

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARIA CAROLINA PEREIRA GONÇALVES

**IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE MICROBIANA EM GEL DE
ALGINATO E SUA CARACTERIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2019

MARIA CAROLINA PEREIRA GONÇALVES

**IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE MICROBIANA EM GEL DE
ALGINATO E SUA CARACTERIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
Mestre em Engenharia
Química pelo Instituto de
Ciência e Tecnologia da
Universidade Federal de
Alfenas. Área de
concentração: Engenharia
Química.
Orientador: Prof. Dr. Theo
Guenter Kieckbusch
Coorientador: Prof. Dr.
Rafael Firmani Perna

POÇOS DE CALDAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

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

G635i Gonçalves, Maria Carolina Pereira.
Imobilização de frutossiltransferase microbiana em gel de alginato e sua caracterização para a produção de frutooligossacarídeos. - Poços de Caldas/MG, 2019.
139 f.: il. --
Orientador: Theo Guenter Kieckbusch
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.
1. Biopolímeros. 2. Suportes de catalisadores. 3. Oligossacarídeos. 4. Transferases. 5. *Aspergillus oryzae*. I. Kieckbusch, Theo Guenter. II. Título.

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

CDD-660

MARIA CAROLINA PEREIRA GONÇALVES

**IMOBILIZAÇÃO DE FRUTOSILTRANSFERASE MICROBIANA EM GEL DE
ALGINATO E SUA CARACTERIZAÇÃO PARA A 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: 19 de fevereiro de 2019

Profº. Theo Guenter Kieckbusch

Instituição: UNIFAL/MG

Assinatura:



Profº. Mariana Altenhofen da Silva

Instituição: UFSCar/SP

Assinatura:



Profº. Giselle Patrícia Sancinetti

Instituição: UNIFAL/MG

Assinatura:



RESUMO

Frutooligossacarídeos (FOS) são moléculas de sacarose contendo unidades frutossil ligadas pela posição β (2 \rightarrow 1). Esses prébióticos são edulcorantes com baixo poder calórico muito utilizados em formulações na indústria de alimentos e farmacêutica. A obtenção de FOS via rota enzimática, utilizando a sacarose como substrato e enzimas de origem microbiana denominadas frutossiltransferases (FTases) vem sendo estudada pelo IPT (São Paulo), que utiliza cepas do fungo *Aspergillus oryzae* para a obtenção do extrato micelial. Pesquisas em andamento no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL, em conjunto com o IPT, utilizam esses extratos para avaliar e otimizar a produção de FOS. A presente proposta visa complementar essas investigações, através da imobilização do extrato micelial previamente reticulado com glutaraldeído por meio de aprisionamento em esferas de alginato de cálcio ou de bário. Inicialmente foram avaliadas as condições de obtenção das esferas como formulação, tipo de alginato, nível de dispersão mecânica do micélio, grau de reticulação e seus reflexos sobre características do material obtido (diâmetro e aparência das esferas, resistência mecânica, estabilidade na estocagem). A otimização das condições de aprisionamento se baseou na atividade enzimática sob condições padrão de reação e foi complementada conduzindo a reação de transfrutossilacção em batelada, sob diferentes temperaturas, pHs, concentrações de substrato e com o reuso das esferas. A condição de imobilização que proporcionou os mais altos rendimentos de FOS utilizou o alginato de baixa viscosidade (4,0% m/m) reticulado com cloreto de cálcio na concentração de 0,2 mol.L⁻¹, e com as esferas de menor diâmetro. Essas condições ótimas geraram partículas mais esféricas, homogêneas, porosas e sem rachaduras na superfície, com maior resistência à compressão mecânica e maior estabilidade com relação ao tempo de estocagem a 4°C. A temperatura de 50 °C, o pH de 5,5 e a concentração de substrato de 400 g.L⁻¹ forneceram as máximas atividades de transfrutossilacção (A_{TS}) e seletividades. Os valores de A_T encontrados com o biocatalisador reticulado com glutaraldeído, desintegrado e então imobilizado foram cerca de 70% maiores do que com a biomassa livre, não triturada. Os ensaios de estabilidade frente ao pH mostraram que a biomassa livre foi estável em uma faixa de pH entre 4,5 e 6,5, e o biocatalisador imobilizado na faixa de 5,5 a 7,5. Parâmetros termodinâmicos indicaram que a imobilização da biomassa proporcionou um aumento da termoestabilidade. A aplicação do biocatalisador em ensaios de estabilidade operacional confirmou que a biomassa imobilizada permaneceu estável após seis ciclos de utilização, de 1 hora cada, com uma atenuação de apenas 4% da atividade inicial, enquanto que a taxa de degradação da atividade do biocatalisador livre era de cerca de 10% por ciclo. Em ciclos de esgotamento total da sacarose no meio reacional (4 horas) a biomassa imobilizada reteve 92% de sua atividade inicial até o terceiro ciclo, enquanto que com a biomassa livre houve uma queda constante de 15% na A_T por ciclo de uso. Com relação à cinética da reação enzimática, o modelo de Hill ajustou-se de maneira mais satisfatória aos dados do que o modelo de Michaelis-Menten (MM), havendo uma redução no valor de K_m (MM) e de $K_{0,5}$ (Hill) e um aumento na velocidade máxima de reação ao utilizar o biocatalisador imobilizado em relação à biomassa livre. O conjunto de todos esses ganhos expressivos evidencia a potencialidade da aplicação da FTase micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301 na produção de FOS após a reticulação do micélio com glutaraldeído e de seu envolvimento por alginato de cálcio.

Palavras-chave: Biopolímeros. Suportes de catalisadores. Oligossacarídeos. Transferases. *Aspergillus oryzae*.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are sucrose molecules containing fructosyl units linked by β (2 \rightarrow 1) position. These prebiotics are low calorie sweeteners widely used in formulations in food and pharmaceutical industry. Obtaining FOS via enzymatic route with sucrose as substrate and enzymes of microbial origin called fructosyltransferases (FTases), has been studied by IPT (São Paulo), using strains of the fungus *Aspergillus oryzae* to obtain the mycelial extract. Researches in progress at the Bioprocess Laboratory (UNIFAL), along with IPT, use these extracts to evaluate and optimize the FOS production. The present proposal aims to complement these investigations by the immobilization of the mycelial extract previously crosslinked with glutaraldehyde by entrapment in calcium or barium alginate beads. Initially, beads production conditions, like formulations, level of mechanical dispersion of the mycelium, type of alginate degree of crosslinking and characteristics of the material (diameter and aspect of the beads, mechanical strength, stability at storage) were evaluated. The optimization of the entrapment conditions was based on enzymatic activity under standard reaction conditions and was complemented by conducting the batch transfructosylation reaction under different temperatures, pHs, substrate concentrations and reuse of the spheres. The immobilization condition that produces the highest FOS yields used the low viscosity alginate (4.0% w/w) crosslinked with 0.2 mol.L⁻¹ calcium chloride and the smallest diameter beads. These optima conditions generated spherical beads, with homogeneous, porous and continuous surfaces, with larger resistance to mechanical compression and higher storage time stability at 4 °C. The temperature of 50 °C, pH of 5.5 and substrate concentration of 400 g.L⁻¹ provided the maximum transfructosylation activities (A_T s) and selectivity. The A_T values found with the glutaraldehyde crosslinked biocatalyst, disintegrated and then immobilized were about 70% larger than with the free, not dispersed biomass. pH stability tests showed that free biomass was stable in a pH range between 4.5 and 6.5, and the immobilized biocatalyst in the range of 5.5 to 7.5. The thermal stability analysis indicated that the immobilization of the biomass provided an increase in thermostability. Application of the biocatalyst in operational stability tests confirmed that immobilized biomass remained stable after six cycles of FOS production showing only 4% attenuation to initial activity, while the degradation rate of the free biocatalyst activity was about 10% per cycle. In cycles with total sucrose depletion (4 hours each), the immobilized biomass retained 92% of its initial activity until the third cycle, while using the free biomass resulted in a constant drop of about 15% in A_T per cycle. Regarding the kinetics of the enzymatic reaction, the Hill model fitted more satisfactorily to the data than the Michaelis-Menten (MM) model, with a reduction in the K_m (MM) and $K_{0.5}$ (Hill) values and an increase in the maximum reaction rate with immobilized biocatalyst in relation to the free biomass. The bulk of these expressive gains evidences the potential of the application of *Aspergillus oryzae* IPT-301 mycelial FTase in FOS production after crosslinking the mycelium with glutaraldehyde and its involvement in calcium alginate beads.

Keywords: Biopolymers. Supports of catalysts. Oligosaccharides. Transferases. *Aspergillus oryzae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Fórmula estrutural dos frutooligosacarídeos: (A) kestose, (B) nistose e (C) β -frutofuranosilnistose.....	12
Figura 3.2 - Rota esquemática de produção de FOS.....	21
Figura 3.3 - Estruturas químicas dos principais componentes da reação enzimática de produção de FOS: (A) sacarose, (B) 1-kestose, (C) nistose, (D) neokestose e (E) neonistose.....	21
Figura 3.4 - Esquema da reação de transfrutossilacção.....	22
Figura 3.5 - Esquema da reação de hidrólise de sacarose ou de FOS.....	23
Figura 3.6 - Efeito da temperatura nas atividades hidrolítica (A_H) e de transfrutossilacção (A_T) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_T/A_H) tendo como substrato uma solução de sacarose 47,06 % (m/v) e utilizando tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,5.....	24
Figura 3.7 - Efeito do pH nas atividades hidrolítica (A_H) e de transfrutossilacção (A_T) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_T/A_H) tendo como substrato uma solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C e utilizando tampão tris acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,5.....	25
Figura 3.8 - Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas por meio do processo de reticulação, na ausência de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) atomização; e (d) reticulação direta.....	30
Figura 3.9 - Mecanismos de reação do glutaraldeído com proteínas: 1 – Base de Schiff; 2 – Adição de Michael.....	31
Figura 3.10 - Estrutura do: (a) ácido β -D-manurônico, (b) ácido α -L-gulurônico e (c) Alginato.....	34
Figura 3.11 - Desenho esquemático do modelo “caixa de ovos” para alginato de cálcio.....	35
Figura 4.1 - Visão geral da metodologia empregada na obtenção e caracterização das esferas de alginato contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído.....	41
Figura 4.2 - Sistema de gotejamento da solução de alginato contendo a biomassa previamente reticulada com glutaraldeído sobre soluções de cloreto de cálcio ou de bário.....	45
Figura 4.3 - Bicos de gotejamento empregados no aprisionamento da biomassa previamente reticulada com glutaraldeído.....	46
Figura 4.4 - Esquema geral de amostragem.....	47
Figura 5.1 - Distribuição dos tamanhos dos filamentos da biomassa reticulada após	

	dispersão mecânica da solução de alginato com o Turrax® por 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 minutos (1000 rpm). Diâmetro das partículas em μm ; frequência em %.....	59
Figura 5.2 -	Morfologia da amostra sem moagem da biomassa reticulada.....	63
Figura 5.3 -	Morfologia da amostra de 0,5 minuto de moagem da biomassa reticulada.....	63
Figura 5.4 -	Morfologia da amostra de 1,0 minuto de moagem da biomassa reticulada.....	63
Figura 5.5 -	Morfologia da amostra de 1,5 minutos de moagem da biomassa reticulada.....	63
Figura 5.6 -	Morfologia da amostra de 2,0 minutos de moagem da biomassa reticulada.....	63
Figura 5.7 -	Atividades de transfrutossilação e hidrolítica da FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alginato de cálcio, e razões A_T/A_H , em função do tempo de dispersão em homogeneizador Turrax®.....	64
Figura 5.8 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilação e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. B.V. (4% m/m) utilizando biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$).....	68
Figura 5.9 -	Fotografia de esferas de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	69
Figura 5.10 -	Resistência mecânica das esferas de alg. B.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de cálcio.....	70
Figura 5.11 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilação e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando a biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$).....	71
Figura 5.12 -	Fotografia de esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	72
Figura 5.13 -	Resistência mecânica das esferas de alg. M.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de cálcio.....	73
Figura 5.14 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilação e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. B.V. (4% m/m) utilizando biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre	

não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U.g}^{-1}$).....	74
Figura 5.15 - Fotografia de esferas de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75
Figura 5.16 - Resistência mecânica das esferas de alg. B.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de bário.....	76
Figura 5.17 - Atividades enzimáticas de transfrutossilacção e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U.g}^{-1}$).....	77
Figura 5.18 - Fotografia de esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	77
Figura 5.19 - Resistência mecânica das esferas de alg. M.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de bário.....	78
Figura 5.20 - Atividades enzimáticas de transfrutossilacção (A_T) e hidrolítica (A_H) e razões A_T/A_H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alg. B.V. (4,0% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64 \text{ U.g}^{-1}$).....	80
Figura 5.21 - Atividades enzimáticas de transfrutossilacção (A_T) e hidrolítica (A_H) e resistências à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. B.V. (4,0% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas.....	81
Figura 5.22 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 50 vezes).....	83
Figura 5.23 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 200 vezes).....	83
Figura 5.24 - Micrografia MEV da fratura da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 50 vezes).....	84
Figura 5.25 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo	

a biomassa reticulada após a condução da reação enzimática, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 200 vezes).....	85
Figura 5.26 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) sem a carga de biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 40 vezes).....	85
Figura 5.27 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) sem a carga de biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 100 vezes).....	86
Figura 5.28 - Micrografia MEV da fratura da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) sem a carga de biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 40 vezes).....	86
Figura 5.29 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 30 vezes).....	87
Figura 5.30 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 40 vezes).....	88
Figura 5.31 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 200 vezes).....	89
Figura 5.32 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 50 vezes).....	90
Figura 5.33 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 200 vezes).....	91
Figura 5.34 - Atividades de transfrutossilção e hidrolíticas e razões A_T/A_H da biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alg. B.V. (4,0% m/m) utilizando $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de CaCl_2 (a); alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de CaCl_2 (b); alg. B.V. (4,0% m/m) utilizando $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de BaCl_2 (c); alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de BaCl_2 (d); em função do tempo de estocagem das esferas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilizando o bico	

