxano $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$ (b), grupo silanol

livre \equiv SiOH (c), silanóis associados = Si(OH)₂ (d) e silanóis vicinais ou germinal por meio de ligação de hidrogênio (e) (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

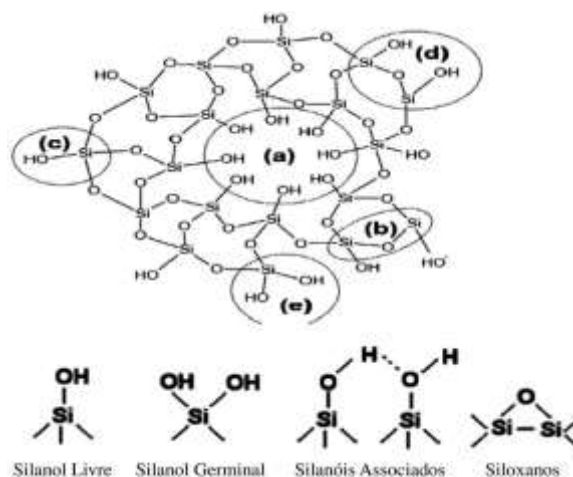


Figura 5 - Estrutura da sílica e os grupamentos presentes.

Fonte: Carvalho; Lima; Soares, (2015).

Gaspari et al. (1999) estudou a imobilização de inulinase, uma das enzimas utilizadas na síntese de frutooligossacarídeos, em diferentes suportes. Sendo estes: quitina, alginato de sódio e de cálcio, membrana de diálise e sílica de porosidade controlada, em que sílica se mostrou mais apropriada, uma vez que tal suporte apresentou maior estabilidade e resistência física comparado aos demais. Baciú et al. (2005) também utilizou sílica porosa obtendo alto rendimento de imobilização, no entanto, ao reutilizar o biocatalisador apresentou perdas de 60% da atividade inicial. Sugahara e Varéa (2014) estudaram diversos suportes para a imobilização por adsorção da lipase extracelular de *Beauveria bassiana*, sendo que o adsorvente mais adequado foi a sílica-gel, com rendimento de imobilização de 94,8%.

Além disso, autores como Canilho et al. (2013), Yu et al. (2013), Gustafsson et al. (2012) e Wang et al. (2011) estudaram a imobilização de lipase de diferentes fontes em sílica mesoporosa, por adsorção física, o método de imobilização estudado neste trabalho. E, (SOLEIMANI; KHANI; NAJAFZADEH, 2012), estudaram a imobilização da α -Amilase, em nanopartículas de sílica, também por adsorção. Dessa forma, a sílica é vista como um dos suportes inorgânicos mais empregados para imobilização de enzimas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA

4.1.1 Preparo do inóculo: micro-organismo e condições de cultivo

Para a produção da enzima FTase extracelular, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida 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, preparado em placa de Petri, 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 da raspagem com 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 a ajustar a concentração de esporos para aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹, quantificada com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C (CUNHA, 2017).

4.1.2 Fermentação submersa: meio de cultura e produção de FTase extracelular

Para o cultivo do micro-organismo e produção de FTase extracelular, preparou-se meio de cultura sintético (pH 5,5) constituído por (em %, m/v): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, NaNO₃ (Dinâmica®) 0,5, KH₂PO₄ (Synth®) 0,2, MgSO₄.7H₂O (Dinâmica®) 0,05, MnCl₂.4H₂O (Synth®) 0,03 e FeSO₄.7H₂O (Synth®) 0,001. Foram distribuídos 100 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e estes, autoclavados a 120 °C e 1 atm durante 20 minutos (CUNHA, 2017). Após a esterilização do meio, inoculou-se 1 mL de suspensão de esporos com concentração de 1×10^7 esporos.mL⁻¹ (Tópico 4.1). Dessa forma, iniciou-se a fermentação submersa, o qual foi conduzida em agitador orbital do tipo *Shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm ao decorrer 64 h do processo (CUNHA, 2017; GARCIA, 2018). O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi

filtrado à vácuo em papel do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm e o permeado, caldo filtrado contendo a enzima FTase extracelular, foi armazenada, sob refrigeração. Visando reduzir a perda de atividade enzimática, buscou-se realizar as etapas de imobilização e reação da enzima produzida imediatamente após a coleta do permeado (CUNHA, 2017).

4.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR MICROBIANA

4.2.1 Imobilização da FTase extracelular microbiana em sílica-gel

A imobilização de FTase extracelular em sílica-gel foi realizada mediante adaptação dos métodos descritos por Sugahara e Varéa (2014) e Alves et al. (2017). Um volume de 10 mL de caldo fermentado filtrado, contendo FTase extracelular, foi adicionado em tubo tipo *Falcon*, juntamente com 1,00 g de sílica-gel comercial, adquirida da Sigma-Aldrich® (área superficial de 500 m².g⁻¹ e tamanhos de poro e de partícula iguais a 60 Å e 63-200 µm, respectivamente), e mantida previamente em estufa de secagem a 60 °C por 24 h.

Os tubos foram mantidos sob agitação de 175 rpm em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) e a imobilização foi monitorada por um período de 6 horas. Durante esse período, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante visando acompanhar as atividades enzimáticas de transfrutoseilação e hidrolítica ao longo do tempo. A temperatura do processo de imobilização foi variada em 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C, a fim de se obter os perfis cinéticos de imobilização.

Ao término da imobilização, foi realizada filtração a vácuo, utilizando a bomba de vácuo TE-058 (Tecnal®) e a torta retida (suporte contendo a enzima imobilizada) foi armazenada sob refrigeração para ensaios posteriores de atividade e caracterização enzimática (pH, temperatura e concentração de sacarose do meio reacional), além de estudos de estabilidades térmica, operacional e frente ao pH para a enzima imobilizada.

Vale ressaltar que, para cada temperatura, os ensaios de imobilização foram realizados em triplicata e, um tubo tipo *Falcon* contendo apenas caldo fermentado, foi submetido sob as mesmas condições experimentais, a fim de monitorar a atividade enzimática da FTase contida no caldo, sem contato com o suporte, durante 6 horas de processo.

4.2.2 Parâmetros de imobilização enzimática

Para avaliar o desempenho da imobilização, são definidos alguns parâmetros, sendo um deles a atividade oferecida (AO) (Equação 15), que quantifica a atividade inicial da enzima livre oferecida para o processo de imobilização.

$$AO = V \times A_t \quad (15)$$

em que V é o volume (em mL) utilizado de caldo fermentado contendo a enzima livre e A_t é a atividade de transfrutoseilação (em U.mL⁻¹) da Ftase extracelular livre.

Outro parâmetro avaliado foi o rendimento de imobilização (RI), que quantifica o percentual de enzima imobilizada, calculado pela Equação 16.

$$RI (\%) = \frac{A_{ti} - A_{tf}}{A_{ti}} \times 100 \quad (16)$$

em que a A_{ti} representa a atividade de transfrutoseilação (em U) do sobrenadante antes da imobilização e A_{tf} representa a atividade de transfrutoseilação (em U) do sobrenadante após o processo de imobilização. Desse modo, a atividade desaparecida (AD), pode ser obtida pela Equação 17.

$$AD = A_{ti} - A_{tf} \quad (17)$$

Finalmente, foi obtido o parâmetro atividade recuperada (AR) que indica o quanto da atividade inicial foi aproveitada pelo suporte, sendo calculado pela Equação 18.

$$AR (\%) = \frac{A_{td}}{AD} \times 100 \quad (18)$$

em que A_{td} é a atividade de transfrutoseilação (em U) do derivado (RAMOS *et al.*,2015).

4.3 ENSAIOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação das atividades de transfrutoseilação e hidrolítica da enzima livre e imobilizada

Os ensaios de atividade da FTase extracelular foram realizados de acordo com as condições estabelecidas por Cuervo-Fernandez et al. (2007). Foram adicionados 0,1 mL da solução enzimática (FTase livre) ou 1 g de suporte (contendo a FTase imobilizada) em meio reacional constituído por 3,7 mL de solução de sacarose comercial (União®) (63,6 %, m/v) e 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5.

As reações enzimáticas foram conduzidas por 60 minutos em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) com agitação de 190 rpm e temperatura controlada de 50 °C. Para finalizar a reação, os tubos foram colocados em banho termostatizado (água em ebulição) por 10 minutos, seguido por resfriamento, por 5 min, em banho com água e gelo, visando a inativação da enzima.

Ao término dos ensaios de atividade, a solução, oriunda do meio reacional, foi diluída com água destilada para a quantificação das concentrações dos açúcares redutores totais (ART) e glicose por meio dos métodos colorimétricos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959, VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013) (Tópico 4.3.2) e GOD-PAP® (CUNHA, 2017; GANAIE et al., 2014; OLIVEIRA, 2007; ZÚNIGA-HANSEN, 2011), (Tópico 4.3.3), respectivamente. Finalmente, as atividades de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) foram obtidas por meio das Equações 4 e 5, respectivamente, utilizando-se as concentrações de frutose e de frutose transfrutoseilada, obtidas pelo seguinte balanço de massa (CHEN; LIU, 1996):

$$[F] = [ART] - [G] \quad (19)$$

$$[F_t] = [G] - [F] \quad (20)$$

De acordo com as condições experimentais, uma unidade (1U) de atividade enzimática de transfrutoseilação foi definida como a quantidade de enzima que produz um micromol (1 µmol) de frutose transfrutoseilada por minuto, ao passo que uma unidade (1U) de atividade hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera um micromol (1 µmol) de frutose por minuto (CUERVO FERNANDEZ et al., 2007; GANAIE; GUPTA, 2014; OTTONI et al., 2012).

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 ($C_7H_4N_2O_7$) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol.L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®). Paralelamente, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (*Reagente B*) constituída por 600 g.L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) (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 reação enzimática, em 1,0 mL da solução preparada. A reação 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, triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos ART mediante auxílio da curva analítica obtida para o método DNS (Figura 13, Apêndice A).

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

4.3.3 Determinação da concentração de glicose (G)

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP®, conforme utilizado nos trabalhos 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, em triplicata, da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 35 µL da amostra, oriunda da reação enzimática, em 3,5 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 absorvâncias e, conseqüentemente,

determinar as concentrações de glicose, por meio da curva analítica obtida para o método GOD-PAP (Figura 14, Apêndice A).

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

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA FTASE EXTRACELULAR IMOBILIZADA

4.4.1 Avaliação dos efeitos do pH e da temperatura na reação enzimática

Com o intuito de se avaliar os efeitos das variáveis *pH* e *temperatura* do meio reacional nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica da FTase extracelular imobilizada em sílica-gel, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional 2^2 (DCCR). Foram avaliados os intervalos de temperatura de 40 °C a 60 °C e pH de 4,5 a 6,5 baseando-se nas condições ótimas de temperatura e pH para a enzima FTase livre, obtidas por Cunha (2017). Portanto, foi construída a matriz de experimentos, composta por 11 ensaios (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz de experimentos para execução do planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional 2^2 (DCCR)

Ensaio	Valores codificados		Valores reais	
	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	43	4,8
2	1	-1	57	4,8
3	-1	1	43	6,2
4	1	1	57	6,2
5	-1,41	0	40	5,5
6	1,41	0	60	5,5
7	0	-1,41	50	4,5
8	0	1,41	50	6,5
9	0	0	50	5,5
10	0	0	50	5,5
11	0	0	50	5,5

Fonte: Da autora.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados conforme descritos no Tópico 4.3.1, variando a temperatura e o pH do meio reacional. Após a execução dos experimentos, realizaram-se as análises estatísticas com o auxílio do *software* Statistica® versão 7.0 (StatSoft. Inc. 2007, USA). O modelo para a superfície de resposta foi ajustado para duas variáveis

resposta (Y): atividade recuperada de transfrutossilacção (em %) e atividade recuperada hidrolítica (em %) da enzima FTase extracelular. As funções de resposta de segunda ordem para os fatores foram expressas pela Equação (21) e as diferenças foram consideradas significativas com valores de $p \leq 0,05$.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_{12} AB + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 \quad (21)$$

em que A e B representam os níveis dos fatores temperatura (°C) e pH, respectivamente, enquanto que β_0 , β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} representam os valores dos coeficientes estimados pelo modelo estatístico.

4.4.2 Avaliação do efeito da concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos

Para a avaliação dos efeitos da concentração de substrato na cinética enzimática, as reações envolvendo a FTase extracelular imobilizada em sílica-gel foram conduzidas em triplicata utilizando, como meio reacional, uma solução constituída por 1,2 mL de tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose (substrato) com concentrações de 200 g.L⁻¹, 300 g.L⁻¹, 400 g.L⁻¹, 470 g.L⁻¹, 500 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹. Ao meio reacional, foi adicionado 1,0 g de suporte contendo a enzima imobilizada e as atividades enzimáticas de transfrutossilacção e hidrolítica foram determinadas conforme método descrito no Tópico 4.3.1. A partir dos resultados obtidos, também foram estimados os parâmetros de reação, por meio de ajustes de modelos cinéticos, utilizando-se o *software* OriginPro 2016®.