de gotejamento de 0,7 mm (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64 \text{ U.g}^{-1}$).....	92
Figura 5.35 - Atividade remanescente da FTase micelial livre submetida a diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C) por 1, 2, 4, 6, 20 e 24 horas.....	94
Figura 5.36 - Atividade remanescente da FTase micelial reticulada aprisionada submetida a diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C) por 1, 2, 4, 6, 20 e 24 horas.....	95
Figura 5.37 - Ajuste linear para a determinação da constante de desnaturação térmica (K_D) da FTase micelial livre.....	96
Figura 5.38 - Ajuste linear para a determinação da constante de desnaturação térmica (K_D) da FTase micelial imobilizada.....	97
Figura 5.39 - Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desnaturação térmica (E_D) da FTase micelial livre e imobilizada.....	98
Figura 5.40 - Estabilidade da FTase micelial livre e reticulada aprisionada sob diferentes pHs após 24 horas de incubação em soluções tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , a 4 °C.....	102
Figura 5.41 - Estabilidade operacional dos biocatalisadores livre e imobilizado ao longo de 12 ciclos de uso, totalizando 12 horas de reação de transfrutossilação. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L ⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5, a 50 °C.....	104
Figura 5.42 - Estabilidade operacional dos biocatalisadores livre e imobilizado ao longo de 5 ciclos de uso, de 4 horas cada, totalizando 20 horas de reação de transfrutossilação. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L ⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5, a 50 °C.....	106
Figura 5.43 - Efeito da temperatura nas atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L ⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,5.....	107
Figura 5.44 - Efeito da temperatura nas atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato de cálcio. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L ⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,5.....	108
Figura 5.45 - Efeito do pH nas atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L ⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , a 50 °C.....	110
Figura 5.46. - Efeito do pH nas atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato de cálcio. Meio reacional constituído por	

	solução de sacarose 400 g.L ⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , a 50 °C.....	111
Figura 5.47 -	Efeito da concentração de substrato nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica e na razão A _T /A _H da FTase micelial livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5, a 50 °C.....	112
Figura 5.48 -	Efeito da concentração de substrato nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica e na razão A _T /A _H da FTase micelial imobilizada (reticulada + aprisionada), utilizando alg. B.V., 0,2 mol.L ⁻¹ de cloreto de cálcio e bico de gotejamento de 0,7 mm na obtenção das esferas. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5, a 50 °C.....	113
Figura 5.49 -	Comparação dos resultados obtidos experimentalmente e previstos pelos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill com a FTase micelial livre.....	115
Figura 5.50 -	Comparação dos resultados obtidos experimentalmente e previstos pelos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill com a FTase micelial imobilizada (reticulada e aprisionada em gel de alg. B.V. com 0,2 mol.L ⁻¹ de CaCl ₂ e utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm na obtenção das esferas).....	115
Figura A.1 -	Espectro de absorção para a quantificação de glicose (GOD-PAP) após a reação enzimática de obtenção de FOS utilizando a biomassa livre e imobilizada.....	134
Figura A.2 -	Espectro de absorção para a quantificação de açúcares redutores (DNS) após a reação enzimática de obtenção de FOS utilizando a biomassa livre e imobilizada.....	134
Figura B.1 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilação (A _T) e hidrolítica (A _H) e razões A _T /A _H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de CaCl ₂ .2H ₂ O (0,5 mol.L ⁻¹), em função dos diâmetros das esferas (A _T biomassa livre não dispersada: 504,89 ± 81,64 U.g ⁻¹).....	135
Figura B.2 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilação (A _T) e hidrolítica (A _H) e razões A _T /A _H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com Alg. B.V. (4,0% m/m) reticulada por imersão em solução de BaCl ₂ .2H ₂ O (0,01 mol.L ⁻¹), em função dos diâmetros das esferas (A _T biomassa livre não dispersada: 504,89 ± 81,64 U.g ⁻¹).....	135
Figura B.3 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilação (A _T) e hidrolítica (A _H) e razões A _T /A _H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de BaCl ₂ .2H ₂ O (0,05 mol.L ⁻¹), em função dos diâmetros das esferas (A _T biomassa livre não dispersada: 504,89 ± 81,64 U.g ⁻¹).....	136

Figura C.1 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilção (A_T) e hidrolítica (A_H) e resistências à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas.....	137
Figura C.2 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilção (A_T) e hidrolítica (A_H) e resistências à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. B.V. (4,0% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas.....	137
Figura C.3 -	Atividades enzimáticas de transfrutossilção (A_T) e hidrolítica (A_H) e resistências à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas.....	138
Figura D.1 -	Concentrações de FOS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ao longo do tempo de condução da reação enzimática, em horas, obtidas com o biocatalisador livre...	139
Figura D.2 -	Concentrações de FOS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ao longo do tempo de condução da reação enzimática, em horas, obtidas com o biocatalisador reticulado com glutaraldeído e aprisionado em alg. B.V. (4,0% m/m) reticulado por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm na obtenção das esferas.....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Micro-organismos produtores de FTase E.C. 2.4.1.....	19
Tabela 4.1 - Composição das soluções/suspensões de alimentação do sistema de envolvimento da biomassa em alginato de sódio.....	44
Tabela 4.2 - Diâmetros e frequências de gotejamento das esferas de alginato utilizando-se diferentes diâmetros do orifício do bico de gotejamento e alginatos de baixa e média viscosidade.....	46
Tabela 5.1 - Teor de massa seca no micélio úmido da biomassa livre, reticulada com glutaraldeído, livre aprisionada e na biomassa reticulada com glutaraldeído, aprisionada em gel de alginato de baixa viscosidade.....	58
Tabela 5.2 - Diâmetros médios de partículas: mediana (D_{50}) e decis (D_{10} a D_{90}) característicos da distribuição de tamanhos de filamentos da biomassa reticulada após dispersão mecânica da solução de alginato com o Turrax [®] por 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 minutos (1000 rpm).....	61
Tabela 5.3 - Atividades enzimáticas (transfrutossilatação e hidrolítica) das biomassas livre e imobilizada por diferentes métodos. Reação enzimática: Temperatura de 50 °C, pH de 5,5 e concentração de substrato de 400 g.L ⁻¹	65
Tabela 5.4 - Atividades de transfrutossilatação e hidrolíticas, razões A_T/A_H e forças de resistência à compressão mecânica obtidas nas condições ótimas de reticulação, com os alginatos de baixa e média viscosidade.....	79
Tabela 5.5 - Atividades de transfrutossilatação e hidrolíticas, razões A_T/A_H e forças de resistência à compressão mecânica obtidas nas condições ótimas de reticulação e dos diâmetros médios, com os alginatos de baixa e média viscosidade.....	82
Tabela 5.6 - Equações de reta e valores de R^2 para os dados das Figuras 5.36 e 5.37.....	98
Tabela 5.7 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a FTase micelial livre e imobilizada, incubada em diferentes temperaturas.....	99
Tabela 5.8 - Coeficientes de determinação de erros obtidos com diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial livre e imobilizada.....	116
Tabela 5.9 – Parâmetros cinéticos obtidos com a FTase micelial livre.....	116
Tabela 5.10 – Parâmetros cinéticos obtidos com a FTase micelial imobilizada.....	116

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS).....	12
3.2	ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE (FTASE).....	18
3.3	PRODUÇÃO DE FOS E MECANISMO DE REAÇÃO.....	20
3.4	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	22
3.4.1	Atividade de transfrutossilação.....	22
3.4.2	Atividade hidrolítica.....	22
3.4.3	Razão A_T/A_H	23
3.5	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	23
3.5.1	Efeitos da temperatura na cinética enzimática.....	23
3.5.2	Efeitos do pH na cinética enzimática.....	24
3.6	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	26
3.6.1	Imobilização da enzima FTase.....	27
3.7	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	28
3.7.1	Reticulação (<i>cross-linking</i>).....	29
3.7.1.1	Reticulação com glutaraldeído.....	30
3.7.2	Aprisionamento (<i>entrapment</i>).....	32
3.7.2.1	Agente promotor do aprisionamento: alginato.....	33
3.8	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM ALGINATO.....	36
3.8.1	Imobilização da FTase em alginato.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	MATERIAIS.....	42
4.1.1	Alginatos.....	42
4.1.2	Agentes reticulantes.....	42
4.1.3	Substrato.....	42
4.1.4	Outros reagentes.....	42
4.2	METODOLOGIA EMPREGADA.....	41
4.2.1	Produção de frutossiltransferase micelial.....	42

4.2.1.1	Microorganismo e condições de cultivo.....	42
4.2.1.2	Meio de cultura.....	42
4.2.1.3	Cultivo submerso aeróbio.....	42
4.2.2	Reticulação e imobilização da FTase.....	43
4.2.2.1	Reticulação da biomassa celular (micélio) com glutaraldeído.....	43
4.2.2.2	Imobilização da biomassa celular com alginato de sódio.....	43
4.2.2.3	Preparo da suspensão de biomassa.....	44
4.2.2.4	Obtenção de esferas gelificadas de alginato.....	44
4.2.3	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	47
4.2.3.1	Condução da reação enzimática.....	48
4.2.3.2	Determinação da concentração de açúcares redutores.....	49
4.2.3.3	Determinação da concentração de glicose.....	50
4.2.4	Distribuição e morfologia de tamanho dos filamentos do micélio.....	51
4.2.5	Caracterização das esferas de ftase imobilizada.....	51
4.2.5.1	Aspecto visual.....	52
4.2.5.2	Diâmetro médio das esferas.....	52
4.2.5.3	Propriedades mecânicas.....	52
4.2.5.4	Morfologia das esferas.....	52
4.2.5.5	Estabilidade da FTase armazenada a 4 °C.....	53
4.2.5.6	Estabilidade térmica da FTase e determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos.....	53
4.2.5.7	Estabilidade da FTase armazenada sob diferentes pHs.....	55
4.2.5.8	Estabilidade operacional em reciclagem da enzima livre e imobilizada.....	55
4.2.6	Efeito das condições de reação na produção de FOS.....	55
4.2.6.1	Efeito da temperatura do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica.....	56
4.2.6.2	Efeito do pH do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica.....	56
4.2.6.3	Influência da concentração de substrato e determinação dos parâmetros cinéticos.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1	TEOR DE MASSA SECA NO MICÉLIO ÚMIDO LIVRE E IMOBILIZADO.....	58
5.2	DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DE TAMANHO DOS FILAMENTOS	

	DO MICÉLIO.....	58
5.3	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS BIOMASSA LIVRE E IMOBILIZADA.....	64
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE FTASE IMOBILIZADA....	67
5.4.1	Efeito da concentração do cátion reticulante.....	67
5.4.1.1	Agente reticulante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	67
5.4.1.2	Agente reticulante $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	73
5.4.2	Efeito do diâmetro médio das esferas de alginato.....	79
5.4.3	Morfologia das esferas.....	82
5.4.3.1	Agente reticulante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	82
5.4.3.2	Agente reticulante $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	88
5.4.4	Estabilidade da FTase armazenada a 4 °C.....	91
5.4.5	Estabilidade térmica da FTase e determinação de parâmetros termodinâmicos.....	93
5.4.6	Estabilidade da FTase armazenada sob diferentes pHs.....	101
5.4.7	Estabilidade operacional em reciclagem da enzima livre e imobilizada..	103
5.5	EFEITO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FOS.	107
5.5.1	Efeito da temperatura do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica.....	107
5.5.2	Efeito do pH do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica.....	107
5.5.3	Influência da concentração de substrato do meio reacional nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica e determinação dos parâmetros cinéticos.....	107
6	CONCLUSÕES.....	118
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	119
	REFERÊNCIAS.....	120
	APÊNDICES.....	134

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, em atenção as atuais exigências do mercado, as indústrias biotecnológicas têm buscado o aprimoramento da produtividade enzimática e o desenvolvimento de novas técnicas para aumentar a vida útil dos biocatalisadores. Esses requisitos são essenciais para facilitar a produção em larga escala e promover o progresso econômico (GONÇALVES et al., 2018). Esses fatores tornam o desenvolvimento de processos enzimáticos uma alternativa atraente para a aplicação em diversos seguimentos, como na produção de antibióticos e biodiesel, na indústria de alimentos, na biorremediação e na aplicação em biossensores, o que pode justificar a expansão do mercado consumidor global de enzimas. Assim, a tecnologia enzimática é destaque, entre outros processos, na obtenção de produtos de alto valor agregado (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

Pensando nisso, a viabilização da produção de açúcares como os frutooligossacarídeos (FOS) via rota enzimática, utilizando a sacarose como substrato e enzimas de origem microbiana denominadas frutossiltransferases (FTases) (E.C. 2.4.1.9) (CHIEN; LEE; LIN, 2001), se apresenta como uma alternativa altamente atrativa para a substituição parcial dos açúcares comuns utilizados atualmente.

Os frutooligossacarídeos são oligômeros de frutose constituídos, principalmente, por kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose, cujas unidades frutossil estão ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose (YUN, 1996). Esses açúcares, de baixo valor calórico, são classificados como prebióticos e apresentam diversas propriedades benéficas à saúde humana (HIRAYAMA; NISHIZAWA; HIDAKA, 1993). Eles podem ser consumidos por diabéticos, não são cariogênicos, auxiliam na eliminação de microrganismos patogênicos e na prevenção do câncer de cólon. Esses oligômeros apresentam cerca de 40 a 60% do poder edulcorante da sacarose, sendo usados frequentemente pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos como açúcares funcionais (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Os FOS não são produzidos industrialmente no Brasil, sendo o seu uso dependente de importação. O país carece de tecnologia capaz de produzi-los a baixo custo, em larga escala e com rendimentos satisfatórios, visto que o alto custo para a produção da enzima microbiana ainda torna o processo biotecnológico economicamente inviável para a obtenção de FOS em escala comercial (MUSSATO; TEIXEIRA, 2009).

A imobilização da FTase se apresenta como uma alternativa viável para a aplicação industrial dessa enzima, com o objetivo de intensificar a produção de FOS. A imobilização consiste no processo de fixação da enzima em um suporte, preservando sua atividade catalítica (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). O uso de biocatalisadores imobilizados torna possível a sua utilização em processos contínuos, além de eliminar a necessidade de separação entre as enzimas e os produtos obtidos. Essa técnica também permite o reaproveitamento do material, a utilização do complexo enzima-suporte em diferentes solventes, pHs e temperaturas e, principalmente, reduz os custos de operação. Tais características possibilitam uma grande vantagem operacional quando comparado ao uso das enzimas livres (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

As enzimas imobilizadas se encontram associadas a um suporte ou matriz. Dentre estes suportes, o alginato, um polissacarídeo linear que tem como principal fonte a parede celular de algas marinhas marrons (classe *Phaeophyceae*), é um dos mais utilizados (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997). A sua estrutura é constituída por resíduos do ácido α -L-gulurônico (blocos G) e ácido β -D-manurônico (blocos M) (DONATI et al., 2005). Uma das principais propriedades do alginato é a sua capacidade de formar géis termoestáveis na presença de cátions divalentes, principalmente o cálcio. No procedimento de imobilização de enzimas por aprisionamento em gel de alginato ocorre o envolvimento das células numa rede tridimensional de alginato ionicamente reticulada (SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 1990).

Portanto, propõe-se no presente trabalho, desenvolver um processo de imobilização da enzima FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato de sódio empregando como agentes reticulantes o cloreto de cálcio e o cloreto de bário, bem como realizar a caracterização e avaliação do reuso da biomassa imobilizada, visando obter o biocatalisador com elevada produtividade e estabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe estudar a imobilização da enzima frutossiltransferase (FTase) microbiana micelial de *Aspergillus oryzae* IPT 301 por reticulação com glutaraldeído e aprisionamento em gel de alginato de cálcio ou bário, bem como a sua caracterização, tanto na forma livre quanto imobilizada, visando obter altos rendimentos de produção de frutooligossacarídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o objetivo geral ser atingido, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- a) Imobilizar a FTase micelial de *Aspergillus oryzae* IPT 301 por reticulação do micélio livre com glutaraldeído seguida de aprisionamento em gel de alginato de baixa e média viscosidade reticulado com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- b) Definir as condições ótimas de imobilização, avaliando a influência do agente reticulante do alginato utilizado e sua concentração, do diâmetro das esferas e do tipo de alginato empregado;
- c) Caracterizar a biomassa livre e imobilizada quanto à estabilidade térmica e pH de incubação, bem como avaliar os efeitos de temperatura, pH e concentração de substrato nas atividades de transfrutossilção (A_T) e hidrolítica (A_H);
- d) Avaliar parâmetros cinéticos e termodinâmicos do biocatalisador livre e imobilizado;
- e) Avaliar a estabilidade operacional da biomassa livre e imobilizada mediante a quantificação do reuso do biocatalisador.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Os frutooligossacarídeos (FOS) são constituídos por kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose, cujas unidades frutose estão ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) na molécula de sacarose (CHEN; LIU, 1996; ROMANO et al., 2016). A Figura 3.1 apresenta a estrutura molecular desses oligossacarídeos.

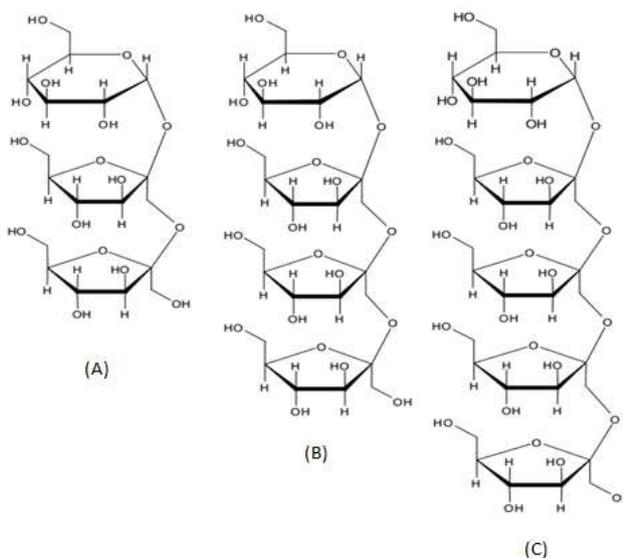


Figura 3.1 - Fórmula estrutural dos frutooligossacarídeos: (A) kestose, (B) nistose e (C) β -frutofuranosilnistose. Fonte: CUNHA, 2017.

Os FOS apresentam ocorrência natural em plantas como chicória, cebola, trigo, cevada, aspargos e alcachofra de Jerusalém. Esses açúcares também podem ser obtidos pela ação catalítica de enzimas que exibem atividade de transfrutoseilação, utilizando sacarose como substrato. Os biocatalisadores empregados na produção de FOS são a frutoseiltransferase (FTase) e a β -frutofuranosidase (FFase) (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988), as quais são encontradas naturalmente ou podem ser sintetizadas por microrganismos, como *Aureobasidium sp.* e *Aspergillus sp.* (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

Os frutooligossacarídeos são classificados como alimentos funcionais, uma vez que sua utilização traz inúmeros benefícios para a saúde humana (DOMINGUEZ et al., 2014). Por serem metabolizados em ácidos graxos de cadeia curta, promovem a redução do pH ao atingir o cólon, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos e auxiliando na prevenção do câncer de cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Esses

açúcares podem ser consumidos por diabéticos, pois apresentam baixo valor calórico (2,0 kcal/g) e baixo índice glicêmico, não apresentando efeito no teor de glicose sanguíneo do tipo 2 (MABEL et al., 2008). Eles são amplamente utilizados na indústria alimentícia, apresentando cerca de 40 a 60% do poder edulcorante da sacarose. Além disso, os FOS não são cariogênicos, favorecem o aumento da absorção de cálcio e magnésio pelo organismo e atuam na redução do colesterol e fosfolípidios no sangue (ROBERFROID; DELZENNE, 1998, BALI et al., 2015).

Os FOS apresentam maiores estabilidade térmica, viscosidade em solução e higroscopia do que a sacarose, e um sabor adocicado semelhante a esse açúcar. Por esse motivo eles são utilizados em produtos alimentícios como iogurtes, bebidas lácteas, sorvetes, biscoitos, produtos de panificação, bebidas funcionais como sucos e néctares frescos, molhos, balas mastigáveis infantis, em barras de cereais, em produtos alimentares para animais, dentre outros (YUN, 1996; BALI et al., 2015). Os FOS também podem ser utilizados como suplementos alimentares, provocando um aumento no conteúdo de fibras, sem alterar indesejavelmente as características organolépticas (FORTES; MUNIZ, 2009).

Devido a essa vasta gama de aplicações dos FOS, a necessidade de viabilizar a produção desses açúcares em larga escala se torna evidente, pois os elevados custos para a produção da FTase microbiana ainda impossibilitam a obtenção de FOS em escala comercial.

3.2 ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE (FTASE)

As enzimas são biocatalisadores de alta especificidade e, diferentemente dos catalisadores químicos convencionais (WANG et al., 2009), atuam em condições reacionais brandas, além de apresentarem alta atividade catalítica (KRAJEWSKA, 2004; WANG et al., 2017). De acordo com a Business Communications Company, em 2016, o valor de venda das enzimas para uso industrial foi estimado em 6 bilhões de dólares, com um crescimento anual da demanda global de 9,1% (SINGH et al., 2016b).

As enzimas frutossiltransferases (FTases) são glicoproteínas que contém 20 a 50% em massa de carboidratos em sua composição (HAYASHI et al., 1994). A primeira menção a esta enzima foi feita por Edelman e Bacon (1951) e a catalogação na Enzyme Commission (E.C. 2.4.1.9) foi efetivada em 1961. As FTases são amplamente utilizadas na produção de frutooligossacarídeos devido a sua ação catalítica (PASSOS; PARK, 2003), exibindo elevada atividade de transfrutosilação (A_T). Por outro lado, a FTase apresenta uma baixa afinidade pela água, o que resulta em baixas atividades hidrolíticas (A_H).

3.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE FRUTOSILTRANSFERASE

As FTases podem ser obtidas de origem vegetal ou microbiana. As FTases vegetais apresentam um baixo rendimento de conversão em FOS e sua produção é limitada por condições sazonais (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001). Dessa forma, a produção industrial de FOS depende majoritariamente de enzimas microbianas, que têm como fontes os microrganismos listados na Tabela 3.1 (BRENDA, 2016) e são produzidas por fermentação submersa (MUTANDA et al., 2014). Além disso, as FTases microbianas, diferentemente das vegetais, exibem tanto atividade hidrolítica quanto de transfrutossilacção (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; MUTANDA et al., 2014).

Tabela 3.1 - Microrganismos produtores de FTase E.C. 2.4.1.9.

Microrganismo	
<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus japonicus</i> FCL 119T	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121
<i>Aspergillus japonicus</i> JN19	<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.106
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> CW2.
<i>Aspergillus oryzae</i> CRF 202	<i>Leuconostoc citreum</i> CW28
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Myceliophthora heterothallica</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> KCCM12017	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-6
<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-7
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Penicillium citrinum</i> FERM P-15944
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>

Fonte: adaptado de BRENDA, 2016.

Dentre os microrganismos listados na Tabela 3.1, os mais investigados na produção de FOS são o *Aspergillus japonicus* e o *Aspergillus niger* (LATEEF et al., 2012; DORTA et al., 2006; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; SHEU et al., 2013; MUSSATTO; RODRIGUES; TEIXEIRA, 2009). Entretanto, o *Aspergillus oryzae* foi reconhecido como um microrganismo seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration* e tem sido utilizado na obtenção de diversos tipos de enzimas como amilases, celulasas, pectinases, glicosidases, lipases, proteases e peptidases (MARESMA et al., 2010).

Além disso, alguns artigos publicados relatam a produção de FOS empregando frutossiltransferases sintetizadas por *Aspergillus oryzae* (KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2002; 2004a; 2004b; 2005; CUERVO-

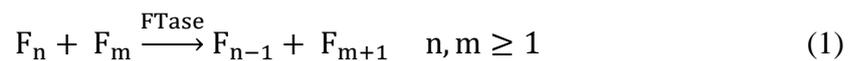
FERNÁNDEZ et al., 2007; MARESMA et al., 2010; OTTONI et al., 2012; MABEL et al., 2008).

Todas essas pesquisas determinaram os açúcares formados por HPLC, mas apenas Kurakake, Onoue e Komaki (1996) isolaram os diferentes componentes do FOS formados e observaram que o pH influencia nas quantidades relativas de kestose e nistose.

As frutossiltransferases obtidas de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresentaram elevadas atividades de transfrutossilacção e razões entre a atividade de transfrutossilacção e a atividade hidrolítica, o que faz com que esse microrganismo tenha grande potencial para aplicação industrial (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007).

3.4 PRODUÇÃO DE FOS E MECANISMO DE REAÇÃO

As enzimas microbianas responsáveis pela produção de FOS são a frutossiltransferase (FTase) ou a β -frutofuranosidase (FFase), as quais catalisam a transferência de uma unidade frutossil para uma molécula de sacarose em uma série de reações, onde uma molécula de sacarose ou FOS atua como doadora de frutossil (F_n) e outra como um receptor (F_m), resultando em uma mistura de FOS de diferentes comprimentos de cadeia, glicose e frutose como subprodutos e uma fração de sacarose não convertida durante a reação enzimática, como descrito no mecanismo de reação apresentado (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).



A rota da reação enzimática para a obtenção de FOS é mostrada na Figura 3.2 (LEE; SHINOHARA, 2001). A reação de hidrólise ocorre simultaneamente à reação de síntese e transferência. As estruturas químicas dos componentes dessa reação enzimática estão dispostas na Figura 3.3.

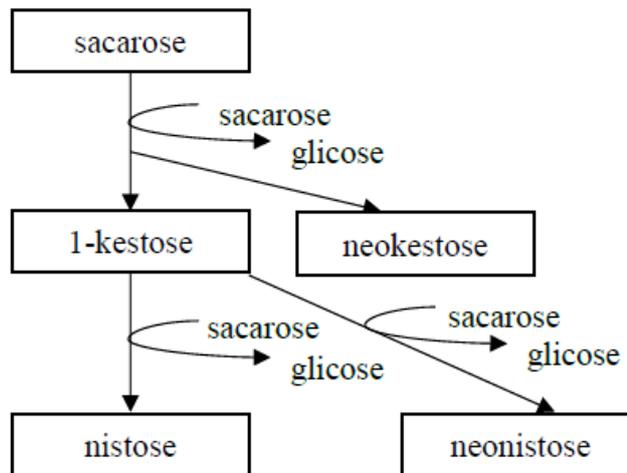


Figura 3.2 - Rota esquemática de produção de FOS.
 Fonte: Adaptado de LEE; SHINOHARA, 2001.

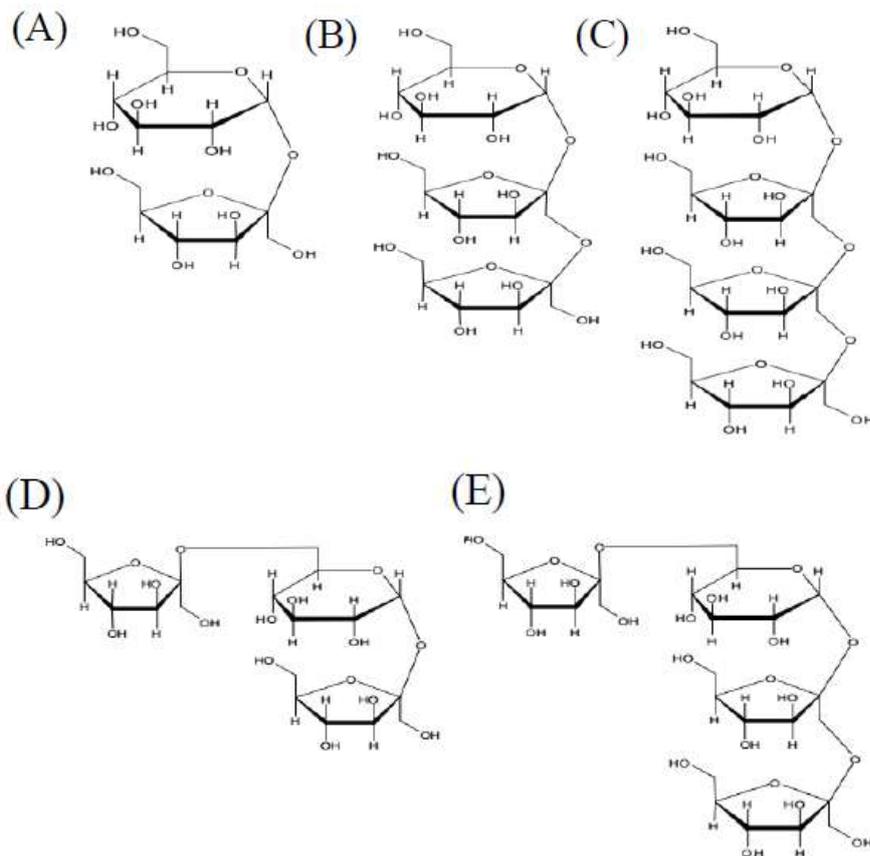


Figura 3.3 - Estruturas químicas dos principais componentes da reação enzimática de produção de FOS: (A) sacarose, (B) 1-kestose, (C) nistose, (D) neokestose e (E) neonistose.
 Fonte: Adaptado de CUNHA, 2017.

As FTases e FFases sintetizam frutooligossacarídeos com diferentes tipos de ligações glicosídicas e rendimentos, dependendo da concentração inicial de sacarose na mistura reacional (MUTANDA et al., 2014).

3.5 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.5.1 Atividade de transfrutossilção

A enzima FTase catalisa a reação de transferência de grupos frutossil entre moléculas de sacarose (Figura 3.4), clivando as ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1) e transferindo um grupo frutossil para uma nova molécula de sacarose ou outra molécula de FOS, liberando moléculas de glicose como subproduto no meio reacional e gerando moléculas de FOS com diferentes tamanhos de cadeia polimérica (GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013; MÁRQUEZ et al., 2016).