4.4.3 Ensaio de estabilidade enzimática frente ao pH

Os efeitos da estabilidade frente ao pH das enzimas extracelular livre e imobilizada foram avaliados para valores de pH 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5. Para estes ensaios, as enzimas foram incubadas a 4 °C, durante 24 h, em solução tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, para os diferentes pH especificados. Ao término da incubação, as atividades enzimáticas das enzimas livre e imobilizada foram quantificadas, em duplicata, conforme método descrito no Tópico 4.3.1.

4.4.4 Ensaio de estabilidade térmica

Os efeitos da estabilidade térmica da enzima extracelular livre e imobilizada foram avaliados para temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60°C. Para tanto, as enzimas foram incubadas em diferentes períodos (1h, 2h, 4h, 6h e 17h), em banho termostatizado Novatecnica®, e os ensaios de atividades enzimáticas foram realizados conforme método descrito no Tópico 4.3.1.

4.4.5 Ensaio de estabilidade operacional

A reação de transfrutoseilação da sacarose foi realizada, em duplicata, a 50 °C em tubo do tipo *Falcon*, pressão ambiente e agitação mecânica de 190 rpm. O sistema reacional manteve a mesma composição descrita no Tópico 4.3.1: 1 g de sílica-gel contendo a enzima FTase extracelular imobilizada (biocatalisador), 3,7 mL de solução de sacarose 63,6% (m/v) e 1,2 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5. Ao término de cada ciclo de reação (6 ciclos consecutivos), o biocatalisador foi retirado do meio reacional, por filtração a vácuo, e introduzido em um novo meio reacional.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SUPORTE SÍLICA-GEL

Primeiramente, foi realizada a análise de Difração de raios X (DRX). Essa análise foi realizada utilizando-se o equipamento Bruker D8 Advance ECO, em que a amostra de sílica-gel sem a enzima foi acondicionada em um porta-amostras polimérico e levada ao equipamento. Para tanto, foi empregada a radiação K-alfa do cobre ($\lambda = 0,15402\text{nm}$), passo de 0,02° e 2 θ de 5 a 90°. Para a obtenção de imagens da superfície do suporte foi feita a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se o equipamento Phillips XL30 FEG. Os materiais em forma de pós (sílica-gel e sílica-gel recoberta com enzima) foram depositados sobre uma fita de carbono em um porta-amostras de alumínio, a fim de se evitar alterações na sílica recoberta com a enzima. Após esse procedimento inicial, um filme de ouro foi evaporado. A voltagem de aceleração utilizada foi de 25kV. A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) foi realizada, para investigar a composição da amostra, com a utilização do equipamento Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer (varredura de 600 a 4000 cm⁻¹).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIS CINÉTICOS DE IMOBILIZAÇÃO DA FTASE EXTRACELULAR EM SÍLICA-GEL

A fim de estudar a imobilização da FTase extracelular em sílica-gel, primeiramente foram realizados ensaios de imobilização, de acordo com o procedimento descrito no Tópico 4.2.1. Dessa forma, para descrever o comportamento da atividade de transfrutossilação (A_t) da enzima livre presente no sobrenadante ao decorrer do tempo de imobilização, foram obtidos os perfis cinéticos de imobilização para as temperaturas de 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35°C (Figura 6).

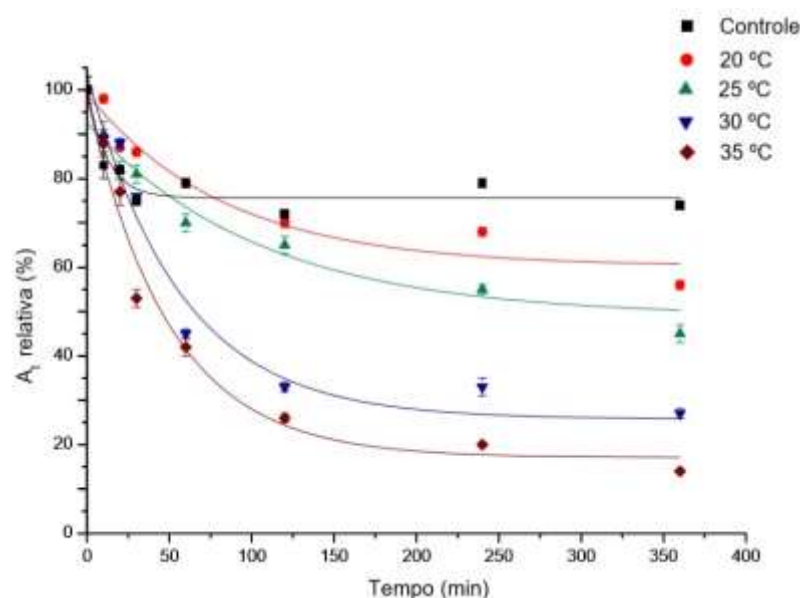


Figura 6 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em sílica-gel comercial em função do tempo: monitoramento da atividade de transfrutossilação no sobrenadante. Fonte: Da autora.

Da Figura 6 foi possível verificar que, para todas as temperaturas investigadas, a atividade de transfrutossilação (A_t), monitorada para o sobrenadante, diminuiu com o aumento do tempo de imobilização, indicando que a enzima foi satisfatoriamente adsorvida ao suporte. Além disso, observou-se que a atividade de transfrutossilação (A_t) da amostra controle (enzima livre sem contato com o suporte) se manteve praticamente constante ao decorrer das seis horas de imobilização, apresentando apenas uma pequena queda devido à instabilidade da enzima livre, visto que as enzimas possuem baixa estabilidade quando removidas de seu ambiente natural (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002), e que a FTase extracelular, por não estar

protegida pelo micélio (biomassa microbiana), está mais suscetível a não realizar satisfatoriamente suas funções (SCHUURMANN et al., 2014).

Apesar da redução da atividade em todas as temperaturas avaliadas, notou-se que, conforme houve o aumento de energia térmica no sistema, a queda de A_t no sobrenadante mostrou-se expressivamente mais acentuada, evidenciando que o aumento da temperatura favoreceu o processo de imobilização. Esse fato já era esperado, uma vez que em processos de adsorção, a temperatura afeta a constante de velocidade de adsorção, de modo que um aumento na temperatura pode aumentar a energia cinética e, conseqüentemente, a mobilidade das espécies a serem adsorvidas (JIMENEZ; BOSCO; CARVALHO, 2004). Ademais, o aumento da temperatura aumenta a taxa de difusão das moléculas a serem aderidas ao suporte, devido à diminuição na viscosidade da solução, e também pode causar uma desobstrução de poros no interior do suporte, permitindo a difusão de moléculas maiores (DOGAN; ALKAN; DEMIRBAS, 2006). Sendo assim, a velocidade de vários processos físico-químicos aumenta consideravelmente com a temperatura (ALMEIDA, 2005).

Dos ensaios realizados para a obtenção dos perfis cinéticos de imobilização, também foi possível determinar o rendimento do processo para cada uma das temperaturas avaliadas por meio da Equação 16 (Tópico 4.2.2). Os cálculos foram realizados baseando-se na atividade de transfrutossilação inicial e final do caldo fermentado, e os valores obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimentos de imobilização.

Temperatura (°C)	Rendimento de imobilização (RI) (%)
20	31 ± 20
25	57 ± 12
30	73 ± 15
35	85 ± 6

Fonte: Da autora.

A partir desses resultados, observou-se que o rendimento foi mais alto para maiores temperaturas de imobilização, comprovando o que foi constatado pela Figura 6. Além disso, pela Figura 6, foi possível verificar que, principalmente para as temperaturas mais altas, a queda de atividade é mais acentuada no início do processo de imobilização e que, no decorrer do tempo, a diminuição de atividade é mais lenta, o que demonstra possível saturação do suporte, assegurando que não é necessário estender o processo de imobilização por mais tempo.

Oliveira (2007) obteve resultados expressivos ao imobilizar a FTase extracelular de *Rhodotorula* sp., por adsorção, em suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite, atingindo eficiência de imobilização de 97,76 %. Nesse estudo também foram testados

outros suportes, sendo um deles a sílica enxertada com zircônio. Primeiramente, foi utilizado o método de adsorção com rendimento de 80 %; entretanto, após 72 horas, sob refrigeração, a atividade caiu para 5 % da atividade inicial. Ao realizar a imobilização por ligação covalente, alcançou-se rendimento de 70 %, porém, quando submetido a 72 h de refrigeração, a atividade caiu para 35 % do valor inicial.

A adsorção física também foi empregada em diferentes trabalhos envolvendo a enzima lipase. Destaca-se o estudo realizado por Paula et al. (2008) em que a lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em matriz híbrida de polissiloxano álcool polivinílico, com rendimento de imobilização de 96,50 %. Ferreira (2017) estudou a imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* em diversos suportes e por diversos métodos, sendo que para a imobilização por adsorção física em sílica aerosil®, foi obtido um rendimento de imobilização de 100% para a enzima purificada. Outro estudo realizado foi a imobilização da lipase extracelular de *Beauveria bassiana* por adsorção, em sílica-gel, em que Sugahara e Varéa (2014) obtiveram um rendimento de 94,8% e sugeriram que altos valores de rendimentos estão relacionados com a estrutura em pó fino e vasta área de adsorção da sílica-gel.

Similarmente, foram obtidos os perfis cinéticos de imobilização para a atividade hidrolítica (A_h), presente no sobrenadante (Figura 7).

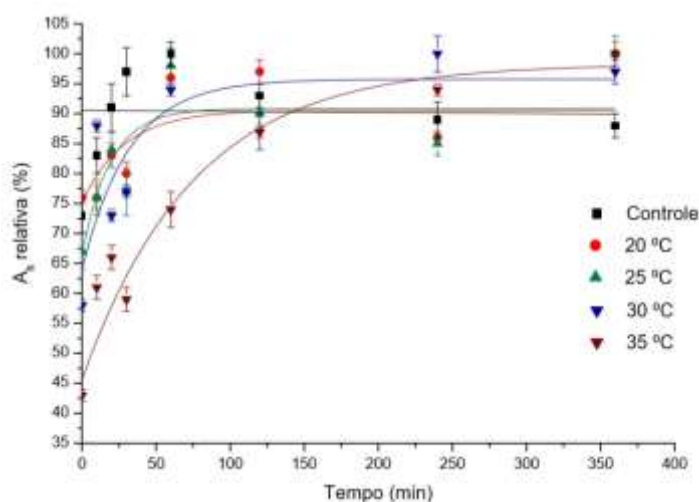


Figura 7 - Perfil cinético de imobilização de FTase extracelular em sílica-gel comercial em função do tempo: monitoramento da atividade hidrolítica no sobrenadante.

Fonte: Da autora.

O comportamento da atividade hidrolítica (A_h) ao decorrer do tempo de imobilização foi diferente em relação ao comportamento da atividade de transfrutossilção (A_t). Nesse caso, para todas as temperaturas avaliadas, a atividade relativa permaneceu entre 90% e 100% com o tempo, apresentando pequenos acréscimos na primeira hora de imobilização.

Tal resultado suporta o fato de que há, possivelmente, diferentes enzimas presentes no caldo fermentado, e que a FTase, enzima com atividade de transfrutossilacção (CUNHA, 2017), apresentou maior afinidade pelo suporte. Isso indica que houve maior afinidade da sílica-gel, na condição de suporte, pela enzima FTase, fato este que permite presumir até mesmo a purificação da enzima durante o processo de imobilização.

Antošová e Polakovič (2001) reportaram que a principal diferença entre as enzimas frutossiltransferase (FTase) e β -frutofuranosidase (FFase) é que a FTase possui alta atividade de transfrutossilacção, alta afinidade pela sacarose ou FOS como aceptores de grupos frutossil e menor afinidade com a água. Como essas enzimas possuem atividades hidrolíticas e de transfrutossilacção, é difícil separá-las e classificá-las, uma vez que as duas atividades podem ocorrer concomitantemente em uma mesma enzima de uma mesma fonte. No entanto, L'Hocine et al. (2000) e Hayashi et al. (1990) isolaram essas enzimas e constataram que a FFase apresentou apenas atividade hidrolítica, e que a FTase apresentou apenas atividade de transfrutossilacção.

Vale ressaltar que, as alterações gráficas na primeira hora de imobilização (Figura 7) retratam as flutuações iniciais do processo, ocasionadas pelos ajustes de temperatura e agitação do sistema. Além disso, como a FTase está sendo adsorvida em sílica-gel, o aumento da atividade hidrolítica pode ser explicado como uma compensação da perda de atividade de transfrutossilacção no caldo fermentado, uma vez que há uma diminuição da competição entre as enzimas com as atividades de transfrutossilacção e hidrolítica.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

Após os estudos de imobilização, avaliou-se a caracterização da FTase imobilizada em sílica-gel. Para tanto, definiu-se a temperatura de imobilização de 35 °C, conforme observado na Figura 6 e Tabela 3, adotando-se um período de imobilização de 6 h e velocidade de agitação de 175 rpm.