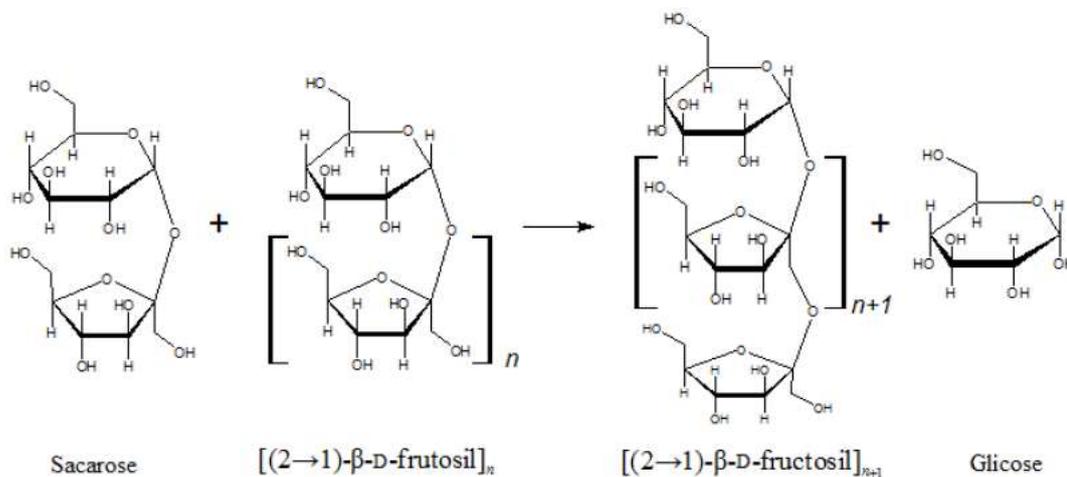


Figura 3.4 - Esquema da reação de transfrutossilção.
Fonte: CUNHA, 2017.

A FTase exibe, majoritariamente, atividade de transfrutossilção (A_T). Uma unidade de atividade enzimática de transfrutossilção é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um micromol (1 μmol) de FOS por minuto nas condições da reação (temperatura, pH e concentração de substrato) (GANAIE; GUPTA, 2014; OTTONI et al., 2012).

3.5.2 Atividade hidrolítica

A hidrólise da sacarose promove a liberação de glicose e frutose, que são monossacarídeos constituintes de sua estrutura (Figura 3.5). A β -frutofuranosidase, também conhecida como invertase, é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose e de FOS (WANG, 2015; SHULER, 2002).

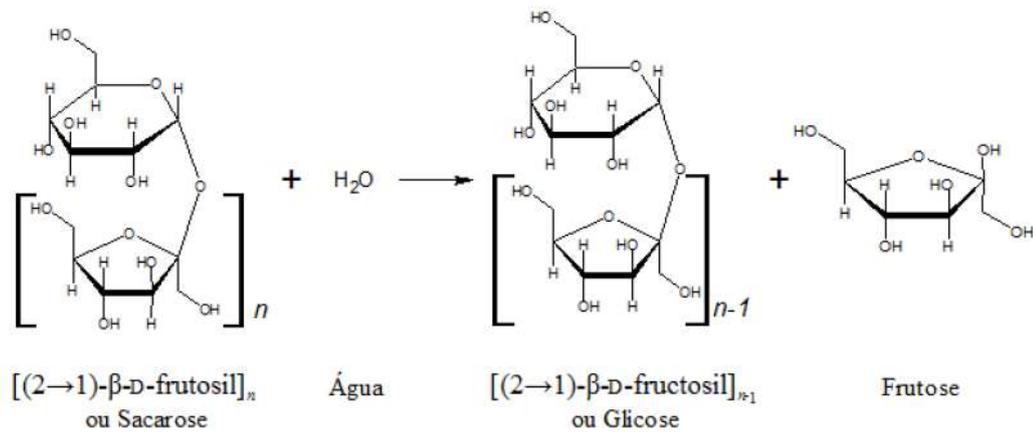


Figura 3.5 - Esquema da reação de hidrólise de sacarose ou de FOS.
 Fonte: CUNHA, 2017.

Define-se como atividade hidrolítica (A_H) a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um dos produtos da hidrólise da sacarose por minuto, a frutose, ou seja, uma unidade de atividade hidrolítica representa a quantidade de enzima que libera um micromol (1 μmol) de frutose por minuto (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012).

3.5.3 Razão A_T/A_H

A seletividade da reação, isto é, a razão entre a atividade de transfrutoseilação e a atividade hidrolítica, A_T/A_H , é um parâmetro relevante na determinação do rendimento da produção de FOS (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988). Razões elevadas revelam uma predominância da atividade de transfrutoseilação sobre a hidrolítica, isto é, um maior rendimento final em FOS. Para se obter uma produção eficiente de FOS, deve-se buscar utilizar a enzima (FTase) em condições operacionais que promovam a alta produtividade enzimática associada a razões A_T/A_H elevadas (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007).

3.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA

3.6.1 Efeitos da temperatura na cinética enzimática

Na biocatálise, a temperatura é um dos fatores que mais influenciam a cinética das reações enzimáticas, e, conseqüentemente, na atividade enzimática. Um aumento de temperatura provoca uma elevação na frequência e na energia dos choques entre as moléculas reagentes, aumentando assim a probabilidade de as moléculas reagirem, e resultando em um aumento na velocidade da reação. Ao se elevar a temperatura até certo ponto, a atividade é

melhorada, o que é dependente da estabilidade do biocatalisador (CARVALHO; CABRAL, 2000).

A elevação da temperatura atinge um ponto ótimo quando resulta em uma atividade máxima da enzima, a qual é denominada temperatura ótima. Para temperaturas superiores à temperatura ótima, o encaixe específico da enzima com o substrato é impedido e ocorre então a desnaturação enzimática. Com isso, o biocatalisador perde atividade gradativamente, devido a alterações nas ligações covalentes de sua estrutura proteica, o que gera mudanças conformacionais, como mostrado na Figura 3.6, para a enzima FTase micelial livre (CUNHA, 2017). Os blocos da Figura 3.6 deixam claro que a temperatura de 55 °C é a ótima. Embora 50 °C também resulte em altas conversões (A_T), a razão A_T/A_H é mais eficiente a 55 °C (CUNHA, 2017).

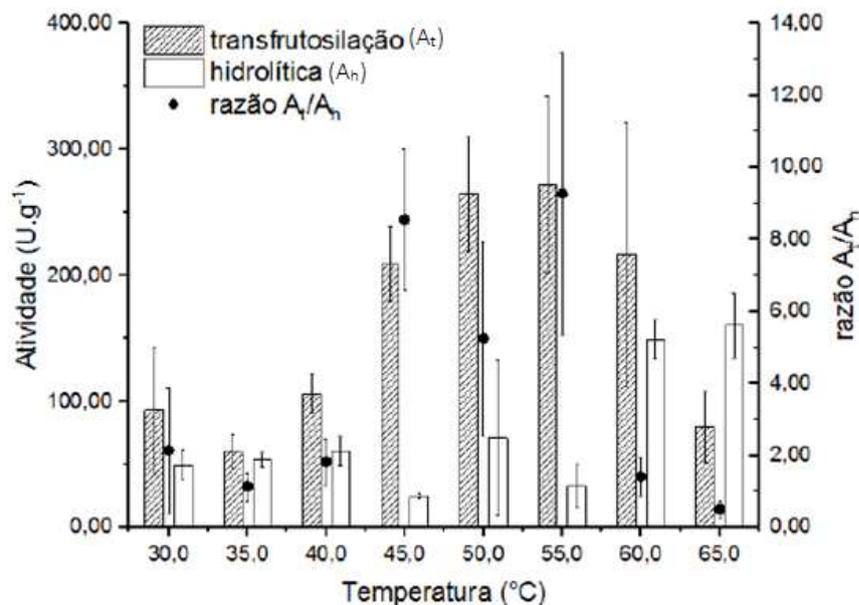


Figura 3.6 - Efeito da temperatura nas atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H) da FTase micelial livre, e na razão entre as atividades (A_T/A_H), tendo como substrato uma solução de sacarose 47,06% (m/v) e utilizando tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5.

Fonte: CUNHA, 2017.

3.6.2 Efeitos do pH na cinética enzimática

Nos sítios ativos das enzimas, as cadeias laterais dos aminoácidos podem atuar como ácidos ou bases fracas dependendo do estado de ionização em que se encontram, participando assim das interações que preservam a estrutura enzimática. Por essa razão, alterações de pH podem eliminar interações iônicas essenciais que mantêm a conformação ativa estável (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). Além disso, alterações no pH também afetam a

velocidade da reação enzimática e a afinidade entre a enzima e o substrato, nos casos em que o substrato contém grupos iônicos (BORZANI et al., 2001).

Para evitar tais mudanças na estrutura tridimensional proteica, deve-se trabalhar em um pH ótimo ou faixa ótima de pH, onde a velocidade da reação catalítica é máxima. Assim como no caso dos efeitos causados pela temperatura na cinética enzimática, a atividade dos biocatalisadores decresce em pHs maiores ou menores que o ótimo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014), o que é graficamente ilustrado na Figura 3.7, para a enzima FTase micelial livre (CUNHA, 2017). Os blocos da Figura 3.7 deixam claro que o pH 6,0 é o ótimo. Embora pHs de 4,5, 5 e 5,5 também resultem em altas conversões (A_T), a razão A_T/A_H é mais eficiente no pH de 6,0 (CUNHA, 2017).

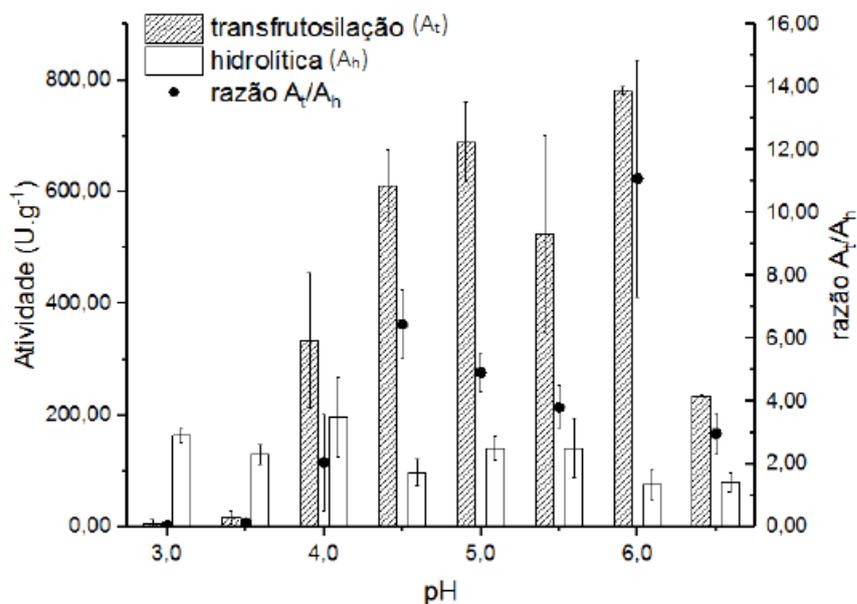


Figura 3.7 - Efeito do pH nas atividades de transfrutossilatação (A_T) e hidrolítica (A_H) da FTase micelial livre, e na razão entre as atividades (A_T/A_H), tendo como substrato uma solução de sacarose 47,06% (m/v) a 50 °C e utilizando tampão tris acetato 0,2 mol.L⁻¹.

Fonte: CUNHA, 2017.

Valores de pH extremos geralmente resultam em perda total da atividade enzimática, devido a desnaturação da enzima, e, portanto, o pH também é considerado como um fator de estabilidade desses biocatalisadores. Além disso, o pH afeta diretamente um dos parâmetros de Michaelis-Menten, a constante K_m , independentemente da velocidade máxima ($V_{máx}$) atingida (BENNETT; FRIEDEN, 1969; MARTINEK, 1969).

O pH ótimo de uma enzima é obtido experimentalmente e sua determinação é dependente do conhecimento das características dos sítios ativos da enzima em questão

(SHULER, 2002). Logo, para que uma reação enzimática seja confiável e reprodutível, cada um dos parâmetros abordados no Item 3.5 devem ser considerados e otimizados.

3.7 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O uso de enzimas na forma livre apresenta problemas relacionados à baixa estabilidade operacional, elevados custos, impossibilidade de reutilização da enzima e dificuldade na recuperação de produtos, entre outros fatores. Essas desvantagens dificultam a comercialização de produtos enzimáticos, mas podem ser minimizadas quando diferentes técnicas de imobilização são utilizadas (GONÇALVES et al., 2018; WANG et al., 2017). A imobilização de enzimas consiste no confinamento do biocatalisador em um suporte sólido insolúvel (KRAJEWSKA, 2004; KHOSLA et al., 2017) e apresenta algumas vantagens em relação ao uso de enzimas livres. Os benefícios obtidos pela imobilização enzimática incluem o aumento da estabilidade operacional, facilidade na separação de produtos e biocatalisadores (POLAKOVIC et al., 2017), implementação de processos enzimáticos contínuos (FERNANDEZ-ARROJO et al., 2013), a possibilidade de recuperação e reutilização dos biocatalisadores, a redução dos custos operacionais (FERNANDEZ-ARROJO et al., 2013) e a ausência do biocatalisador na corrente de produto (DICOSIMO et al., 2013).

Eficientes técnicas de imobilização dependem da combinação de fatores resultantes do processo, do catalisador empregado e do suporte para a imobilização (GONÇALVES et al., 2018; CANTONE et al., 2013). Nos últimos cinco anos, os artigos mais citados sobre “imobilização enzimática”, de acordo com a base de dados *Web of Science*, destacaram os principais biocatalisadores utilizados nesse processo, entre os quais se encontram a lactase (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; HOU et al., 2014), a glicose oxidase aplicada no desenvolvimento de biosensores (RAZMI; MOHAMMAD-REZAEI, 2013), a celulase, lipase, amilase, peroxidase (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014) e a glucuronidase (CHEN et al., 2013). Os principais suportes empregados no processo de imobilização foram a quitosana (ZHAI et al., 2013), estruturas mesoporosas (ZHOU; HARTMANN, 2013), nanopartículas e nanofibras (ARIGA et al., 2013), sílica (HWANG; GU, 2013; ZUCCA; SANJUST, 2014), silicatos, borossilicatos, aluminossilicatos, alumina, titânio e outros óxidos (ZUCCA; SANJUST, 2014), microesferas de alginato (HWANG; GU, 2013), grupos epóxi covalentes reativos em matriz hidrofóbica, além de suportes feitos sob medida por eletrodos (BARBOSA et al., 2013).