5.2.1 Efeitos do pH e temperatura do meio reacional sobre as atividades da enzima imobilizada

Com o intuito de se avaliar os efeitos do pH e temperatura do meio reacional sobre as atividades da enzima FTase extracelular imobilizada, foi realizado um planejamento

experimental do tipo delineado composto central rotacional 2^2 , com três repetições no ponto central. Os experimentos foram executados de acordo com o Tópico 4.4.1, visando otimizar as condições da reação.

Sendo assim, adotou-se como fatores as variáveis: temperatura e pH e, como resposta, as atividades de transfrutossilatação (A_t) e hidrolítica (A_h). Como os ensaios foram realizados com a FTase provenientes de diferentes fermentações, as atividades foram escritas em termos de atividade recuperada (AR) (Equação 18), e os resultados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental e respostas.

Valores Codificados (Reais)		Respostas	
Temperatura (°C)	pH	A_t (%)	A_h (%)
-1 (43)	-1 (4,8)	4	3
1 (57)	-1 (4,8)	2	5
-1 (43)	1 (6,2)	6	3
1 (57)	1 (6,2)	5	4
-1,41 (40)	0 (5,5)	10	2
1,41 (60)	0 (5,5)	10	1
0 (50)	-1,41 (4,5)	2	4
0 (50)	1,41 (6,5)	5	3
0 (50)	0 (5,5)	10	2
0 (50)	0 (5,5)	10	1
0 (50)	0 (5,5)	10	1

A_t : atividade de transfrutossilatação;

A_h : atividade hidrolítica

Fonte: Da autora.

Após obter as respostas do planejamento experimental, foi feita a análise estatística com o auxílio do software Statistica® versão 7, adotando-se como nível de significância ($\alpha = 5\%$), e, portanto, nível de confiança de 95%.

Primeiramente, foi feita a análise para a atividade de transfrutossilatação, gerando tabela de efeitos (Tabela 5), diagrama de Pareto (Figura 8), análise de variância - ANOVA (Tabela 6), superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 9).

De acordo com a Tabela 5 e com a Figura 8, é possível notar que o único efeito significativo para a atividade de transfrutossilatação é o pH quadrático, pois essa variável apresentou p -valor = 0,002, que é menor que 0,05. Esse resultado mostra que o pH é a variável que mais influencia na resposta e comprova o que foi reportado na Tabela 4, visto que para

alterações no valor da temperatura, a atividade sofreu pequenas variações, ao passo que mudanças no valor do pH geraram variações expressivas na variável resposta em questão. Isso se relaciona ao fato de que variações no valor de pH podem alterar a conformação enzimática, o que implica em alterações dos sítios ativos. Assim, mudanças no valor de pH influenciam no equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos, de forma a afetar a distribuição de cargas da enzima, da superfície do suporte, e consequentemente, as interações eletrostáticas entre grupos da proteína e do suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993; PEREIRA et al., 2015).

Tabela 5 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na atividade de transfrutoseilação da FTase extracelular imobilizada.

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	10,00	0,95	0,000
Temperatura (L)*	-0,75	1,17	0,549
Temperatura (Q)**	-1,25	1,39	0,410
pH (L)*	2,31	1,17	0,105
pH (Q)**	-7,75	1,39	0,002
Temperatura x Ph	0,50	1,65	0,775

* L refere-se ao termo linear do modelo estatístico

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

Fonte: Da autora.

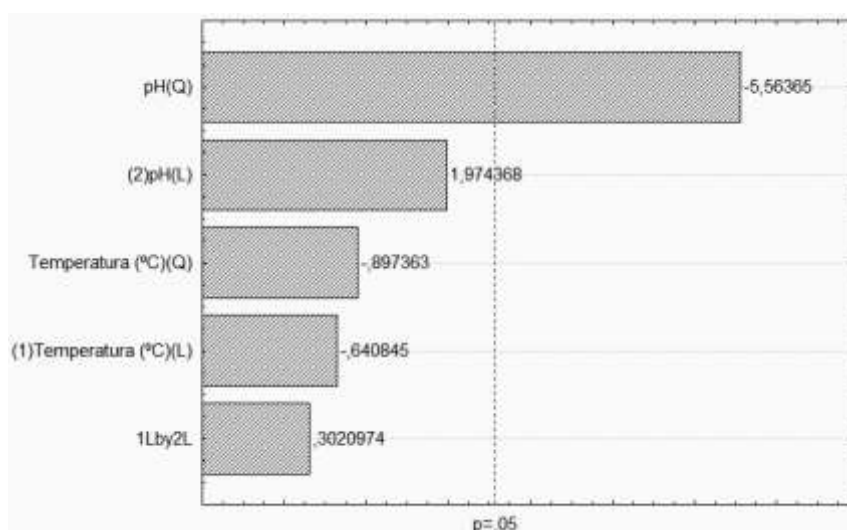


Figura 8 - Diagrama de Pareto para as variáveis pH e temperatura na atividade de transfrutoseilação da FTase imobilizada.

Fonte: Da autora.

Dessa forma, foi gerado o seguinte modelo estatístico (Equação 22) para a atividade de transfrutossilção (A_t).

$$A_t = 10,0 - 0,375T - 0,625T^2 + 1,155pH - 3,875pH^2 + 0,250TpH \quad (22)$$

Para avaliação do ajuste do modelo, tem-se o coeficiente de determinação de erro (R^2), o qual nessa análise demonstrou que 87,80 % da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo da Equação 22. Esse valor pode estar relacionado com as variações nos processos de fermentação, no entanto, como pode ser observado pela Tabela 4, não há variação nos pontos centrais, o que indica reprodutibilidade do processo.

Posteriormente, foi realizada a análise de variância – ANOVA (Tabela 6) do modelo apresentado e o *Teste F* (Equação , o qual tem por finalidade verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

$$Teste F = \frac{\text{Quadrados Médios da Regressão}}{\text{Quadrados Médios dos Resíduos}} \quad (23)$$

Tabela 6 - Análise de variância para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular imobilizada.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	98,48	5	19,69	7,19	0,025
Resíduos	13,69	5	2,73		
Falta de ajuste	13,69				
Erro puro	0				
Total	112,18	10			
R ² = 0,878	F _{5;5;0,05} = 5,05				

Fonte: Da autora.

O valor calculado pela Equação 23, representado na Tabela 6, foi comparado com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência ($F_{\text{Graus de liberdade do modelo; Graus de liberdade do desvio; Nível de significância}}$). Sendo assim, o valor de F tabelado para nível de significância de 5 % foi de 5,05, menor do que o valor calculado, ou seja, o modelo pode ser considerado válido e pode ser utilizado para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno, as quais foram geradas e podem ser visualizadas na Figura 9.

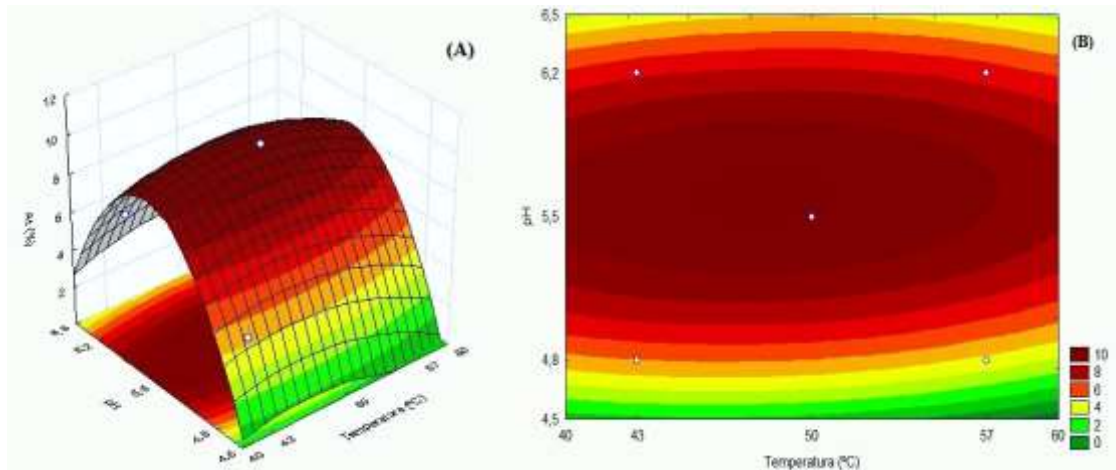


Figura 9 - Atividade de transfrutossilacção em função da temperatura e do pH: (A) superfície de resposta e (B) curvas de contorno.

Fonte: Da autora.

A superfície de resposta permitiu definir as melhores condições para a reação tendo a enzima imobilizada como biocatalisador, as quais foram pH 5,5 e temperatura de 50 °C, condições ótimas estas similares às obtidas para reações envolvendo a FTase extracelular livre, como reportado por Cuervo-Fernandez et al. (2007), Ottoni et al. (2012), Cunha (2017) e Perna et al. (2018).

Sugahara e Varéa (2014), estudaram a imobilização da lipase extracelular de *Beauveria bassiana*, utilizando treze diferentes protocolos experimentais de imobilização, obtendo como método mais apropriado a adsorção física, utilizando sílica-gel como suporte. Os pesquisadores constataram que a imobilização não alterou as condições ótimas de pH e temperatura do meio reacional para a atividade lipolítica.

Posteriormente foi realizada a análise estatística para a atividade hidrolítica, a qual está demonstrada pela tabela de efeitos (Tabela 7), diagrama de Pareto (Figura 10) e pela Anova (Tabela 8).

Tabela 7 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos da temperatura e do pH na atividade hidrolítica da FTase extracelular imobilizada.

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	1,33	0,64	0,094
Temperatura (L)*	0,39	0,79	0,637
Temperatura (Q)**	0,79	0,94	0,438
pH (L)*	-0,60	0,79	0,479
pH (Q)**	2,79	0,94	0,031
Temperatura x pH	-0,50	1,17	0,673

* L refere-se ao termo linear do modelo estatístico

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

Fonte: Da autora.

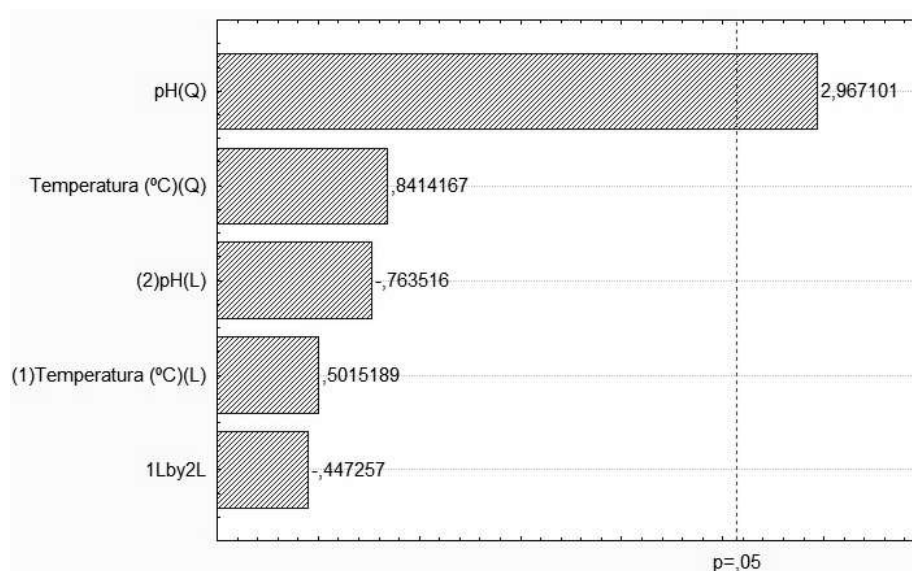


Figura 10 - Diagrama de Pareto para as variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da FTase extracelular imobilizada.

Fonte: Da autora.

A partir da Tabela 7 e da Figura 10, observou-se que, apenas o pH quadrático foi significativo para a atividade hidrolítica. Analogamente à atividade de transfrutossilção, a alteração do pH do meio reacional interferiu nos resultados.

Do mesmo modo, obteve-se o modelo estatístico para a atividade hidrolítica (A_h), representado pela Equação 24.

$$A_h = 1,33 + 0,198T + 0,395T^2 - 0,30pH + 1,39pH^2 - 0,25TpH \quad (24)$$

A análise da Anova (Tabela 8) indicou que não é possível criar superfície de resposta para a variável resposta atividade hidrolítica, visto que o modelo proposto não foi validado. De acordo com o *Teste F* (Equação , o valor calculado, demonstrado na Tabela 8, é menor que o valor de *F* tabelado para nível de significância de 5 %, além de que o coeficiente de determinação de erro (R^2) relata que 66,30 % da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo da Equação 24. Sendo assim, a superfície de resposta não representaria fielmente os dados experimentais.

Tabela 8 - Análise de variância para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH na atividade hiorolítica da FTase extracelular imobilizada.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	12,29	5	2,46	1,97	0,237
Resíduos	6,25	5	1,25		
Falta de ajuste	5,58				
Erro puro	0,66				
Total	18,54	10			
$R^2 = 0,663$	$F_{5,5;0,05} = 5,05$				

Fonte: Da autora.

Além da análise estatística, o estudo da influência da temperatura e pH na atividade enzimática, permitiu comprovar que a enzima imobilizada aumentou, consideravelmente, a razão entre as atividades de transfrutossilacção e hidrolítica, sendo que para a condição ótima de reação para a enzima imobilizada (50 °C e pH 5,5) a razão aumentou em até 10 vezes, conforme indicado na Tabela 9.

Vale ressaltar que, uma análise feita por um delineamento central composto rotacional não seria confiável para a resposta razão (A_r/A_h), uma vez que pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk (RODRIGUES; IEMMA, 2009), tais resultados não representam uma distribuição normal (distribuição de Gauss), além de que o planejamento experimental é fundamentado em estatística paramétrica e, conseqüentemente, dependente da normalidade dos dados analisados (GARCIA, 2018). Sendo assim, foi feita uma análise pontual das respostas obtidas.

Tabela 9 – Razão entre as atividades enzimáticas antes e depois da imobilização.

Condições de ensaio – Meio reacional		A_t/A_h	
Temperatura (°C)	pH	Antes da imobilização	Depois da imobilização
43	4,8	0,98	1,41
57	4,8	0,78	0,35
43	6,2	0,98	1,88
57	6,2	0,47	0,73
40	5,5	0,35	1,78
60	5,5	0,45	7,10
50	4,5	0,47	0,23
50	6,5	0,68	1,31
50	5,5	0,68	2,48
50	5,5	0,45	4,72
50	5,5	0,35	2,36

Fonte: Da autora.

Esses resultados presumem a ocorrência de uma possível purificação da enzima durante o processo de imobilização (adsorção) em sílica-gel, prevista pelo Tópico 5.1. Também pôde-se notar que, mesmo obtendo altos rendimentos de imobilização (Tópico 5.1.), a atividade recuperada foi baixa. Esse fato pode estar relacionado com a porosidade do suporte e a possibilidade de o substrato não atingir os sítios ativos, considerando que a solução de sacarose é viscosa, e que, para suportes hidrofílicos como a sílica-gel, pode haver formação de agregados e de estruturas tridimensionais entre as partículas do suporte, podendo causar uma limitação difusional do substrato ao sítio catalítico da enzima imobilizada, conforme reportado por Ferreira (2017), que ao imobilizar a lipase em sílica aerosil® obteve rendimento de imobilização de 100% e atividade recuperada de 3,8%. Entretanto, a baixa recuperação de atividade pode ser compensada pela possibilidade de reuso da enzima imobilizada.

Esse fato também sugere a hipótese de trabalhar com a sílica-gel funcionalizada, uma vez que alterações na superfície do suporte podem colaborar para o processo de difusão de substratos e produtos. Ademais, foi realizado um estudo, por Soares et al. (2001), sobre a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica de porosidade controlada, previamente ativada com glutaraldeído, o qual mostrou que o tempo de meia vida da lipase imobilizada em sílica ativada aumentou cinco vezes quando comparado com a sílica sem aditivos. Da mesma forma, Barbosa et al. (2016), conseguiu aumentar o rendimento de imobilização, por encapsulação, de 37%

para 87%, ao modificar a sílica aerogel com líquido iônico prótico. Gustafsson et al. 2012 estudou três tipos de sílica mesoporosa para a imobilização da lipase por adsorção física, com diferentes tamanhos (1000, 300 e 40 nm) de partícula e mesma área superficial, de forma a avaliar o tamanho de partícula que proporcionasse a obtenção de um biocatalisador com maior atividade lipolítica, sendo a sílica com 300 nm mais adequada para a imobilização, de modo que a enzima imobilizada foi quatro vezes mais ativa do que a enzima livre.

Platková et al. (2006) avaliaram o uso de diversos suportes comerciais na imobilização de FTase extracelular de *Aureobasidium pullulans* e comparam os efeitos da imobilização por ligação covalente direta entre suportes ativados e a FTase, e por ligação entre os suportes ativados e a FTase tratada previamente com glutaraldeído para a formação de uma reticulação entre as enzimas. Nesse estudo, melhoras operacionais não foram observadas com o uso do glutaraldeído, no entanto, aumentou-se a estabilidade de armazenamento do biocatalisador.

5.2.2 Efeito da concentração de substrato e obtenção dos parâmetros cinéticos

Nos estudos anteriores, o substrato (solução de sacarose) foi utilizado na concentração de 63,67 % (m/v), condição definida para a reação com a FTase extracelular livre (CUNHA, 2017). Entretanto, para dar continuidade a caracterização da enzima imobilizada, fez-se necessário variar as concentrações de substrato a fim de investigar o efeito da concentração de substrato nas reações enzimáticas com o biocatalisador imobilizado. Esse procedimento foi realizado de acordo com o Tópico 4.4.2 e os resultados estão dispostos na Figura 11.

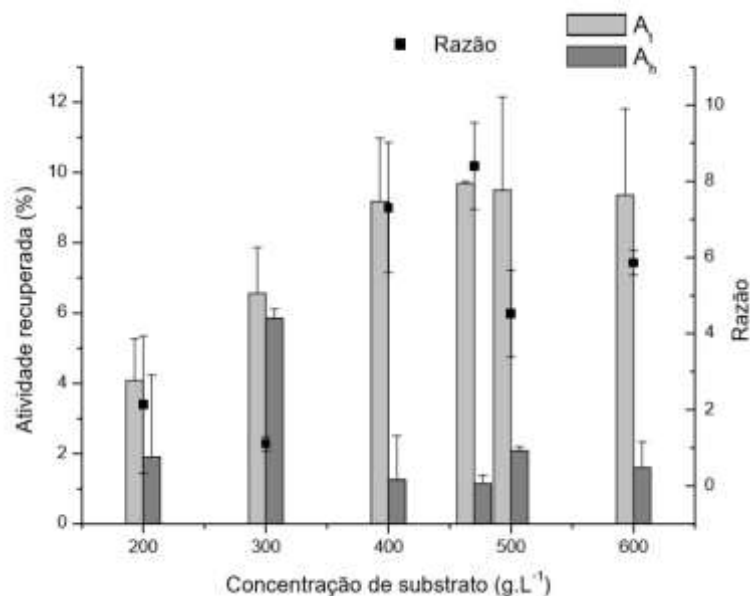


Figura 11 - Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutossiliação, hidrolítica e na razão entre atividades (A_t/A_h) da FTase extracelular imobilizada. Fonte: Da autora.

Foi possível notar que, para as concentrações de sacarose entre 400 g.L⁻¹ e 600 g.L⁻¹, a atividade de transfrutossiliação (A_t) permaneceu constante e com valores mais altos do que os valores de atividade para as demais concentrações estudadas do substrato. Para as concentrações de 200 g.L⁻¹ e 300 g.L⁻¹, a atividade apresentou os menores valores entre os demais, uma vez que, nesse caso, há pouco substrato para que a reação ocorra de forma satisfatória. Hidaka et al. (1988) e Jung et al. (1989) estudaram a FTase de *Aspergillus niger* e constataram que, a formação de FOS em altas concentrações de sacarose, próximas a 50 % (m/v), é favorecida, porém a baixas concentrações de sacarose a ação hidrolítica é predominante. Para o valor de 600 g.L⁻¹, a atividade de transfrutossiliação começou a decrescer, o que demonstra a possibilidade de saturação dos sítios ativos do biocatalisador e inibição pelo substrato.

Dessa forma, as melhores condições para a reação enzimática envolvendo a FTase extracelular imobilizada ocorrem em concentrações de sacarose de 400 g.L⁻¹ a 600 g.L⁻¹, sendo que a concentração de 470 g.L⁻¹ apresentou a maior atividade de transfrutossiliação (A_t) e a maior razão (A_t/A_h). É importante destacar que a concentração inicialmente utilizada (solução de sacarose (63,67%, m/v), ao ser ajustada para o meio reacional equivale a concentração de substrato de 470 g.L⁻¹, a qual se mostrou mais adequada para o melhor desempenho da enzima imobilizada, da mesma forma que para a FTase extracelular livre (CUNHA, 2017). Além disso, Cunha (2017), ao avaliar a concentração de substrato para a FTase extracelular livre, verificou

que a atividade de transfrutossilacção apresentou baixa variação para a faixa de concentração de 296,0 a 592,0 g.L⁻¹ e presumiu-se a presença majoritária de FTase no caldo fermentado, uma vez que em baixas concentrações de sacarose, a FTase possui elevada atividade de transfrutossilacção, enquanto que a β -frutofuranosidase possui apenas atividade hidrolítica.

Para a avaliação da cinética enzimática da atividade de transfrutossilacção da FTase extracelular imobilizada, foi feito um ajuste, segundo o modelo de Hill, utilizando o software Origin® 2017, o qual pode ser visualizado pela Figura 12. O coeficiente de determinação de erro (R²) foi de 0,96, logo, tal modelo explica 96,0 % das variações da atividade de transfrutossilacção para a enzima imobilizada.

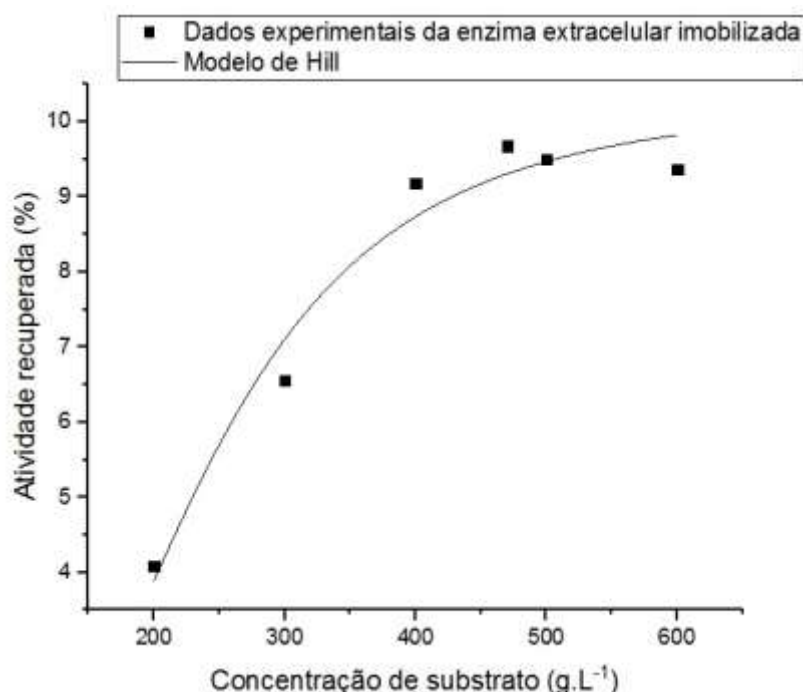


Figura 12 – Modelo de Hill para a FTase extracelular imobilizada.

Fonte: Da autora.

Na Tabela 10 estão dispostos os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill. De acordo com tal modelo, a concentração de substrato em que a atividade recuperada é a metade da atividade recuperada máxima é dada pelo coeficiente $K_{0,5} = 233,8 \text{ g.L}^{-1}$, o que indica que para atingir a metade da atividade recuperada máxima, é necessária uma concentração de substrato de 233,8 g.L⁻¹, aproximadamente metade da concentração de substrato que proporciona máxima velocidade de reação (470 g.L⁻¹). O valor de 3,2 para o coeficiente de Hill (n) representa uma cooperatividade positiva, indicando que a afinidade dos demais sítios ativos da enzima com o substrato aumenta após a reação da primeira molécula de

substrato com um sítio ativo. Ghazi et al. (2007) relatam que o modelo de Hill normalmente apresenta um bom ajuste aos dados provenientes de estudos com enzimas que transferem grupos frutossil. O modelo de Hill é apropriado quando há efeito da primeira ligação entre sítio catalítico e a enzima sobre os demais sítios catalíticos e é comum que isso ocorra em enzimas que apresentam mais de um sítio catalítico e múltiplas subunidades (WEISS, 1997). Dessa forma, o ajuste do modelo de Hill ao comportamento da FTase já era de se esperar, visto que a FTase é frequentemente encontrada na forma dimérica (AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2011; LÜSCHER et al., 1996).

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos para a FTase extracelular imobilizada.

Parâmetros cinéticos	Modelo de Hill
$AR_{\text{máx}}$ (%)	10,30
$K_{0,5}$ (g.L ⁻¹)	233,8
n	3,2

Fonte: Da autora.

Diferentemente da FTase extracelular imobilizada, a cinética da enzima livre, estudada por Cunha (2007), se ajustou ao modelo de Michaelis-Menten. Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) ao imobilizar a frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp., por adsorção, em minério de nióbio, também obtiveram uma cinética correspondente a inibição por substrato. Tal comportamento é comum em enzimas imobilizadas, devido a limitações difusionais e efeitos de partição de prótons (CHIANG et al., 1997).

5.2.3 Estabilidade frente ao pH da FTase extracelular livre e imobilizada

O efeito do pH na estabilidade das enzimas livre e imobilizada foi avaliado para as atividades de transfrutossilacção a uma faixa de pH de 4,5 a 6,5, conforme descrito no Tópico 4.5.3. Os resultados obtidos podem ser visualizados pela Figura 13.