A imobilização de enzimas é considerada a técnica mais promissora para a aplicação desses biocatalisadores em escala industrial, com grande potencial de desenvolvimento e exploração (GONÇALVES et al., 2018; GANAIE et al., 2014b). No entanto, embora muitos métodos tenham sido descritos em patentes e publicações, poucos processos que empregam enzimas imobilizadas foram comercializados com sucesso (DICOSIMO et al., 2013).

De maneira geral, as enzimas imobilizadas, em comparação com as enzimas livres, têm melhor estabilidade térmica e ao pH, são facilmente separadas do produto final e podem ser reutilizadas continuamente. Após o processo de imobilização, os biocatalisadores passam a apresentar alterações na sua atividade enzimática e tempo de meia-vida, e a eficiência da imobilização depende das propriedades do suporte, da natureza enzimática e também das condições de imobilização (GONÇALVES et al., 2018; ALVARADO-HUALLANCO; MAUGERI-FILHO, 2010).

3.7.1 Imobilização da enzima FTase

A literatura científica registra diversas publicações relacionadas a imobilização da enzima FTase, tanto na forma extracelular quanto aderida ao micélio. Yun e Song (1996), realizaram a imobilização da FTase em uma resina de alta porosidade (Diaioa HPA 25[®]). Com os resultados, obteve-se um biocatalisador com maior resistência a variações de pH e com atividade de transfrutoseilação (A_T) similar à da enzima livre. Não houve alteração na temperatura e pH ótimos da enzima após o procedimento de imobilização. A FTase foi aplicada na produção contínua de FOS por até 30 dias com uma queda de apenas 8% da A_T inicial.

Chien, Lee e Lin (2001) estudaram a imobilização da FTase micelial de *Aspergillus japonicus* por encapsulamento em glúten. O biocatalisador foi utilizado em um reator de leito empacotado para a produção de FOS. Com a imobilização, foi observada uma redução da velocidade de reação de produção de FOS para cerca de 70% da velocidade catalisada pelo micélio livre. Este fato pode estar associado a possíveis limitações difusionais do substrato impostas pelo glúten. Em mais um estudo sobre a FTase de *Aspergillus japonicus*, desenvolvido por Mussatto, Rodrigues e Teixeira (2009), foi realizada a imobilização da enzima por absorção do micélio em diversos materiais (espuma de poliuretano, esponja de aço inoxidável, fibra vegetal, pedra-pomes, peneiras moleculares de zeólitas e espuma de vidro). A absorção micelial em fibra vegetal apresentou a maior produção de FOS, a qual foi similar à produção obtida com o micélio livre. Além disso, a imobilização também facilitou a separação entre o biocatalisador e o meio reacional e proporcionou um aumento da razão A_T/A_H (de 3,2 para 4,8).

Platková et al. (2006) estudaram o uso de suportes ativados de resinas comerciais de troca aniônica e transportadores de polimetacrilato na imobilização da FTase de *Aureobasidium pullulans*. Para isso, foram investigados os efeitos da imobilização por duas diferentes rotas, a ligação covalente direta entre os suportes ativados e a FTase e a ligação entre a FTase tratada previamente com glutaraldeído para a promoção da reticulação entre as enzimas e os suportes ativados. O uso do glutaraldeído não proporcionou melhorias operacionais em nenhum dos biocatalisadores estudados. Por outro lado, foi obtido um aumento da estabilidade de armazenamento do biocatalisador imobilizado diretamente em Amberlite IRA 900®.

Em pesquisas desenvolvidas por Onderková, Bryjak e Polakovič (2007), a FTase também de *Aureobasidium pullulans* foi imobilizada em um copolímero de acrilato de butila e dimetacrilato de etilenoglicol, tendo sido previamente reticulada com glutaraldeído. Após a imobilização, obteve-se um biocatalisador fisicamente estável, capaz de suportar até 11 ciclos de produção de FOS de 1 hora cada, sem grande queda na A_T . Castro et al. (2017) também estudaram a imobilização da FTase micelial de *Aureobasidium pullulans* em diversos suportes (subprodutos sintéticos, agroindustriais e minerais). A imobilização foi realizada por absorção do micélio durante a etapa de fermentação. Verificou-se que em todos os suportes empregados ocorreu a absorção da biomassa, com destaque para a espuma de poliuretano reticulado, fibra de poliéster e lã de fibra de vidro, que absorveram as maiores quantidades de células.

Por fim, Aguiar-Oliveira e Maugeri (2012) imobilizaram a FTase extracelular de *Rhodotorula sp.* em minério de nióbio por adsorção. Os resultados indicaram uma conversão do biocatalisador similar à da enzima livre, uma razão A_T/A_H de cerca de 1,6 e uma meia vida de 24 dias a 50 °C, viabilizando o reuso do biocatalisador na produção de FOS.

3.8 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

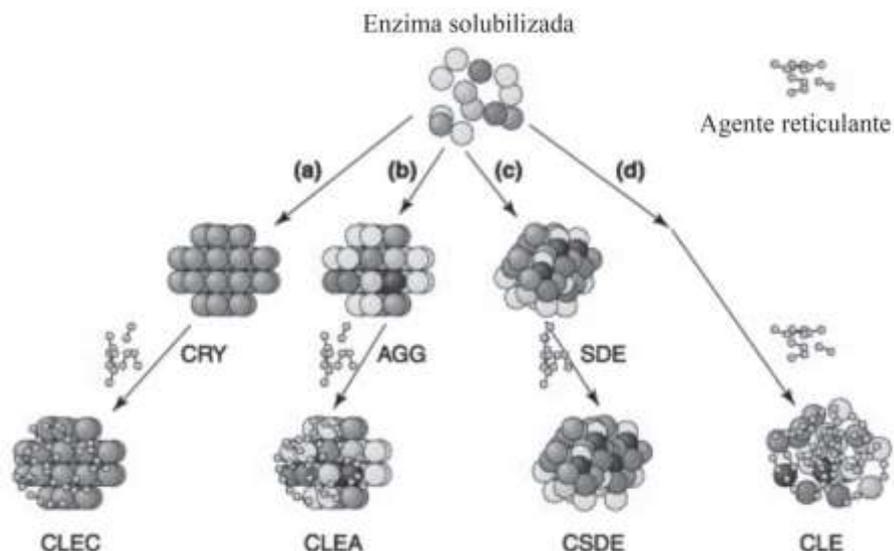
Atualmente existem diferentes técnicas de imobilização enzimática, as quais podem incluir o envolvimento ou o encapsulamento em matrizes poliméricas, a adsorção, a ligação covalente a uma matriz insolúvel ou a reticulação (MENDES et al., 2011; ILLANES et al., 2012). Cada enzima apresenta características físico-químicas próprias e o suporte empregado no processo de imobilização deve variar de acordo com tais especificidades. As condições operacionais ótimas obtidas após a imobilização estão relacionadas à estabilidade operacional, retenção da atividade enzimática e durabilidade do biocatalisador (KRAJEWSKA, 2004).

3.8.1 Reticulação (*cross-linking*)

A reticulação ou ligação cruzada de enzimas envolve a formação de ligações covalentes entre moléculas de proteínas promovidas por um agente bifuncional, o qual é conhecido como agente reticulante (MATEO et al., 2007; CRUZ et al., 2012). O reagente de reticulação tem a função de se ligar a grupos particulares de aminoácidos constituintes da enzima, por meio de suas extremidades reativas. Comercialmente, os agentes reticulantes podem ser classificados quanto a sua solubilidade e reatividade, quanto aos grupos integrantes de suas extremidades reativas, quanto à especificidade de seus grupos reativos, dentre outros aspectos (WONG; WONG, 1992; LA ROTTA HERNANDEZ et al., 2005). O glutaraldeído e bis (imidoésteres) são os agentes bifuncionais mais utilizados para promover a reticulação (DRIDI et al., 2015).

Na maioria das vezes, esse procedimento de imobilização enzimática não requer o uso de um suporte sólido, o que caracteriza uma das vantagens desse método, que é amplamente difundido (HUDSON; COONEY; MAGNER, 2008). Outras vantagens dessa técnica incluem a minimização da lixiviação do biocatalisador após a imobilização e a estabilização operacional da enzima, devido a presença de ligações covalentes, e também o baixo custo de produção em razão de não exigir o uso de um suporte. Em contrapartida, esse procedimento pode ocasionar a modificação química da proteína e problemas na transferência de massa com relação ao substrato e ao produto. Além disso, ele geralmente requer o uso de reagentes tóxicos sob condições experimentais complexas (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003; HARTMANN; KOSTROV, 2013).

Nesse mecanismo, os derivados imobilizados podem ser obtidos por meio de uma reação entre o agente reticulante e a enzima após pré-tratamentos distintos, tais como a solubilização (MANECKE, 1972), que resulta na formação de reticulados de enzima (*cross-linked enzyme – CLE*), a cristalização (ABRAHAM et al., 2004; ROY; ABRAHAM, 2006), que gera cristais de enzima reticulados (*cross-linked enzyme crystals – CLEC*), a atomização (AMOTZ, 1987), por meio da qual se obtém enzimas atomizadas reticuladas (*cross-linked spray-dried enzyme – CSDE*) e, por fim, a agregação (GUPTA et al., 2009; CRUZ et al., 2012), originando agregados enzimáticos reticulados (*cross-linked enzyme aggregates – CLEA*), como mostrado na Figura 3.8.



CRY - cristais de enzima; AGG - agregados enzimáticos; SDE - enzima atomizada; CLEC - cristais de enzima reticulados; CLEA - agregados enzimáticos reticulados; CSDE - enzimas atomizadas reticuladas; CLE - enzimas solubilizadas reticuladas.

Figura 3.8 - Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas por meio do processo de reticulação, na ausência de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) atomização; e (d) reticulação direta.

Fonte: SOUZA et al., 2016.

3.8.1.1 Reticulação com glutaraldeído

O glutaraldeído ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) é um reagente bifuncional com capacidade de polimerização (WALT; AGAYN, 1994; MIGNEAULT et al., 2004a), o qual foi utilizado inicialmente para preservar e fixar tecidos (CHEUNG et al., 1985; TALMAN; BOUGHNER, 1995), atuando como um agente reticulante. O glutaraldeído é muito empregado na reticulação de proteínas, na imobilização covalente (ZUCCA; SANJUST, 2014) e como ativador de suportes (LIU; MA; GAO, 2012; MATHAPATI et al., 2013). Na maioria dos casos, o glutaraldeído pode reagir com grupos amina primários de proteínas, e também com tióis, fenóis e imidazóis (WINE et al., 2007). Soluções aquosas concentradas de glutaraldeído (25% ou 50%) são facilmente obtidas comercialmente e a um baixo custo (JARZEŃSKI et al., 2007), as quais apresentam ao menos 13 formas diferentes (dependendo do pH, concentração e temperatura) (MIGNEAULT et al., 2004a).

Dois mecanismos são utilizados atualmente para descrever a reação do glutaraldeído com as proteínas, pois as suas principais espécies reativas encontram-se em equilíbrio entre suas conformações e cada estrutura pode reagir de maneira diferente com a proteína (WALT; AGAYN, 1994).

No primeiro mecanismo ocorre uma reação entre um aldeído bifuncional e moléculas aminadas, sob condições ácidas ou neutras, e os grupos aldeído do glutaraldeído reagem com

proteínas para a formação de bases de Schiff (Figura 3.9, reação 1), as quais muitas vezes são instáveis em condições ácidas, podendo ser rompidas, regenerando os grupos aldeído e amina novamente. Para estabilizar a base de Schiff em uma amina secundária, realiza-se a redução por borohidreto de sódio (NaBH_4) ou cianoborohidreto de sódio (NaBCNH_3) (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1995).

O segundo mecanismo envolve uma adição de Michael de um grupo amina (NH_2) à dupla ligação C-C, produzindo uma amina secundária estável (Figura 3.9, reação 2). Esses mecanismos de imobilização podem ser controlados, regulando a força iônica ou adicionando detergentes para evitar interações indesejadas e promover as desejadas (ZUCCA; SANJUST, 2014).

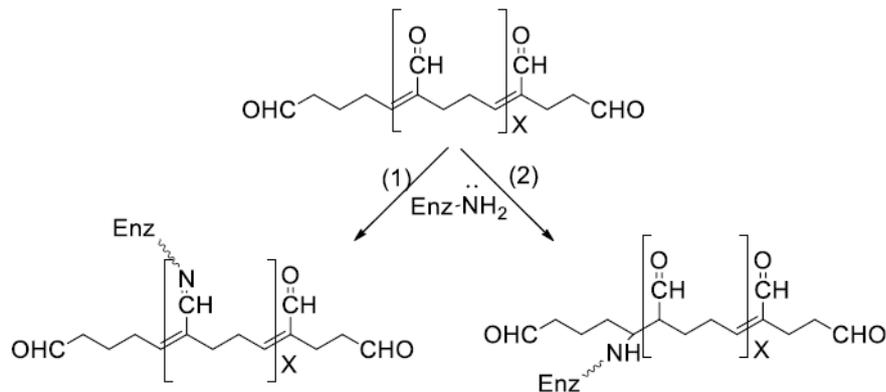


Figura 3.9 - Mecanismos de reação do glutaraldeído com proteínas: 1 – Base de Schiff; 2 – Adição de Michael. Fonte: BARBOSA et al., 2014.

A reticulação de enzimas com glutaraldeído têm apresentado grandes avanços no que diz respeito à melhoria da estabilidade e características catalíticas, como descrito para várias enzimas, tais como proteases (FERREIRA et al., 2003), oxidases (JUNG; STREB; HARTMANN, 2010; SINGH; ROYCHOUDHURY; JHA, 2016a), lipases (SANTOS et al., 2008; FORDE et al., 2010), peroxidases (PATEL et al., 2016; SOLA-RABADA et al., 2018), lactoferrinas (HONIKEL et al., 2018), imunoglobinas (HONIKEL et al., 2018), glucosidades (VAZQUEZ-ORTEGA et al., 2018), lacases (FANG et al., 2009; PATEL et al., 2016), acetilcolinesterases (POHANKA et al., 2011), hidantoinases (JIA et al., 2006), galactosidades (TANRISEVEN; DOGAN, 2002; NAGANAGOUDA; MULIMANI, 2006), tripsinas (MIGNEAULT et al., 2004b), glutaminases (WHITE et al., 1994), lisinas (TURNER; SEFTON, 1994), dentre outras.