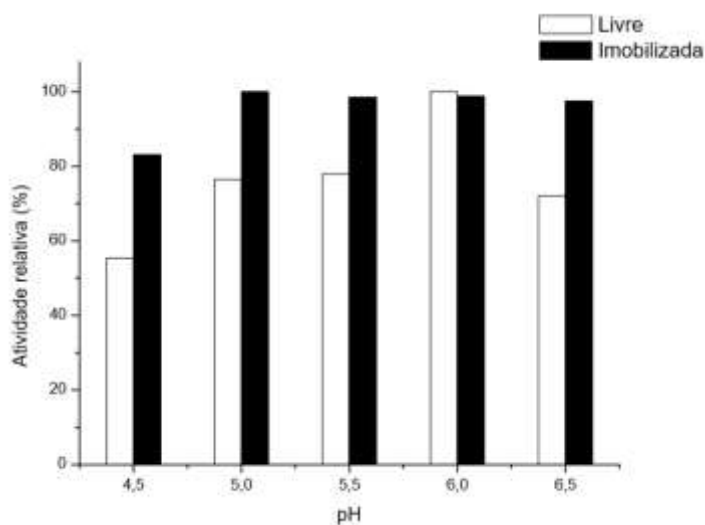


Figura 13 - Estabilidade da FTase extracelular livre e imobilizada frente ao pH.
Fonte: Da autora.

A partir da Figura 13, foi possível observar que a enzima imobilizada apresentou atividades relativas superiores a 80 % na faixa de pH avaliada, sendo que a menor atividade ocorreu em pH 4,5 e para os demais valores de pH a atividade relativa permaneceu constante, o que mostra a estabilidade do biocatalisador imobilizado nessa faixa. Tal resultado é atrativo, uma vez que enzimas estáveis a uma ampla faixa de pH têm como vantagens a redução de custo com estocagem e são viáveis para aplicação industrial (XU et al., 2015). Ao imobilizar a FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. em minério de Nióbio, Oliveira (2007) obteve picos de máxima atividade em pH 4,5 e 6,0, explicando tal variação de comportamento por meio da carga negativa do suporte.

A enzima livre também apresentou a menor atividade relativa em pH 4,5, o que indica que a FTase extracelular, produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301, é sensível a meios ácidos. Ademais, a enzima livre apresentou menor estabilidade quando comparada com a enzima imobilizada, visto que apenas para o pH 6,0 a atividade relativa foi maior que 80%. Portanto, o processo de imobilização conferiu maior estabilidade da FTase extracelular frente ao pH de incubação, o que era esperado, visto que enzimas quando expostas a determinadas condições de pH podem ser desnaturadas, sendo a imobilização uma maneira eficaz de aumentar a estabilidade enzimática, tanto operacional como de armazenamento, pois o confinamento da enzima a protege de alterações em sua conformação (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Da mesma forma, nos estudos realizados por Cunha (2017), a FTase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301, presente no caldo fermentado, mostrou-se pouco estável, com atividade relativa de transfrutoseilação menor que 80 % para a faixa de pH investigada, apresentando

máxima atividade relativa de transfrutossilção em pH 6,0. Nos estudos de El-Beih et al. (2009), a FTase extracelular de *Cryptococcus* sp. LEB-V2, apresentou estabilidade em pH 4,5. Anwar et al. (2008), estudaram a FTase produzida por *Lactobacillus johnsonii*, a qual foi estável na faixa de pH de 4,5 a 6,0, com atividades relativas acima de 85 %.

5.2.4 Estabilidade térmica da FTase extracelular livre e imobilizada

A estabilidade térmica das FTase extracelular livre e imobilizada foi estudada conforme o Tópico 4.4.4, para quatro diferentes temperaturas. A partir dos resultados experimentais, representados pelas Figuras 14 e 15, foi possível obter os parâmetros: tempo de meia vida ($t_{1/2}$), fator de estabilidade (FE), quantidade mínima de energia para inativação do biocatalisador (E_D) e as variações de entalpia (ΔH^*), energia livre de Gibbs (ΔG^*) e entropia (ΔS^*), os quais estão dispostos na Tabela 11. Para esses dados, foi feito um ajuste linear e a energia de inativação térmica (E_D) foi definida por meio da Equação de Arrhenius (Figuras 16 e 17).

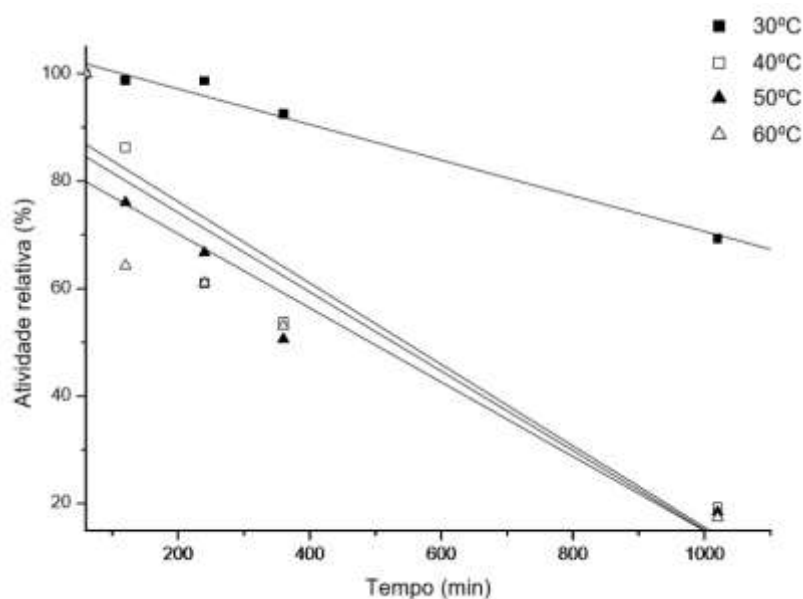


Figura 14 - Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutossilção relativa da FTase extracelular livre.

Fonte: Da autora.

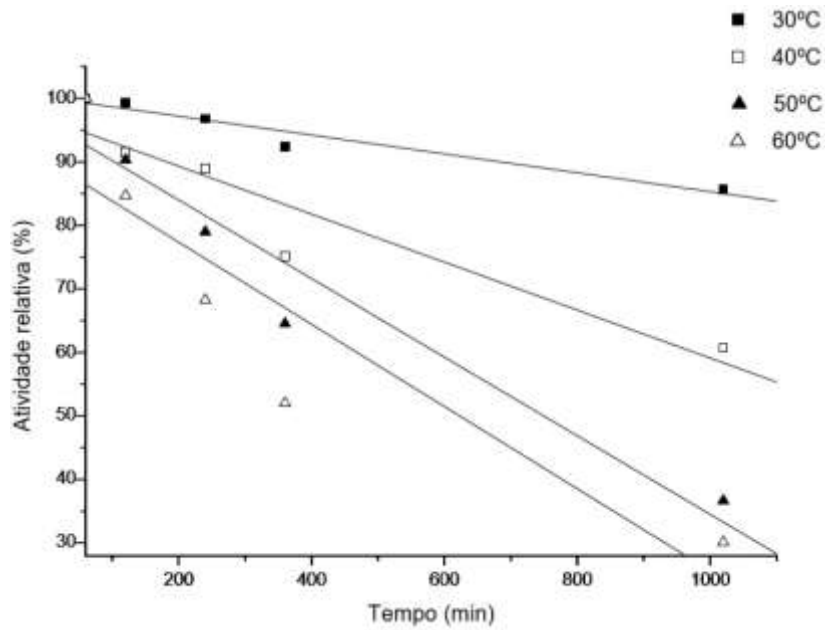


Figura 15 - Curvas de inativação térmica para a atividade de transfrutossilação relativa da FTase extracelular imobilizada.

Fonte: Da autora.

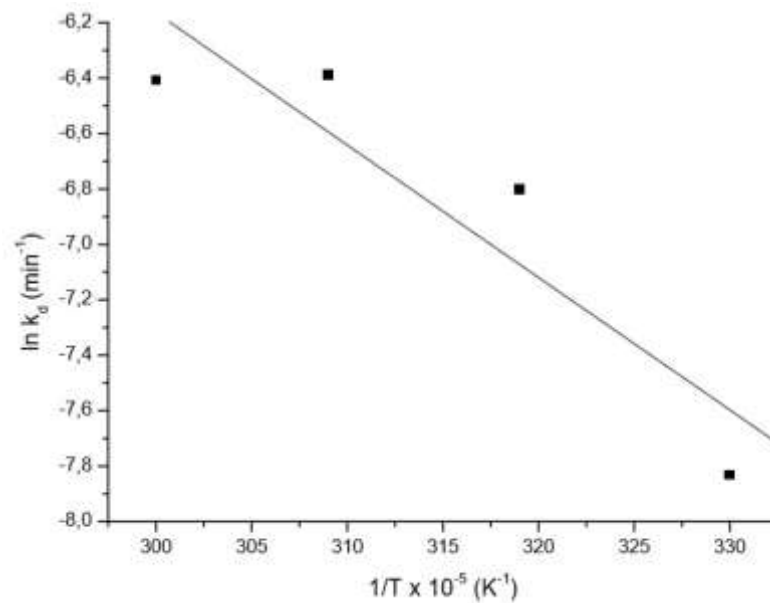


Figura 16 – Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desativação (E_D) da FTase extracelular livre.

Fonte: Da autora.

O ajuste da Figura 16 apresentou um coeficiente de correlação $R^2 = 0,90$ e a Equação 25 foi utilizada para obter a energia de inativação térmica (E_D) para enzima livre.

$$\ln K_d = 8,22 - 4791,11 \cdot \frac{1}{T} \quad (25)$$

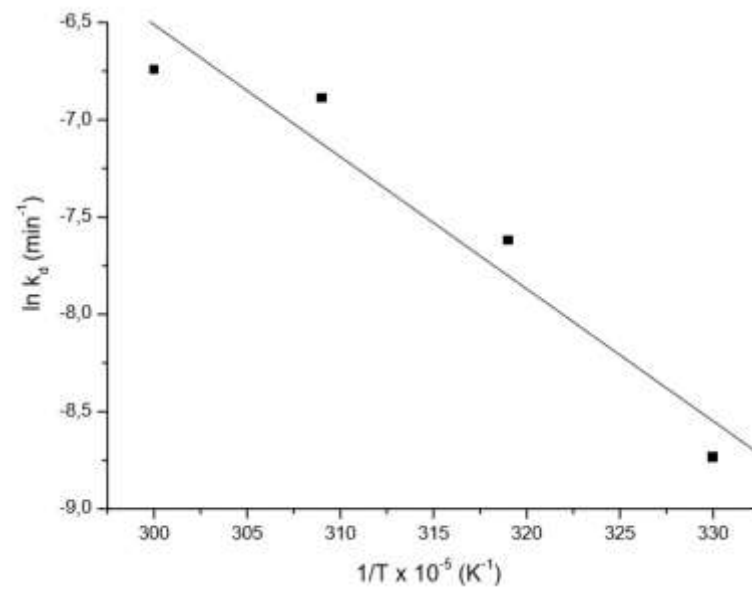


Figura 17 – Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desativação (E_D) da FTase extracelular imobilizada.

Fonte: Da autora.

O ajuste da Figura 17 apresentou um coeficiente de correlação $R^2 = 0,96$ e a Equação 26 foi utilizada para obter a energia de inativação térmica (E_D) para enzima imobilizada.

$$\ln K_d = 14 - 6832,22 \cdot \frac{1}{T} \quad (26)$$

Tabela 11 - Parâmetros termodinâmicos para a FTase extracelular livre e imobilizada, incubada em diferentes temperaturas.

Parâmetros	FTase	Temperatura (° C)			
		30	40	50	60
R ²	L	0,98	0,99	0,99	0,98
	I	0,97	0,96	0,99	0,97
K _d (min ⁻¹) x 10 ⁻⁵	L	40	115	168	165
	I	16	49	102	118
t _{1/2} (min)	L	1743,7	602,7	412,6	420,1
	I	4309,1	1409,7	679,6	587,4
Fator de estabilidade (FE)		2,5	2,3	1,6	1,4
E _D (kJ/mol)	L		39,8		
	I		56,8		
ΔH _D [*] (kJ/mol)	L	37,28	37,20	37,11	37,03
	I	54,28	54,20	54,11	54,03
ΔG _D [*] (kJ/mol)	L	104,34	105,10	107,52	110,99
	I	106,62	107,31	108,86	111,91
ΔS _D [*] (kJ/mol.K)	L	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22
	I	-0,17	-0,17	-0,17	-0,17

Fonte: Da autora.

Da Tabela 11, foi observado que o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) aumentou com o processo de imobilização, conforme indicado pelos valores do fator de estabilidade (FE), para todas as temperaturas estudadas. Esse fato indica maior estabilidade da FTase extracelular imobilizada, visto que o tempo de meia vida é determinado pelo tempo em que a enzima perde 50 % da sua atividade inicial em uma determinada temperatura, e quanto maior esse valor, maior a capacidade da enzima em resistir a temperatura durante um maior período de tempo (SOUZA et al., 2015). Dessa forma, é possível dizer que a enzima imobilizada apresentou estabilidade de 2,5, 2,3, 1,6 e 1,4 vezes maior do que a estabilidade da enzima livre em relação as temperaturas avaliadas: 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente. Observou-se também que o tempo de meia vida diminuiu com o aumento da temperatura, tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada, ou seja, a desnaturação da FTase extracelular ocorre mais rapidamente com o aumento da temperatura.

Adicionalmente, com a imobilização, houve um aumento da energia de desativação térmica (E_D), o que evidencia uma melhoria na termoestabilidade da enzima imobilizada, pois para que a proteína seja desnaturada, é necessário fornecer uma maior quantidade de energia térmica. Ao analisar os parâmetros termodinâmicos, também foi possível notar a melhoria da estabilidade térmica enzimática. Para todas as temperaturas, a variação da entalpia de desnaturação térmica (ΔH^*), apresentou maiores valores para a FTase extracelular imobilizada do que para a enzima livre e, altos valores para a variação da entalpia de desnaturação térmica (ΔH^*) indicam uma elevada estabilidade térmica da enzima (GARCIA, 2018; SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015). A variação de entropia (ΔS^*) associada a desnaturação térmica representa a quantidade de energia envolvida na transição do estado nativo da enzima para o estado de desnaturação. De acordo com a Tabela 11, os valores de ΔS^* para a FTase extracelular livre e imobilizada foram negativos para todas as temperaturas, o que mostra uma redução do grau de aleatoriedade causada pela desnaturação da enzima. Para algumas enzimas, a desnaturação térmica leva a um estado mais ordenado, de modo que a variação de entropia (ΔS^*) apresente valores negativos, o que indica que o processo não é natural e demanda energia (ED) para que a enzima atinja o estado de desnaturação (GARCIA, 2018; SAQIB et al., 2010).

A energia livre de Gibbs (ΔG^*) é o parâmetro mais preciso e confiável para avaliar a estabilidade térmica de uma enzima, pois considera, simultaneamente, as contribuições das energias entálpica e entrópica. Quanto menor ou negativo o valor de ΔG^* , mais espontaneamente ocorre a desnaturação da enzima e, portanto, a proteína é considerada menos estável. Os valores da energia livre de Gibbs (ΔG^*), conforme Tabela 11, foram maiores para a enzima imobilizada, indicando que houve aumento da estabilidade térmica com o processo de imobilização. Também foi possível notar que a FTase, nas formas livre e imobilizada, apresentou valores de energia livre de Gibbs (ΔG^*) entre 100 e 115 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, intervalo descrito na literatura para enzimas consideradas termoestáveis (GARCIA, 2018; SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) imobilizaram a FTase extracelular, de *Rhodotorula* sp., em minério de nióbio e conseguiram aumentar o tempo de meia vida da enzima em até 2,3 vezes. Sugahara e Varéa (2014) imobilizaram a lipase de *Beauveria bassiana*, em sílica-gel, e verificaram que o processo de imobilização aumentou a estabilidade térmica enzimática, visto que para 1 hora de incubação, a enzima imobilizada reteve 64,7% da atividade inicial, ao passo que a livre reteve 40,6%. Soares et al. (1999) caracterizaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica de porosidade controlada, por ligação covalente, e, para uma faixa de

temperatura de 40°C a 60°C, concluíram que a imobilização aumentou a estabilidade térmica da enzima. Simões et al. (2011) também estudaram a imobilização da lipase de *Candida rugosa*, por ligação covalente, em uma matriz híbrida SiO₂-quitosana e constataram que a imobilização proporcionou um aumento da estabilidade térmica enzimática, de modo a aumentar o tempo de meia vida da enzima em 8,6 vezes.

Após a análise dos parâmetros avaliados neste tópico, é possível concluir que a imobilização da FTase extracelular, em sílica-gel, aumentou a estabilidade térmica da enzima, bem como seu tempo de meia vida.

5.2.5 Estabilidade operacional: avaliação do reuso da enzima imobilizada

Após definir as condições ótimas para o meio reacional da enzima imobilizada (pH, temperatura e concentração de substrato), foi realizado o teste de estabilidade operacional para avaliar a possibilidade de reutilização do biocatalisador. Tal procedimento foi executado em duplicata (Tópico 4.4.5) até o sexto ciclo de reação, a fim de evitar grandes perdas de massa do catalisador. Os resultados estão dispostos na Figura 18.

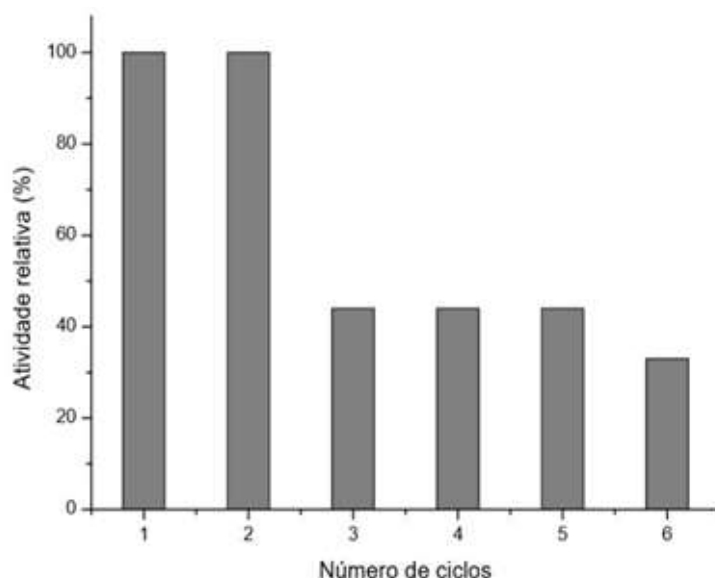


Figura 18 - Avaliação da estabilidade operacional da FTase imobilizada em 6 ciclos batelada. Fonte: do autor.

Ao analisar a Figura 18, observou-se que até o segundo ciclo reacional a enzima manteve a atividade de transfrutossilção (A_t) constante, apresentando queda no terceiro ciclo e permanecendo constante, novamente, até o quinto ciclo, com cerca de 45% da atividade inicial.

No sexto ciclo a atividade voltou a cair, atingindo 33% da atividade inicial. Essas quedas de atividade enzimática podem estar relacionadas ao fato de que há perda de material no momento da filtração a vácuo, uma vez que as partículas podem ser arrastadas durante esse processo. Tais resultados indicam que, até dois ciclos operacionais a enzima imobilizada pode ser utilizada sem perdas de atividade, ao passo que até o quinto ciclo pode ser utilizada com menor atividade e a partir do sexto pode não ser interessante a utilização do biocatalisador, devido à baixa atividade.

No entanto, para processos contínuos, a possibilidade de reutilizar a enzima é uma vantagem, já que, mesmo com quedas na atividade, há economia de tempo, insumos e redução de custos, o que é atrativo para processos industriais.

Ao imobilizar a lipase extracelular de *Beauveria bassiana*, por adsorção física, Sugahara e Varéa (2014) reutilizaram o biocatalisador por quatro vezes em reações de esterificação com 80,8% da atividade inicial. Soares et al (1999) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa*, por ligação covalente, em sílica de porosidade controlada, obtendo resultados atrativos para processos contínuos, visto que o biocatalisador foi reutilizado em vinte ciclos, apresentando queda no quarto ciclo, mas com atividade expressiva até o vigésimo ciclo. Yun e Song (1996) estudaram a produção contínua de FOS pela ação da frutossiltransferase extracelular imobilizada em uma resina de alta porosidade (Diaioa HPA 25®), em que o biocatalisador foi utilizado por até trinta dias com queda 8% da atividade de transfrutossililação inicial. Tais resultados evidenciam a importância da imobilização para possibilidade de reutilização de biocatalisadores.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SUPORTE SÍLICA-GEL

5.3.1 Difração de raios X (DRX)

A partir dessa análise, foi gerada a Figura 19, que corresponde ao difratograma da sílica-gel pura. No difratograma gerado, não foi observado nenhum pico de difração, o que caracteriza o material (suporte) como estritamente amorfo.

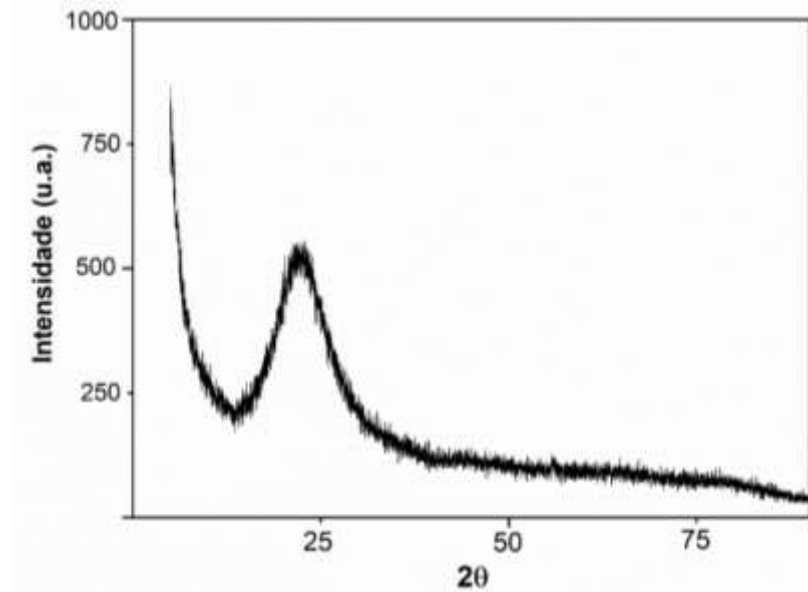


Figura 19 - Difratograma da sílica-gel pura.
Fonte: Da autora.

5.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A partir da análise FTIR, foram obtidos os espectros de infravermelho da sílica-gel pura e da sílica-gel recoberta com enzima, os quais podem ser visualizados pela Figura 20.

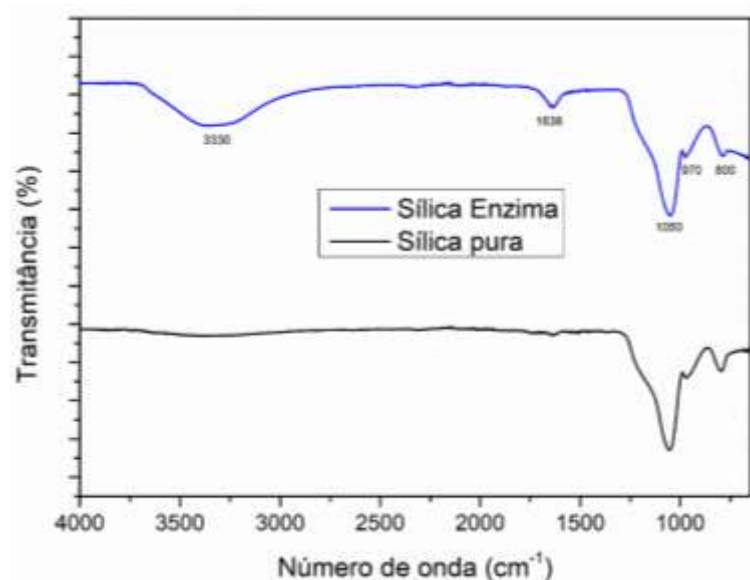


Figura 20 - Espectro de infravermelho por transformada de Fourier das amostras de sílica-gel pura e sílica-gel com enzima.

Fonte: Da autora.

O espectro de infravermelho da sílica pura e da enzima apresentaram bandas nas regiões de 1050 cm^{-1} , 970 cm^{-1} e 800 cm^{-1} . Os modos 1050 e 800 correspondem às vibrações assimétrica e simétricas de Si-O-Si, respectivamente (AN et al., 2010; GAO et al., 2009; LIOU; LIN, 2012).

Já o espectro da sílica-gel com a enzima apresentou duas regiões ativas no infravermelho, que não são encontradas na amostra de sílica pura: 3300 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . A banda na região de 3300 cm^{-1} pode corresponder ao estiramento de grupos N-H (aminas) da enzima, enquanto que a banda na região de aproximadamente 1630 cm^{-1} pode estar ligada a um conjunto de vibrações de grupamento amida (estiramento C-O, estiramento C-N e dobramento de N-H). Porém, a banda na região de 3300 cm^{-1} alarga-se desde 3700 cm^{-1} a aproximadamente 3000 cm^{-1} , cuja intensidade normalizada é superior à da banda de 1630 cm^{-1} . Segundo SOCRATES (2001), a banda correspondente ao grupamento amida deveria ser mais intensa, o que não é observado na Figura 20. A intensificação da banda correspondente ao estiramento N-H (aminas) pode estar associada à uma sobreposição de bandas, incluindo estiramento O-H em aproximadamente 3270 cm^{-1} .

As imagens geradas pela análise MEV podem ser visualizadas a seguir, nas Figuras 21 e 22.