3.8.2 Aprisionamento (*entrapment*)

No processo de imobilização enzimática por aprisionamento em géis ou fibras, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa e confinada no interior de uma estrutura (HODGSON et al., 2004). O aprisionamento não envolve ligações químicas entre o suporte e a proteína, isto é, o biocatalisador é somente confinado na rede tri-dimensional do suporte, possibilitando uma modificação mínima na estrutura original da proteína (ZUCCA; SANJUST, 2014). Tal fato representa uma vantagem do ponto de vista operacional, pois, nesse caso, a imobilização não promove a inativação ou a distorção do sítio ativo da proteína, não acarretando na perda de atividade enzimática, o que é observado com frequência em outras técnicas de imobilização (FERNANDEZ-ARROJO et al., 2013).

Existem dois tipos de contenção de enzimas, o envolvimento em matrizes porosas ou a contenção por barreiras. No primeiro caso ocorre o confinamento físico da proteína em uma matriz polimérica, cujos poros devem ser menores do que as dimensões das enzimas contidas no seu interior, impedindo o seu arraste, porém, permitindo o fluxo de substratos e produtos. Na contenção por barreiras as enzimas são apenas envoltas por uma membrana, permitindo a retenção de uma quantidade maior de proteínas em relação a imobilização em matrizes porosas. Nesse método também é imprescindível utilizar membranas que não dificultem o fluxo de substrato e produto, para que não sejam impostas limitações difusionais ao uso do biocatalisador (BORZANI et al., 2001).

Na maioria dos casos, as proteínas têm sido imobilizadas pela técnica sol-gel, por meio de microcápsulas, lipossomas, fibras e matrizes constituídas de diferentes materiais (MENDES et al., 2011; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). O confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando os efeitos de inativação, por exemplo, por solventes orgânicos (SOUZA et al., 2016).

Em contrapartida, suas principais desvantagens são o desprendimento de enzimas (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012) e problemas de transferência de massa envolvendo substratos e produtos (ZUCCA; SANJUST, 2014), os quais estão associados com o controle do tamanho dos poros do suporte (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; BRADY; JORDAAN, 2009). Isso pode ser minimizado pelo cruzamento prévio da enzima com um agente multifuncional (glutaraldeído) (FERNANDES, 2010) ou promovendo a reticulação da matriz após o envolvimento (ASSIS et al., 2004; FERNANDES, 2010). Outro inconveniente é que alguns materiais utilizados para a polimerização das matrizes podem inativar os biocatalisadores (HODGSON et al., 2004).

3.8.2.1 Agente promotor do aprisionamento: alginato

A seleção adequada do suporte a ser empregado no processo de imobilização é crucial para garantir o melhor desempenho da enzima imobilizada. Existem diversos materiais disponíveis para serem utilizados como suportes, e a sua escolha depende das características do biocatalisador e das condições de uso da proteína imobilizada (MILETIĆ et al., 2009).

O alginato é um biopolímero hidrofílico extraído de diversas espécies de algas marinhas marrons (classe *Phaeophyceae*), como a *Macrocystis pyrifera* e a *Laminaria hyperborea*. Ele também pode ser obtido de microrganismos (COVIELLO et al., 2007), como as bactérias das espécies *Pseudomonas* e *Azotobacter* (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

Quimicamente, este polímero é um polissacarídeo composto de resíduos do ácido β -D-manurônico (blocos M) e do ácido α -L-gulurônico (blocos G) (Figura 3.10) (ERTESVÅG; VALLA, 1998). Esses blocos são distribuídos em diferentes proporções ao longo de sua estrutura, podendo ser organizados em cadeias de resíduos G consecutivas (blocos GG), de resíduos M consecutivas (blocos MM) ou com resíduos de M e G alternados (blocos MG) (SMIDSRØD, 1974; DONATI et al., 2005).

A principal aplicação comercial do alginato é na forma de sal, sendo os mais utilizados o de sódio, de potássio e de amônio. O alginato de sódio é o mais empregado, sendo solúvel em água, insolúvel na maioria dos solventes orgânicos e em meios com pH inferior a 3. Os sais de alginato apresentam propriedades como espessamento, estabilização, suspensão e emulsificação (MANCINI; MORESI; SAPPINO, 1996; ERTESVÅG; VALLA, 1998), o que propicia sua aplicação nas indústrias de alimentos, de bebidas, têxtil e de papel (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008; MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011). Além disso, também são amplamente empregados na engenharia de tecidos para a síntese de biomateriais e no transplante de células (SOON-SHIONG et al., 1994; LEE; MOONEY, 2012). Na indústria farmacêutica, os usos de dispositivos baseados em alginatos estão principalmente relacionados ao aprisionamento de agentes terapêuticos (EL-ZATAHRY et al., 2007) e como aglutinante na formulação de comprimidos (LIEW et al., 2006).

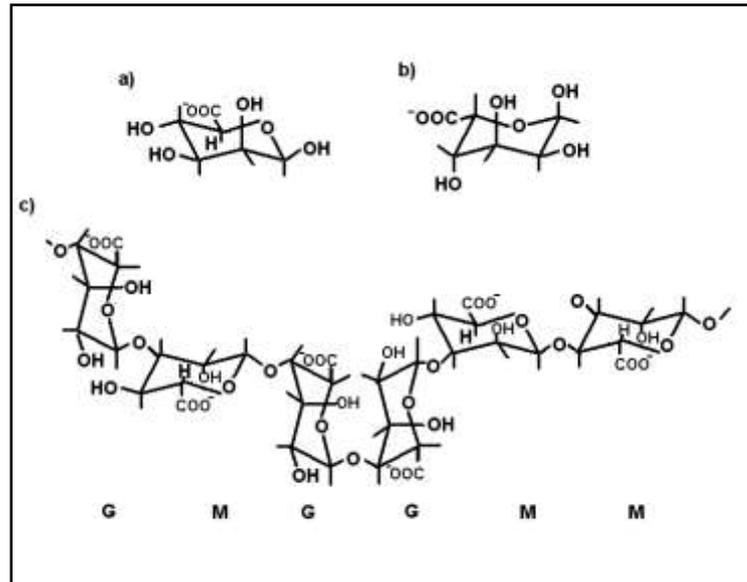


Figura 3.10 - Estrutura do: (a) ácido β -D-manurônico, (b) ácido α -L-gulurônico e (c) alginato. Fonte: ERTESVÁG; VALLA, 1998.

Este biopolímero apresenta a capacidade de formar géis termoestáveis insolúveis na presença de cátions divalentes por meio de sua adição controlada (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2006a). No processo de gelificação, os grupos carboxílicos de cadeias adjacentes de alginatos reagem com esses íons para formar uma rede tridimensional unida por “zonas de junção”, as quais são responsáveis pela formação do gel e envolvem a associação de extensas regiões da cadeia do polímero (DRAGET; SKJÅK-BRÆK; SMIDSRØD, 1997; BRACCINI; PÉREZ, 2001).

Os cátions divalentes apresentam diferentes graus de afinidade com as cadeias de alginato. O chumbo, por exemplo, forma os géis mais rígidos, enquanto o manganês tem a mais baixa afinidade. Devido à alta toxicidade da maioria desses cátions, a preferência tem sido dada a cálcio, estrôncio e bário (STRAND; MORCH; SKJAK-BRAEK, 2000). Dentre esses três, o bário se apresenta como o mais potente, e por ter o menor raio atômico, difunde rapidamente pelo gel. Já o estrôncio demonstrou ter uma afinidade próxima à do cálcio (SALAS-VALERO; KIECKBUSCH; MENEGALLI, 2011).

O cloreto de cálcio foi classificado por Allen et al. (1963) como o agente reticulante mais efetivo. A não toxicidade e a boa afinidade com o alginato são os responsáveis pela grande utilização do cálcio como agente reticulante (MØRCH et al., 2006). Na gelificação, os íons de cálcio difundem para o interior da solução do polímero e, ao entrar em contato com a solução de alginato, um gel se desenvolve instantaneamente na interface. A gelificação tem continuidade com a difusão dos íons cálcio pela interface gel-membrana (GLICKSMAN, 1983).

Grant et al. (1973) propuseram um mecanismo que descreve a formação de géis de alginato na presença de íons cálcio, o qual é popularmente conhecido como modelo “caixa de ovos” (*egg-box*). Neste sistema, pares de 21 cadeias helicoidais são empacotados com os íons de cálcio localizados entre eles (BRACCINI; PÉREZ, 2001). De acordo com esse modelo, uma proporção de 4:1 entre resíduos de blocos G e íons Ca^{2+} é identificada no gel de alginato de cálcio (MORRIS et al., 1978; LI et al., 2007), como mostrado na Figura 3.11.

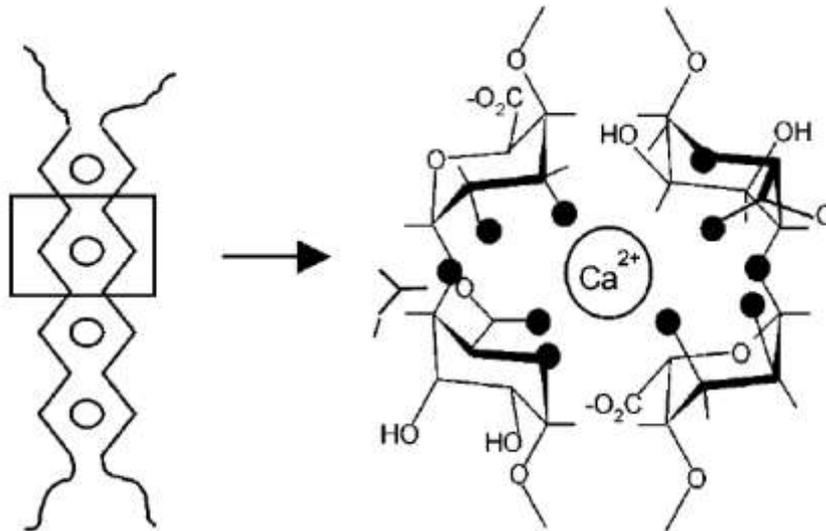


Figura 3.11 - Desenho esquemático do modelo “caixa de ovos” do alginato de cálcio.
Fonte: GRANT et al., 1973; MORRIS et al., 1978.

A afinidade dos alginatos pelos íons cálcio e por suas propriedades de formação de gel está intimamente ligada à fração de resíduos G, a massa molecular do polímero e a concentração de íons cálcio durante o procedimento de gelificação (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2006b). O percentual de blocos G na molécula de alginato é um dos principais fatores determinantes da rigidez do gel produzido. Quanto maior a porcentagem, mais rígido, quebradiço e reativo com íons metálicos é o alginato sintetizado. Isso ocorre devido ao formato irregular das cadeias de blocos G, o que favorece a ligação dos íons. Com relação aos blocos M, quanto maior o seu percentual, maior a linearidade das cadeias, maciez do gel, flexibilidade e menor a resistência do material obtido (DONATI et al., 2005). Por outro lado, a massa molar do alginato e a concentração de cálcio também podem alterar as propriedades mecânicas e de difusão do gel obtido (LEE; MOONEY, 2012; VAZ, 2012), pois há uma consequente alteração no número de “zonas de junção” de cadeias de alginato (SIMPSON et al., 2004).

A difusão de substratos, como glicose, L-triptofano, α -lactoalbumina, dentre outros, em esferas de alginato, foi estudada por Tanaka, Matsumura e Veliky (1983). Eles concluíram que a difusividade de solutos com massa molar inferior a $2 \cdot 10^4$ Da é muito próxima à difusividade

em água, e que concentrações de alginato de 2 a 4% (m/m) não afetam esse valor. A presença de células ativas no gel, entretanto, dificulta a difusividade (AXELSSON; PERSSON, 1988).

3.9 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM ALGINATO

A literatura reporta diversos trabalhos envolvendo a imobilização de enzimas por envolvimento em gel de alginato, tanto na forma extracelular quanto na forma micelial. Thu e Krasaekoopt (2016) investigaram o processo de imobilização da protease de *Aspergillus oryzae* e da lipase de *Thermomyces lanuginosus* por aprisionamento em gel de alginato. O aumento das concentrações de alginato utilizadas provocou um aumento no tamanho das esferas e na retenção da atividade enzimática, enquanto o desprendimento tanto da protease quanto da lipase foi reduzido.

Zhang et al. (2016) estudaram uma proteína de soro de leite por meio de seu aprisionamento em esferas de alginato de sódio. As esferas carregadas de proteínas foram produzidas em três pHs diferentes (3, 5 e 7) para estudar a influência das interações eletrostáticas entre a proteína e o alginato. O envolvimento e a retenção de proteínas foram maiores para baixos pHs, enquanto a liberação destas foi maior a pHs elevados.

A imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* por aprisionamento em gel de alginato foi avaliada por Gaspari, Gomes e Tavares et al. (1999) com a finalidade de promover a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus*, os quais foram extraídos dos tubérculos, desproteinizados e concentrados em 25% de açúcares redutores (AR). A inulinase foi concentrada em evaporador rotativo e imobilizada em alginato sódico, com concentrações de 2 e 4% (m/v), obtendo-se conversões de 12 e 26% em uma hora de reação, respectivamente.

Em outro estudo, Rawat et al. (2017) demonstraram a geração contínua de xarope de frutose de inulina de dente de leão e chicória preparado com exo-inulinase imobilizada em esferas de alginato. A temperatura ótima do biocatalisador imobilizado foi de 50 °C e o pH ótimo de 5,0. Os parâmetros cinéticos avaliados foram o K_m (3,74 mmol.L⁻¹) e o $V_{m\acute{a}x}$ (1,62 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$). A degradação sucessiva de oligossacarídeos de dente-de-leão e frutanos à frutose pura foi observada durante um período de 30 dias. O biocatalisador utilizado teve uma meia-vida de 15 dias e verificou-se a presença de mais de 90% (m/m) de frutose.

Em estudos realizados por Blemur et al. (2016), a enzima diamina oxidase (DAO) de ervilha branca (*Lathyrus sativus*) foi imobilizada por inclusão em microesferas formadas por gelificação de carboximetil amido (CMS)/alginato por complexação com Ca²⁺. A imobilização gerou uma estrutura com menor porosidade e acesso do fluido gástrico às microesferas, além

de impedir a perda da enzima aprisionada. O rendimento em termos de proteína aprisionada foi de cerca de 82% a 95%. A DAO aprisionada reteve até 70% de sua atividade inicial em fluido gástrico simulado (pH 2,0) e 65% no fluido intestinal simulado (pH 7,2) ao longo de 24 h, enquanto que sob condições semelhantes, a enzima livre foi totalmente inativada.

Bokkhim et al. (2015) realizaram o envolvimento de lactoferrina (Lf) em alginato, com uma solução a 2% (m/m) de Lf e 2% (m/m) de alginato, usando cloreto de cálcio 0,1 mol.L⁻¹ como solução de reticulação. As eficiências de aprisionamento obtidas foram de 68 e 88% com base na quantidade total de Lf presa na matriz de microgel de alginato. Aumentar a concentração de CaCl₂ a 0,2 mol.L⁻¹ reduziu a eficiência do aprisionamento.