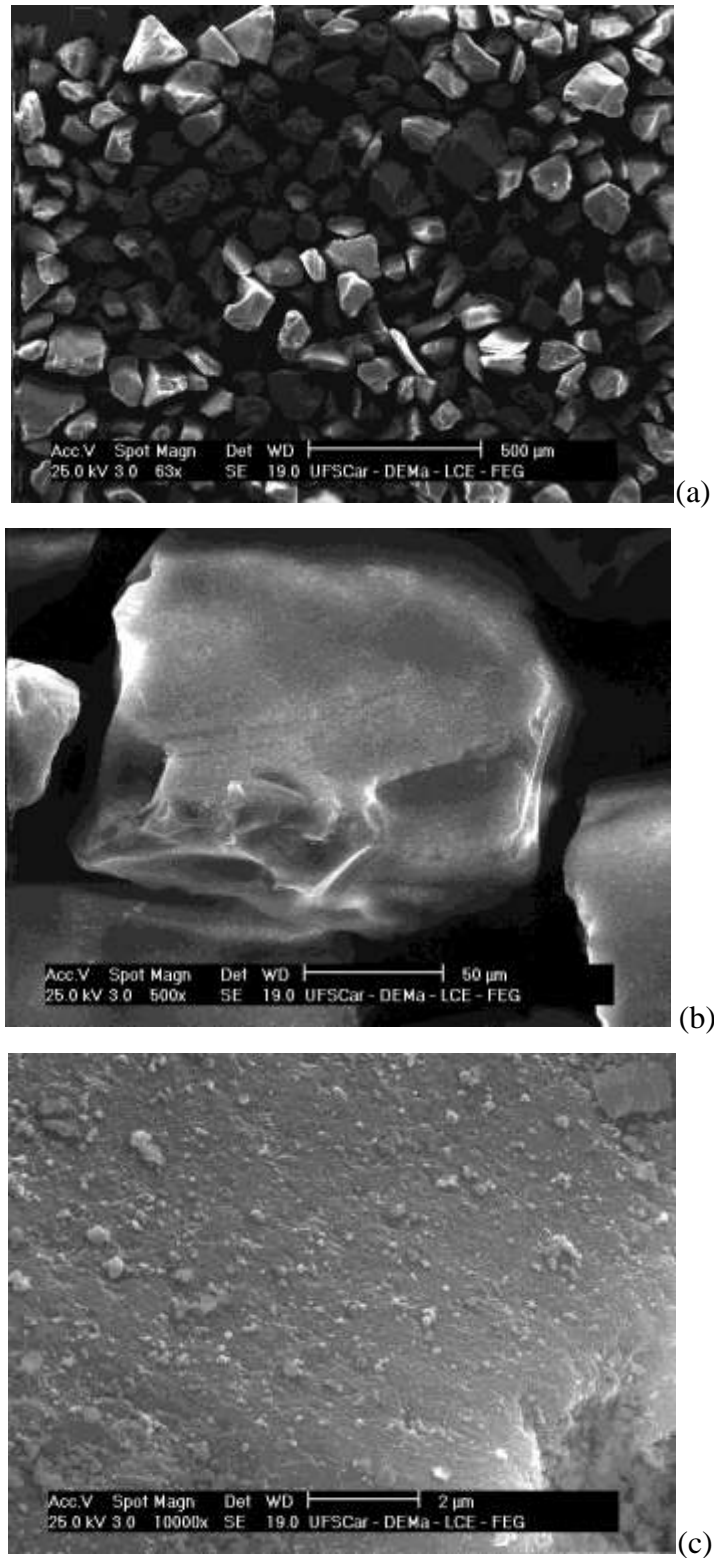
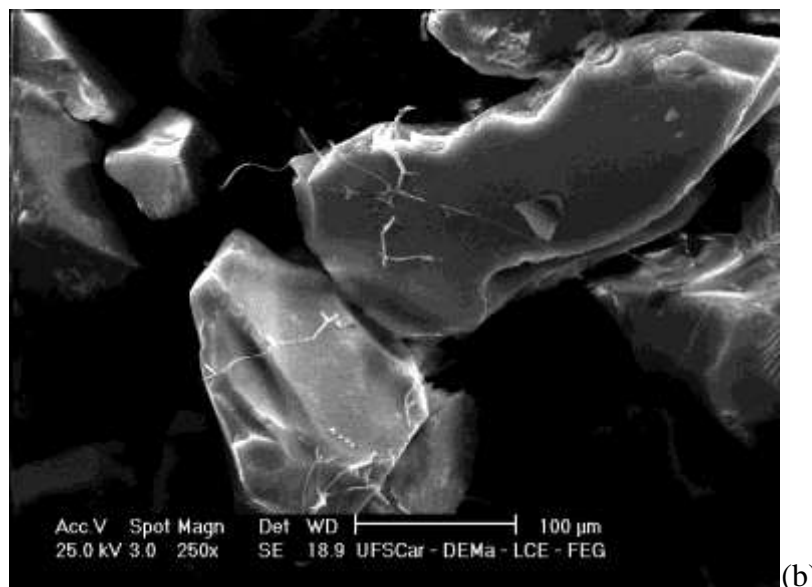
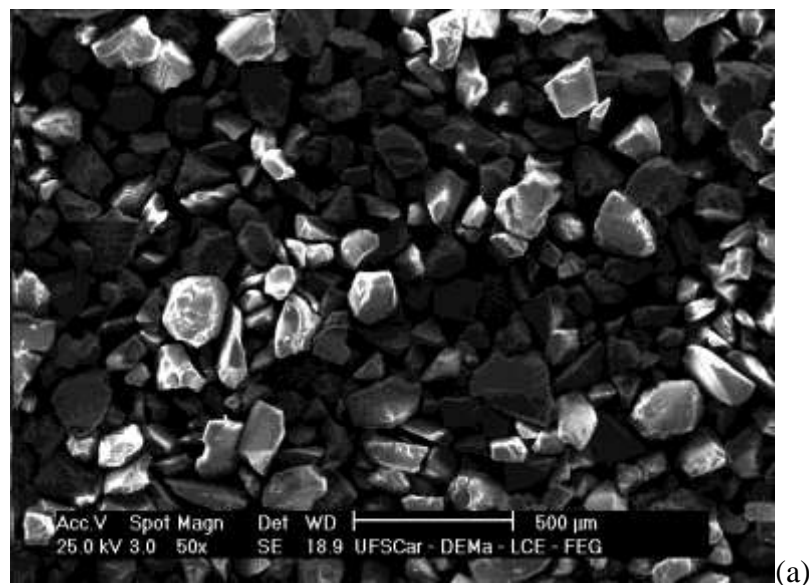


Figura 21 – Micrografia da sílica sem enzima.
Fonte: Da autora.

Nas Figuras 21 (a) e 21 (b), observa-se o particulado de sílica-gel, cujas partículas apresentam tamanhos em torno de 150 a 200 μm . O detalhamento na Figura 21 (c) mostra uma

superfície rugosa, corroborando seu elevado valor de área superficial ($500 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Tal superfície pode favorecer a adsorção da enzima.

O particulado de sílica-gel com enzima é muito semelhante ao da sílica-gel sem enzima, como é possível observar na Figura 22 (a). Entretanto, ao se detalhar sua superfície (Figura 22 (b)), constata-se a presença de uma estrutura díspar da rugosa superficial da sílica-gel pura. Com um nível maior de detalhamento (Figuras 22 (c-d)) é possível notar uma alteração na superfície do suporte, que pode estar relacionada a imobilização da enzima.



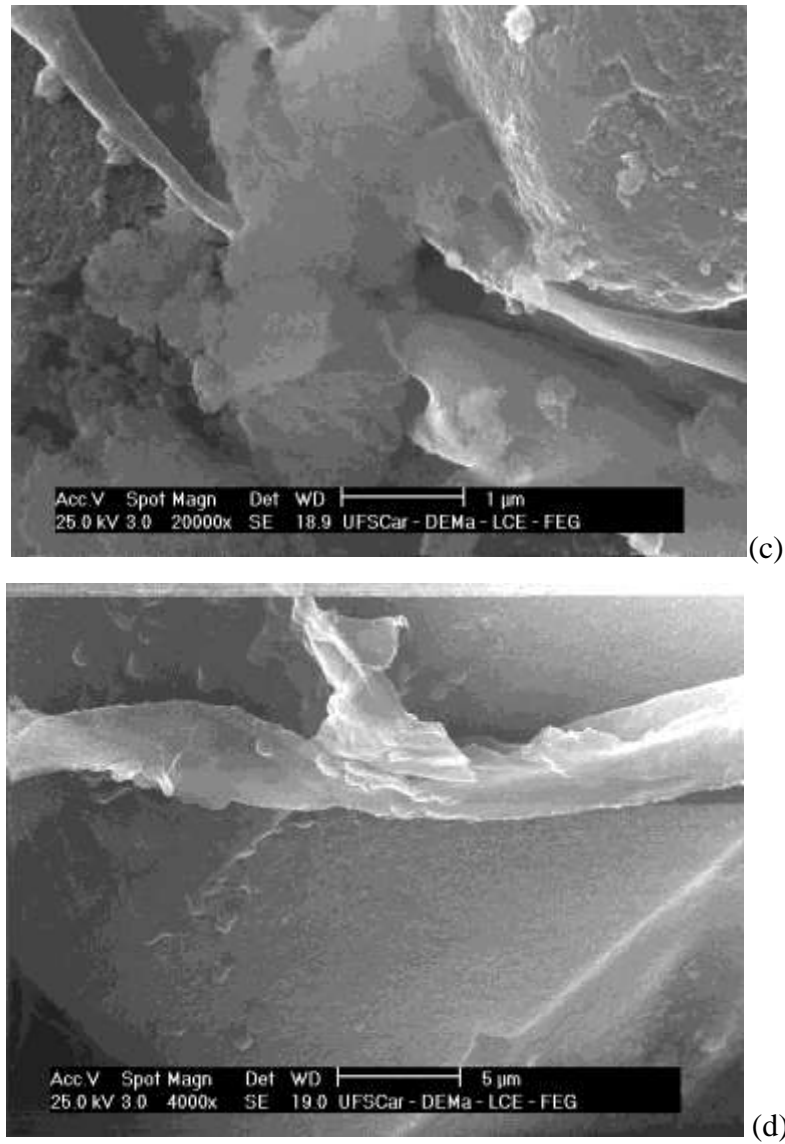


Figura 22 - Micrografia da sílica com enzima.
Fonte: Da autora.

6 CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados, foi possível constatar que a FTase extracelular foi imobilizada, de forma satisfatória, em sílica-gel, e que a temperatura foi favorável ao processo de adsorção, sendo a melhor temperatura de imobilização 35°C, com rendimento de 85%.

Além disso, por meio de um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), foram determinadas as melhores condições de reação para a enzima imobilizada, sendo 50 °C e pH 5,5 os valores de parâmetros que maximizaram a atividade de transfrutossilação da enzima imobilizada.

Tanto o estudo dos perfis cinéticos de adsorção quanto os dados de recuperação de atividade enzimática, mostraram que o processo de imobilização aumentou a atividade de transfrutossilação em relação a atividade hidrolítica da FTase.

Ainda sobre a caracterização enzimática, foi realizado um estudo sobre a concentração de substrato ideal para as reações com a enzima imobilizada, que deve estar entre os valores de 400 a 600 g.L⁻¹. Em relação a cinética da FTase imobilizada em sílica-gel, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo de Hill.

Quanto a estabilidade frente ao pH, a imobilização aumentou a faixa em que a FTase é estável, sendo que de 4,5 a 6,5 a atividade relativa permaneceu acima de 80%.

A estabilidade térmica da enzima também aumentou com o processo de imobilização, de modo que o tempo de meia vida da enzima foi maior em até 2,5 vezes para o estudo de estabilidade a temperatura de 30°C.

Outro estudo realizado foi a estabilidade operacional, indicando a possibilidade de reutilização da enzima imobilizada, sem perda de atividade de transfrutossilação, em até dois ciclos e, após a queda de atividade no terceiro ciclo a atividade se manteve constante até o quinto ciclo. Tal resultado é atrativo para processos industriais, uma vez que com a imobilização é possível reutilizar a FTase extracelular.

Ademais, foi realizada a caracterização do suporte sílica-gel, o que comprovou a adsorção da enzima FTase extracelular em sua superfície.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para continuidade desse trabalho, são propostas as seguintes sugestões:

- Avaliar os parâmetros: pH e agitação durante o processo de imobilização;
- Estudar a imobilização da FTase extracelular em sílica funcionalizada e em diferentes suportes orgânicos e inorgânicos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 3, 2010.
- ALMEIDA, C. A. P. **Caracterização do lutito barro branco e avaliação de sua capacidade como adsorvente de corantes usando o azul de metileno como modelo**. 2005. 179 f. tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 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.
- ALVES, M. D. et al. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1-12, 2017.
- AN, D. et al. A green route to preparation of silica powders with rice husk and waste gas. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 509-514, 2010.
- ANDERSSON, H.B., ELLEGARD L.H., BOSAEUS, I.G. Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1428S–1430S, 1999.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- ANTOSOVÁ, M. et al. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, p. 58-63, 2008.
- ANWAR, M.A. et al. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces highmolecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74 p. 3426-3433, 2008.
- ARICA, MY., ALTMTAS, B., BAYRAMOGLU, G. Immobilization of laccase onto spacerarm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresour Technol**, 2009.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- BACIU, I. E. et al. Investigations of the transfructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogues galactosyl-fructoside; **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 4, p. 347-357, 2005
- BARBOSA, A. S. et al. Imobilização de lipase por encapsulação em sílica aerogel. **Química Nova**, v. 37, p. 969-976, 2014.

BARBOSA, A. S. et al. The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 39, p. 415-422, 2016.

BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, p. 1926-1933, 2009.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Human Press, 1997.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

BORNET, F.R. Undigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 59, n. 3, p. 763S-769S, Mar. 1994.

BRADY D., JORDAN J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnol Lett**. 2009.

BRODELIUS, P.; MOSBACH, K.; Immobilized Plant Cells; **Advances in Applied Microbiology**; v. 28; p. 1-26; 1982.

CABRAL, J. M. S. et al. Applied Biocatalysis; **Harwood Academic Publishers**; Holland; 467 pp.; 1993.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biotacalisadores immobilizados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 36, n. 36, p.47-57, 2006.

CANILHO, N. et al. Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 139-145, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CATANA, R. et al. Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 260–266, 2006.

CHAPLIN, M; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.

CHIANG, et al. Immobilization of β β β -Fructofuranosidase from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides; **Biotechnology and Progress**; v. 13; pp. 577-582; 1997

CHIEN, C.S.; LEE, W.C.; LIN, T.J. Immobilization of *A. japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme Microbial Technology**, v.29, p.252-257, 2001.

COELHO M. A. Z.; SALGADO A. M.; RIBEIRO B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008. 285 p.

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

CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of foodgrade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.353–360, 1996.

CRUZ, J. C. et al. Conformational changes and catalytic competency of hydrolases adsorbing on fumed silica nanoparticles: I. tertiary structure. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 79, p.97-104, 2010

CUERVO-FERNANDEZ. R.; et al. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 87-93, 2007.

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

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

DEREWENDA, U. et al. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, p. 1532-1541, 1992.

DOGAN, M.; ALKAN, M.; DEMIRBAS, Ö. Adsorption kinetics of maxilon blue GRL onto sepiolite. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, p. 89-101, nov. 2006.

FENG, H.Y. et al. Converting a β -glycosidase into a β -transglycosidase by directed evolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.37088–37097, 2005.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993.

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. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, 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.

FONTES R. **Enzimas e cinética enzimática**. 2005. 32 p.

FORTES, R.C; MUNIZ, L.B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v.20, n.3, p.241-252, 2009.

FORTES, R.C. Os frutooligosacarídeos, a inulina e suas implicações na indústria de alimentos. **Nutrição Brasil**, v.4. n.1, p.52-61, 2006.

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.

GANAIE, M.A.; GUPTA, U.S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 12-17, 2013.

GANAIE, M.A.; LATEEF, A.; GUPTA, U.S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.172, p. 2143-2159, 2014.

GAO, G.M. et al. Preparation and properties of silica nanoparticles from oil shale ash. **Powder Technol**, v. 162, p. 47-51, 2009.

GARCIA, R. L. **Imobilização da biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. 2018 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2018.

GASPARI, J. W.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A.; Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L.; **Scientia Agricola**; v. 56; n. 4; supl. Piracicaba; pp. 1135-1140; 1999.

GHAZI, I. et al. Beet sugar and molasses as low cost feedstock for the enzymatic production of fructooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, 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.

GIBSON, G. R. et al; Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics; **Nutrition Research Reviews**, v. 17; p. 259-275, 2004.

GOGOI, S. et al. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross-linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. **Biocatal Biotransform**, v. 24, p. 343-351, 2006.

GUIDINI, C. Z. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochem Eng J**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUSTAFSSON, H. et al. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica--the effect of varied particle size and morphology. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 100, p. 22-30, 2012.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K. M. J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v.38, n.3, p. 367-374, 1997.

HAYASHI, S. et al. Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v.5, p.395-400, 1990.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 2006. 184 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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.

HULST, A. C.; TRAMPER, J.; Immobilized plant cells: a literature survey; **Enzyme Microbial Technology**; v. 11; pp. 66-73; 1989.

ILLANES A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresour Technol**, v. 115, p. 48-57, 2012.

IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. ExploEnz. Disponível em: < <http://www.enzyme-database.org/>> Acesso em agosto, 2018.

JAY, J.; LOESSNER, M.; GOLDEN, D. **Modern Food Microbiology**. New York: Springer US, 2005.

JIMENEZ, R. S.; BOSCO, S. M.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolecita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 734- 738, 2004.

JUNG, K.H. et al. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p. 491–494, 1989.

KAMIMURA, E. S. et al. Immobilization of fructosyltransferase from *Pichia pastoris* in blend of alginate and gelatin. **New Biotechnology**, v. 25, n. September, p. S149, 2009.

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 β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 236-239, 1996.

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

LASKIN, A. I. **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**. California: Biotechnology Series, 1985.

LEE, W; CHIANG, C.; TSAI, P. Kinetic Modeling of Fructo-oligosaccharide Production Catalyzed by Immobilized β -Fructofuranosidase. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 7, p. 2564-2570, 1999.

LIU, T.H., LIN, H.S. Synthesis and surface characterization of silica nanoparticles from industrial resin waste controlled by optimal gelation conditions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 1428-1437, 2012.

LIU, G.; YANG, R.; LI, M.; J. Liquid adsorption of basic dye using silica aerogels with different textural properties. **Non-Crystalline Solids**, v. 356, p. 250-257, 2010.

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.

MANECKE G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. **Biotechnol Bioeng Symp**, v. 3, p. 185-187, 1972.

MARX, S.P. et al. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p.163–169, 2000.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MENDES A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MILETIC, N. et al. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **J Mol Catal B: Enzym**, v. 56, p. 196-201, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030

MONSAN, P., PAUL, F., Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology**, v. 16, p. 187–192, 1995.

MIRANDA, J. S. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis : isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392–403, 2014

MONTERO, S. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme Microb. Technol**, v. 15, p. 239-247, 1993.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B.; et al. Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 276-282, 2016.

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.68, p.587-597, 2007.

MUTANDA, T. et al. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recente advances and current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p.893–906, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Sarvier, 2002.

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.

OTTONI, C.A.; et al. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49-59, 2012.

PASSOS, L.M.N; PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

PAULA, A. V. et al. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PEREIRA, M. G. et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015.

PERNA, R. F. et al. Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, p. 43-50, 2018.

PLATKOVÁ, Z. et al. Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 6, p. 469–472, 2006.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends Biotechnology**, v.25, p. 66-73, 2007.

RAMOS, E. Z. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43-51, 2015.

REIS P., WITULA T., HOLMBERG K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 110, p. 355-362, 2008.

RIVERO-URGEL, M., SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, v. 65, p. S43–S52, 2001.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137 (sup 3), p.S 830-S837, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e amor, 2009.

ROSEVEAR, A.; Immobilized Biocatalysts: a critical review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34B, p. 127-150, 1984.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v.40, p.1085-1088, 2005.

SANTOS, A. M. P.; **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus**. 2002. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2002.

SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Instituto e Tecnologia, UFRRJ, Seropédica, 2012.

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, p.641-646, 2010.

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

SERRA E. et al. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. **Microporous Mesoporous Mat**, v. 114, p. 201-213, 2008.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advances in Synthesis and Catalysis**, v.349, 1289-1307, 2007.

SHULER, M.L. **Bioprocess engineering: basic concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: PrenticeHall, 2002.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 2002.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**. New Jersey: Prentice Hall, 1992.

SIGMAALDRICH.

Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/60741?lang=pt®ion=BR&gclid=CjwKCAjww07cBRBwEiwAMEoXPMsl7mUMZwrHFWXhw8w8smbqpFTlgZ9--ntEd14zCMuK-IWrMCv5LBoCt48QAvD_BwE> Acesso em agosto, 2018.

SIMÕES, A. S. et al. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, p. 33-38, 2011.

SIQUEIRA, C.R.; KOVALTCHUK, E.; SILVEIRA, F.J. Frutooligossacarídeos: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeitos na saúde humana e importância na indústria de alimentos. **VI Semana de Tecnologia em Alimentos**, Universidade Tecnológica do Paraná – UFTPR, v.02, n.4, 2008.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-79, 1999.

SOARES, C. M. F. et al. Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, 2001.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 39, p. 69-76, 2006.

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

SOCRATES, G. **Infrared and raman characteristic group frequencies: tables and charts**. New York: Wiley, 2001.

SOLEIMANI, M.; KHANI, A.; NAJAFZADEH, K. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. **J Mol Catal B: Enzym**, v. 74, p. 1-5, 2012.

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.

SPIEGEL, L.E. et al. Safety and benefits so fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, 85-89, 1994.

STEINBERG, D. et al. Effects of various antiplaque agents on fructosyltransferase activity in solution and immobilized onto hydroxyapatite. **European Journal of Oral Sciences**, v. 110, n. 5, p. 374-379, 2002.

SUGAHARA, V.H.; VARÉA, G.S. Immobilization of *Beauveria bassiana* Lipase on sílica gel by physical adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, p.842-850, 2014.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 10, p. 61-65, Oct. 1994.

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, p.10180–10186, 2011.

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

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

WANG, X. et al. Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template. **Non-Cryst. Solids**, v. 357, p. 3027-3032, 2011.

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

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2. ed. New York: Ellis Horwood, 1985.

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. doi: 10.1007/s00253-008-1407-4

YU, W. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium. **Biochem. Eng J.**, v. 70, p. 97-105, 2013.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.

YUN, J.W. et al. Semi-batch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24/25, p. 299–308, 1990.

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.

ZHOU, Z. et al. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 154, p. 133-141, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Curvas analíticas

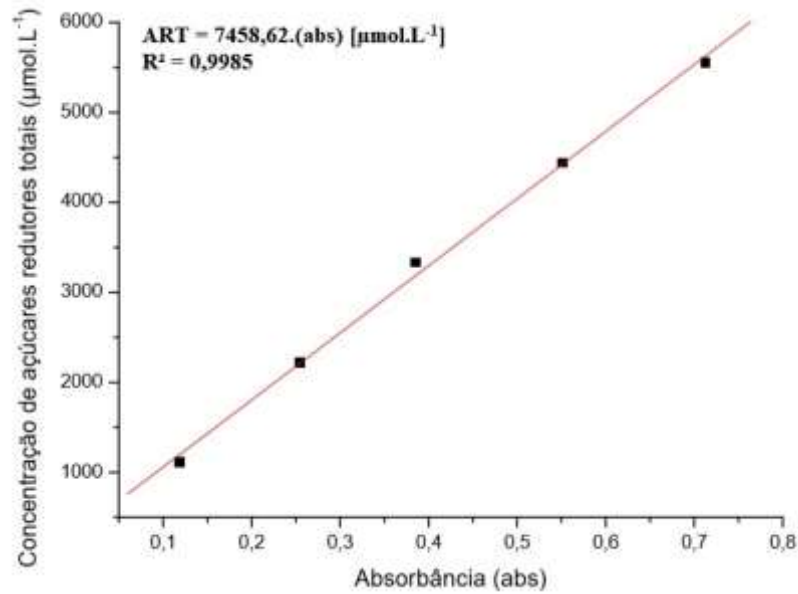


Figura 23 - Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicífico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais (ART).

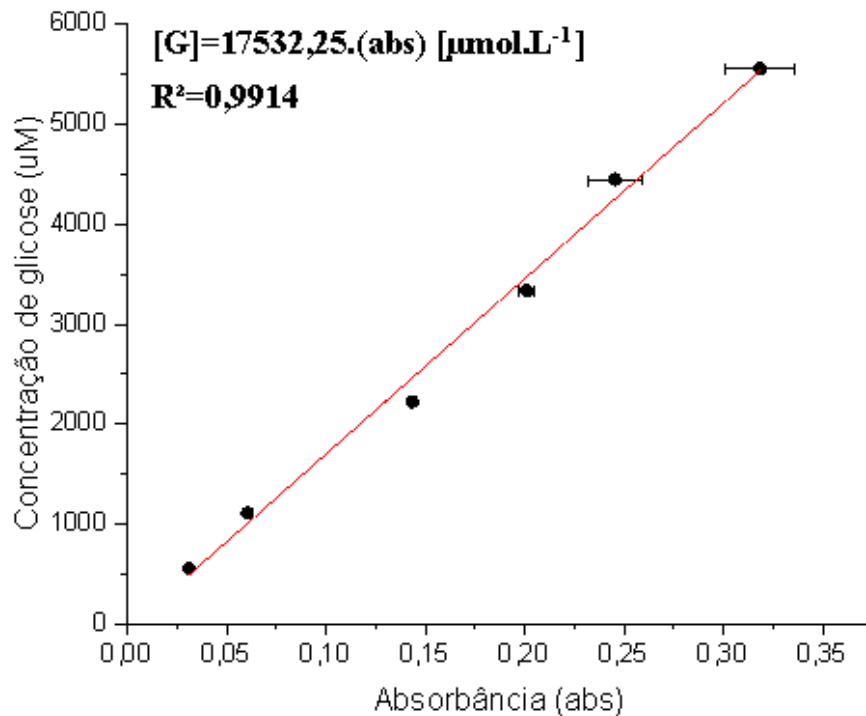


Figura 24 - Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G).