Também abordando o aprisionamento de enzimas em gel de alginato, Ashfaque, Solomon e Pathak (2015) imobilizaram a cellobiase de *T. longibrachiatum* em esferas de alginato de sódio (1, 1,5 e 2% m/v). A cellobiase imobilizada apresentou atividade máxima a 40°C e pH 5,5 (42,141 U). Na pesquisa realizada por Ali e Nawaz (2016), a L-tirosina de *Aspergillus oryzae* foi retida em esferas de alginato para a produção de dopamina (DA). A atividade enzimática máxima apresentada foi de 62 µg.ml⁻¹ em condições otimizadas (1,5% de alginato de sódio, 2 ml de inóculo e 2 mm de diâmetro da esfera).

O envolvimento de lacase de *Coriolus Hirsutus* foi investigado por Gill, Orsat e Kermasha (2018), usando matrizes de alginato e alginato-sílica. A incorporação de sílica em alginato resultou em uma eficiência de aprisionamento (EE) maior (70%) para a lacase em comparação com o alginato simples (59%). As matrizes de alginato e alginato-sílica também aumentaram a eficiência catalítica da lacase em comparação com a forma livre, com constantes de velocidade de reação (K_{cat}) de 89,9 e 63,7 min⁻¹, respectivamente. Além disso, os suportes empregados demonstraram completa estabilidade de armazenamento a 4 °C, sem perda de atividade da lacase após 6 semanas de armazenamento.

Por fim, o oxidrato de ferredoxina de piruvato de *Citrobacter* sp. S-77 (PFOR_{S77}) foi purificado por Takenaka et al. (2017) para desenvolver um método para a produção de acetil-CoA. O PFOR_{S77} foi efetivamente imobilizado em hidroxiapatita cerâmica (PFOR_{S77}-HA) com uma eficiência superior a 96%, mas após o seu aprisionamento em gel de alginato, a taxa de produção catalítica de acetil-CoA foi reduzida para 36% quando comparada com a da enzima livre. No entanto, a estabilidade operacional após o aprisionamento foi notável, mantendo mais de 68% da atividade inicial mesmo após dez ciclos repetidos.

3.9.1 Imobilização da FTase em alginato

A literatura envolvendo a imobilização da enzima FTase por envolvimento em gel de alginato é restrita. Fernandez-Arrojo et al. (2013) investigaram a imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* por meio do aprisionamento da enzima em esferas de alginato secas, denominadas DALGEEs. Os DALGEEs resultantes foram testados com sucesso na síntese de frutooligossacarídeos (FOS), tanto em operação por batelada quanto em um reator contínuo de leito fixo. Os DALGEEs não voltaram a entumecer após a incubação em soluções de sacarose concentradas (600 g.L^{-1}), provavelmente devido à atividade de água reduzida de tais meios. Além disso, mostraram uma atividade volumétrica aproximadamente 30 vezes maior (300 U.mL^{-1}) em comparação com as esferas de gel de alginato antes da secagem. Também foi observado um aumento de 40 vezes no rendimento espaço-tempo de biorreatores de leito fixo ao usar DALGEEs como biocatalisador em comparação com esferas de gel sem a secagem posterior ($4030 \text{ g.dia}^{-1}.\text{L}^{-1}$ de FOS versus $103 \text{ g.dia}^{-1}.\text{L}^{-1}$). Por fim, verificou-se que a estabilidade operacional dos reatores de leito fixo alimentados com DALGEEs proporcionou uma produção de FOS quase constante durante pelo menos 700 h.

Ganaie et al. (2014b) apresentaram um sistema de utilização da frutossiltransferase micelial de *Aspergillus Flavus* NFCCI 2364 para a produção de FOS por meio do aprisionamento desse biocatalisador em gel de alginato de cálcio. As esferas foram produzidas utilizando alginato de sódio 0,3% (m/v) reticuladas utilizando 0,1% (m/v) de solução de CaCl_2 . Foi obtida uma atividade de transfrutossilção (A_T) máxima de 45 U.mL^{-1} para o micélio imobilizado com alginato, enquanto o micélio livre sem tratamento apresentou uma A_T máxima de 40 U.mL^{-1} . Os resultados mostraram uma maior estabilidade ao pH do micélio imobilizado com alginato em relação ao micélio livre. A FTase imobilizada em alginato foi capaz de manter mais de 50% de sua atividade inicial após 15 ciclos de produção de FOS de 24 horas cada. Os dados revelados por análise de HPLC indicaram uma conversão de 67,75% (m/m) em FOS em 36 h de reação do substrato enzimático.

Em uma pesquisa mais recente, Huang et al. (2016) realizaram a imobilização da FTase extracelular de *Aspergillus aculeatus* M105 por envolvimento em gel de alginato de cálcio, obtendo um biocatalisador capaz de ser aplicado na produção de FOS por até 15 ciclos. O rendimento máximo de FOS da enzima livre foi de 67,54% (m/m) e o da FTase imobilizada de 65,47% (m/m). A faixa de pH ótima da enzima foi de 5,0 a 6,0, enquanto que a temperatura ótima do biocatalisador foi de $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

Em um estudo sobre a produção contínua de FOS por FTase de *Aureobasidium pullulans*, realizado por Jung et al. (2011), a imobilização foi feita por aprisionamento da suspensão celular (4% (v/v)) em esferas de gel de alginato de sódio 3% (m/v). A mistura foi gotejada em uma solução de CaCl_2 0,1 mol.L⁻¹ por meio de agulhas de seringa n ° 25 para formar esferas de 2 mm de diâmetro. A obtenção de FOS ocorreu em reator de leito empacotado, em escala piloto. Em condições otimizadas, utilizando 770 g de sacarose.L⁻¹ a uma taxa de alimentação de 200 L.h⁻¹, a 50 °C, foi obtida uma produtividade de 180 g FOS.h⁻¹. A atividade enzimática inicial foi mantida por mais de 100 dias. O reator foi escalonado com sucesso até uma escala de produção de 1,2 m³.

Como os resultados obtidos por essas pesquisas foram satisfatórios, foi desenvolvida uma metodologia de reticulação com glutaraldeído e aprisionamento da FTase em gel de alginato, bem como a caracterização do produto obtido, visando aprimorar os dados já disponíveis na literatura e obter maiores produtividades de FOS, como apresentado a seguir.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Alginatos

Alginato de sódio de baixa viscosidade (Alg. B.V.) (Lote SLBT8740 fabricado em 17/10/2017), com viscosidade de 8 cps na concentração de 1% em água a 25 °C, segundo o fabricante) e de média viscosidade (Alg. M.V.) (Lote SLBV9536, fabricado em 05/03/2018, com viscosidade de 2994 cps na concentração de 2% em água a 25 °C, segundo o fabricante), ambos provenientes de algas marrons (Sigma Aldrich[®], EUA).

4.1.2 Agentes reticulantes

Reticulantes do alginato: cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Synth[®], Brasil) e cloreto de bário dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merse[®], Brasil).

Reticulante da biomassa: glutaraldeído (VETEC[®], Brasil).

4.1.3 Substrato

Sacarose comercial (açúcar refinado) adquirida em supermercado local.

4.1.4 Outros reagentes

- Solução tampão 0,2 mol.L⁻¹ de tris (hidroximetil) aminometano P.A. - A.C.S. ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) (Synth[®], Brasil)
- Borohidreto de sódio (NaBH_4) (NEON[®], Brasil)
- Citrato de sódio dihidratado P.A. - A.C.S ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Synth[®], Brasil)
- Acido 3,5-dinitrosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) (Dinâmica[®], Brasil)
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica[®], Brasil)
- Tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Dinâmica[®], Brasil)
- Glicose (Dinâmica[®], Brasil)
- Ágar batata dextrose (KASVI[®], Brasil)
- Glicerina (Isotar[®], Brasil)
- Extrato de levedura (Synth[®], Brasil)
- Cloreto de sódio (NaCl) (Dinâmica[®], Brasil)
- Tween-80 (Dinâmica[®], Brasil)

- Nitrato de sódio (Dinâmica[®], Brasil)
- Fosfato monopotássico (KH₂PO₄) (Synth[®], Brasil)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) (Dinâmica[®], Brasil)
- Cloreto de manganês tetra hidratado (MnCl₂.4H₂O) (Synth[®], Brasil)
- Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) (Synth[®], Brasil)

4.2 METODOLOGIA EMPREGADA

O fluxograma da Figura 4.1 apresenta uma visão geral da metodologia empregada na obtenção e caracterização das esferas de alginato contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído. As etapas descritas no diagrama foram detalhadas nos itens a seguir.

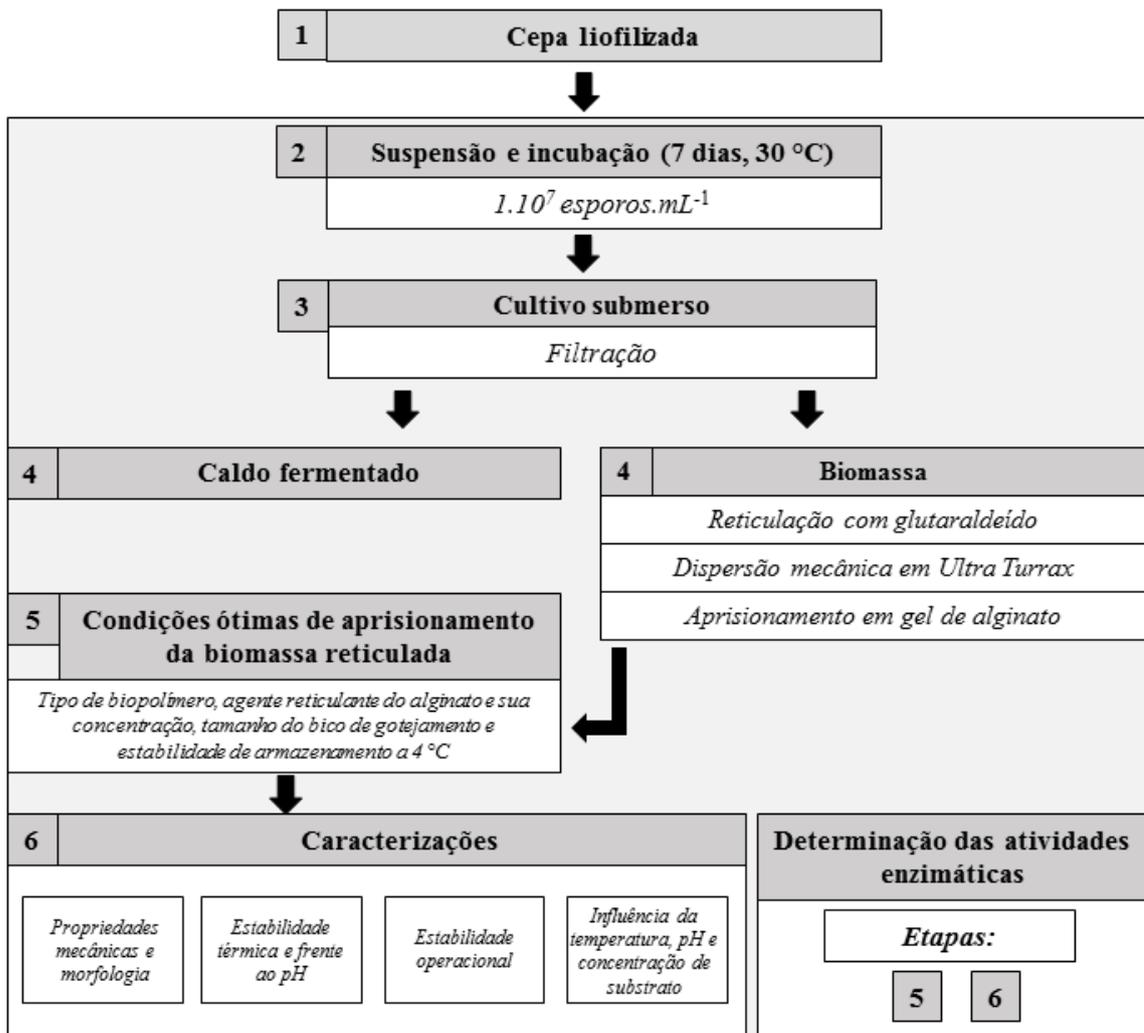


Figura 4.1 – Visão geral da metodologia empregada na obtenção e caracterização das esferas de alginato contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído.

Fonte: Autora.

4.2.1 Produção de frutossiltransferase micelial

4.2.1.1 Microrganismo e condições de cultivo

Cepas do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 na forma de esporos liofilizados foram cedidas pelo banco de cultura do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP). Um *pellet* contendo cerca de 5 g de esporos liofilizados do microrganismo foi ressuspensão em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 μ L foram inoculadas em meio sólido contendo (em %, m/v): ágar batata dextrose 2,0, glicerina 2,5, extrato de levedura 0,5 e glicose 2,5. Após incubação por 7 dias em incubadora refrigerada a 30 °C do tipo B.O.D. (Modelo TE-371, Tecnal[®], Piracicaba, Brasil), os esporos produzidos foram coletados por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski e aproximadamente 10 mL de solução constituída por NaCl 0,95% (m/v) e Tween-80 0,1% (v/v). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina 20,0% (m/v), cujo volume foi variável, de modo a ajustar a concentração de esporos para aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹. A contagem dos esporos foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Modelo New Optics, Global Trade[®], Marília, Brasil), e estes foram armazenados sob refrigeração a -12 °C (CUNHA, 2017).

4.2.1.2 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a obtenção da biomassa catalítica continha (em %, m/v): sacarose (comercial) 15,0, extrato de levedura 0,5, NaNO₃ 0,5, KH₂PO₄ 0,2, MgSO₄.7H₂O 0,05, MnCl₂.4H₂O 0,03 e FeSO₄.7H₂O 0,001. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 com uma solução de NaOH 0,01 mol.L⁻¹. Em seguida, foram distribuídos 100 mL deste meio em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e o seu conteúdo foi autoclavado a 121 °C e 1,1 atm durante 20 minutos.

4.2.1.3 Cultivo submerso aeróbio

A produção da enzima FTase foi realizada de acordo com a metodologia estabelecida por CUERVO-FERNÁNDEZ et al. (2007) e OTTONI et al. (2012). Foram inoculadas 1,0 mL de suspensão (1.10^7 esporos.mL⁻¹) em 100 mL de meio de cultura (Item 4.2.1.1). A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo *shaker* (Modelo TE-4200, Tecnal[®], Piracicaba, Brasil) a 30 °C e 200 rpm por um período de 64 horas. Após o cultivo o produto obtido foi filtrado à vácuo utilizando papel de filtro Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm, obtendo-se a biomassa

(torta), que contém a enzima FTase micelial, e o caldo fermentado (permeado), o qual contém a enzima FTase extracelular. A biomassa continha em torno de 87% de umidade e foi utilizada na reticulação da FTase micelial com glutaraldeído e também, em ensaios preliminares, na imobilização com alginato. Em alguns ensaios, para uma avaliação comparativa da influência de cortes nos filamentos de biomassa, a biomassa livre e reticulada com glutaraldeído foi submetida a um esmagamento sobre uma lâmina de vidro, por dois minutos, com um bastão de vidro.

4.2.2 Reticulação e imobilização da FTase

4.2.2.1 Reticulação da biomassa celular (micélio) com glutaraldeído

A reticulação com glutaraldeído seguiu uma metodologia adaptada do método descrito por VESCOVI et al. (2016). Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 1,5 g de micélio úmido (biomassa) após filtração à vácuo do produto obtido na fermentação. Em seguida foram adicionados 12,6 mL de solução de glutaraldeído previamente dissolvida em 137,4 mL de solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, totalizando 150 mL de volume reacional (pH do tampão em 7,9 e concentração de glutaraldeído de 2,1% v/v, condições otimizadas por Garcia, 2018). O frasco foi colocado em agitador orbital do tipo *shaker* (Modelo TE-4200, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) a 25 °C e 200 rpm por 60 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de borohidreto de sódio (NaBH₄) previamente dissolvido em solução 0,001 mol.L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH), a uma concentração de 100 g.L⁻¹, e manteve-se o meio reacional por mais 30 minutos de agitação no *shaker*. Feito isso, o conteúdo foi filtrado à vácuo utilizando papel de filtro qualitativo. O micélio reticulado (torta) foi então lavado abundantemente com água destilada e preservado em geladeira (4 °C) em tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5, para posterior utilização no aprisionamento em gel de alginato de sódio. O material final a ser utilizado nos ensaios de imobilização continha cerca de 87% de umidade.

4.2.2.2 Imobilização da biomassa celular com alginato de sódio

O procedimento de imobilização por envolvimento em gel de alginato de cálcio ou de bário foi realizado utilizando o biocatalisador (FTase micelial) em duas formas distintas: como enzima micelial livre (biomassa obtida após filtração à vácuo do produto do cultivo) e como enzima micelial reticulada com glutaraldeído. Nos ensaios de imobilização por aprisionamento foram utilizados dois tipos de alginato, o de média viscosidade e o de baixa viscosidade.

4.2.2.3 Preparo da suspensão de biomassa

Ensaio exploratórios indicaram limites no conteúdo de alginato e de FTase na suspensão de alimentação do sistema de aprisionamento. Uma maior viscosidade desse meio e a presença de sólidos prejudicavam a continuidade do bombeamento e a formação regular de gotas.

A Tabela 4.1 apresenta a composição das soluções/suspensões de alimentação, com alginatos de baixa e de média viscosidade, utilizadas nessa pesquisa. Em ambas as suspensões procurou-se manter uma concentração constante de biomassa seca (3% m/m), e, devido ao efeito da viscosidade, o conteúdo de alginato foi limitado a 4% (m/m) e a 1,2% (m/m) nos alginatos de baixa e de média viscosidade, respectivamente.

Primeiramente foram preparadas soluções de alginato de sódio 4,0% e 1,2% m/m de baixa e média viscosidade, respectivamente, em água destilada a temperatura ambiente, mantendo-se o sistema sob agitação magnética constante por aproximadamente 1 hora até a completa dissolução e homogeneização do material.

Tabela 4.1 - Composição das soluções/suspensões de alimentação do sistema de envolvimento da biomassa em alginato de sódio.

Componentes	Alginato de baixa viscosidade (% m/m)	Alginato de média viscosidade (% m/m)
Biomassa reticulada, úmida	23,08	23,08
Alginato	4,00	1,20
Água	72,92	75,72
Biomassa seca	3,00	3,00

Fonte: Autora.

Em seguida, a biomassa reticulada com glutaraldeído preservada em tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5 era adicionada à solução de alginato, ainda sob agitação magnética conforme a proporção indicada na Tabela 4.1. A suspensão foi então submetida a um tratamento cisalhante promovido por um Ultra Turrax[®] (modelo T18 basic, IKA Werke, Staufen, Alemanha) por dois minutos na rotação de 1000 rpm.

Para a produção das esferas controle, a biomassa não era adicionada e as concentrações das soluções de alginato foram mantidas.

4.2.2.4 Obtenção de esferas gelificadas de alginato

O procedimento utilizado na obtenção das esferas consistiu no gotejamento das soluções contendo 32,5 g de alginato de sódio + biomassa ou somente alginato (esferas controle) em 50

mL de solução contendo cátions reticulantes, sob agitação lenta, para melhorar a homogeneidade da reação de reticulação (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). Os cátions reticulantes foram o cálcio e o bário, provenientes de soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em concentrações de 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5 e 1,00 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para o cálcio e de 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,20 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para o bário.

O equipamento utilizado para a movimentação do fluido foi uma bomba peristáltica (Pump IV, BCC, Áustria) com controle de rotação, acoplada a uma mangueira de silicone de 3 mm de diâmetro interno e 5 mm de diâmetro externo. Essa mangueira foi conectada ao bico aspersor de gotejamento. Uma fotografia dessa instalação está apresentada na Figura 4.2.



Figura 4.2 - Sistema de gotejamento da solução de alginato contendo a biomassa previamente reticulada com glutaraldeído sobre soluções de cloreto de cálcio ou de bário.
Fonte: Autora.

Os bicos de gotejamento consistiam de tarugos com cerca de 40 mm de comprimento, usinados de peças de teflon[®], de 12 mm de diâmetro, conforme a Figura 4.3. Uma extremidade do tarugo foi rebaixada até 4,5 mm de diâmetro para receber a mangueira de silicone. A outra extremidade foi torneada formando um pequeno tubo (bico de 2 mm de comprimento) com uma parede de 0,15 mm de espessura. O eixo do tarugo foi perfurado por uma broca de 1 mm de diâmetro, exceto na extremidade do bico (1 cm), onde as aberturas foram de 0,7; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mm de diâmetro.

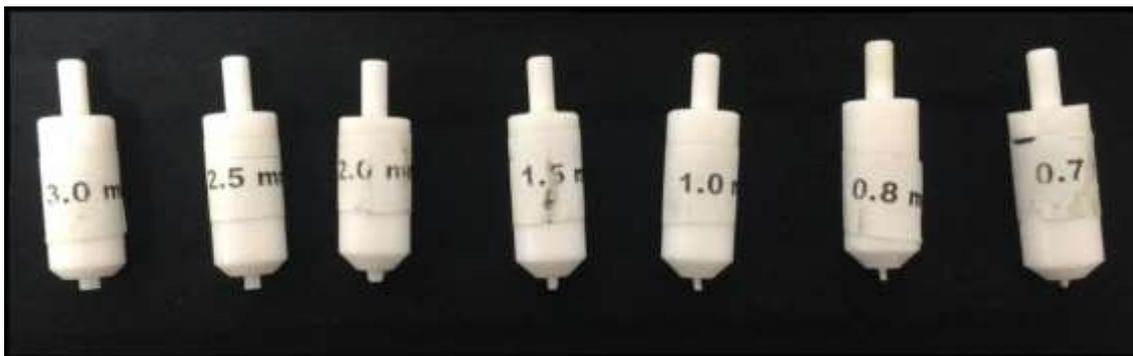


Figura 4.3 - Bicos de gotejamento empregados no aprisionamento da biomassa previamente reticulada com glutaraldeído.

Fonte: Autora.

Quando o sistema era alimentado com solução contendo apenas alginato (4,0% de baixa viscosidade e 1,2% de média viscosidade) foram obtidas esferas conforme apresentado na Tabela 4.2. A solução reticulante continha $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com o alginato de baixa viscosidade e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com o de média viscosidade.

Tabela 4.2 - Diâmetros e frequências de gotejamento das esferas de alginato utilizando-se diferentes diâmetros do orifício do bico de gotejamento e alginatos de baixa e média viscosidade.

Diâmetro do orifício (mm)	Alginato de baixa viscosidade		Alginato de média viscosidade	
	Diâmetro médio (mm)	Gotas.min ⁻¹	Diâmetro médio (mm)	Gotas.min ⁻¹
0,7	2,16 ± 0,08	138	3,01 ± 0,14	107
0,8	2,41 ± 0,08	145	3,15 ± 0,13	123
1,0	2,82 ± 0,28	127	3,21 ± 0,20	106
1,5	3,33 ± 0,12	142	3,85 ± 0,13	98
2,0	3,51 ± 0,26	135	4,50 ± 0,12	121
2,5	3,55 ± 0,08	142	4,52 ± 0,39	102
3,0	3,91 ± 0,17	156	4,91 ± 0,67	112

Fonte: Autora.

De acordo com parâmetros definidos em testes preliminares, a distância entre o bico de gotejamento e a solução reticulante foi fixada em 10 cm. As esferas foram mantidas na solução reticulante, à temperatura ambiente, por 15 minutos após o gotejamento da última esfera. Na maioria dos casos, um tempo de gelificação mínimo de 15 minutos é suficiente para obter partículas de tamanho uniforme e formato esférico (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). Em seguida, foram separadas por filtração à vácuo utilizando papel de filtro qualitativo, lavadas com água destilada e secas em papel macio, para posterior determinação de suas atividades enzimáticas.

4.2.3 Determinação das atividades enzimáticas

Ao longo dos experimentos foi feita a coleta de amostras visando conduzir ensaios de atividade enzimática micelial para a estimativa da produção de FOS. O procedimento para a coleta de amostras está representado na Figura 4.4.



Figura 4.4 - Esquema geral de amostragem.
Fonte: Autora.

A concentração de FOS é expressa como a soma das concentrações de 1-kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose no meio reacional sob as condições ensaiadas. As concentrações de açúcares obtidas durante a reação enzimática são descritas pelas equações:

$$[AR] = [F] + [G] \quad (10)$$

$$[F] = [AR] - [G] \quad (11)$$

$$[FOS] = [G] - [F] = 2[G] - [AR] \quad (12)$$

sendo $[AR]$, $[F]$ e $[G]$ as concentrações de açúcares redutores, frutose e glicose, respectivamente, expressas em $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e $[FOS]$ a concentração de frutooligossacarídeos, em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Com a concentração de FOS, expressa pela Equação (12), determina-se a atividade de transfrutossilação micelial (A_T^{micelial}), em $\mu\text{mol de FOS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g micélio seco}^{-1}$, pela Equação (13):

$$A_T^{\text{micelial}} = \frac{[FOS] \cdot V_R}{t_R \cdot m_{\text{micélio}}} \quad (13)$$

sendo $[FOS]$ a concentração de FOS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo da reação (min) e $m_{\text{micélio}}$ a massa de micélio seco (g).

Com a concentração de frutose, Equação (11), determina-se a atividade hidrolítica micelial (A_H^{micelial}), em $\mu\text{mol de frutose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g micélio seco}^{-1}$, pela Equação (14):

$$A_H^{\text{micelial}} = \frac{[F] \cdot V_R}{t_R \cdot m_{\text{micélio}}} \quad (14)$$

sendo [F] a concentração de frutose ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo da reação (min) e $m_{\text{micélio}}$ a massa de micélio seco (g).

As diferentes formas de FOS, na maioria das vezes, podem ser identificadas e quantificadas por métodos cromatográficos (LIM et al., 2007; AGUIAR-OLIVEIRA e MAUGERI, 2012; ANTOSOVÁ et al., 2008). Uma forma simples e de baixo custo para quantificar os FOS produzidos se baseia na utilização da Equação (12). Os açúcares redutores podem ser quantificados pelo método DNS (ácido dinitrossalicílico) (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013) e a glicose pelo método GOD-PAP (BOBBIO e BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008). Entretanto, como uma molécula de FOS resulta da incorporação de uma unidade de β -D-frutossil à molécula de sacarose ou de frutooligossacarídeo já existente (ver Figura 3.2), a Equação (12) fornecerá a quantidade de FOS produzida, mas expressa em termos de kestose, isto é, a sacarose adicionada com um grupo frutossil, conforme a Figura 3.4.

Devido à presença do alginato no meio reacional, foi necessário adaptar as massas de micélio utilizadas na determinação das atividades enzimáticas, de modo que fossem obtidas com base na massa de micélio seco e não mais com relação à massa úmida introduzida, como é praxe em alguns laboratórios.

A massa de micélio seco ($m_{\text{micélio}}$) foi determinada mantendo a biomassa em estufa (ProLab[®], São Paulo, Brasil) a 60 °C até a obtenção de massa constante. Este procedimento foi realizado em quadruplicata com o micélio livre, com a biomassa livre aprisionada em alginato, com o micélio reticulado com glutaraldeído, e com a biomassa reticulada com glutaraldeído e envolvida em alginato. No produto aprisionado, o alginato de cálcio ou bário foi previamente dissolvido em citrato de sódio 2% (m/v) antes do processo de obtenção de massa seca. Os valores médios obtidos ($m_{\text{micélio}}$) foram utilizados nas Equações (13) e (14) para o cálculo das atividades de transfrutossilção micelial (A_T^{micelial}) e hidrolítica micelial (A_H^{micelial}), respectivamente.

4.2.3.1 Condução da reação enzimática

Para a realização dos ensaios de atividade enzimática micelial, foram adicionados 0,05 g de micélio úmido, que contém cerca de $6,5 \cdot 10^{-3}$ g de micélio seco, e 1,2 mL de tampão tris-

acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5 em um tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, adicionou-se 3,7 mL de solução de sacarose comercial 40,0% (m/v) previamente aquecida a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos, dando início à reação enzimática (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012). Com o material aprisionado previamente reticulado com glutaraldeído, foram adicionadas ao tubo Falcon de 15 mL o número de esferas correspondentes a uma massa seca de aproximadamente $6,5 \cdot 10^{-3} \text{ g}$, calculado assumindo a composição dada na Tabela 4.1.

A reação foi conduzida por 60 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 190 rpm em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) e interrompida por fervura durante 10 minutos, seguida de banho de gelo por 5 minutos (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012). Nos casos em que as esferas de alginato foram utilizadas, a reação também foi conduzida nas mesmas condições, mas foi interrompida apenas com o banho de gelo, pois a fervura desestruturava o gel de alginato.

As condições básicas (pH 5,5, temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de reação de 60 minutos e concentração de sacarose de 400 g.L^{-1}) foram consideradas como condições padrão na condução da reação enzimática. Estes dados foram aplicados como condições ótimas do meio reacional, as quais foram estabelecidas em trabalhos anteriores realizados pelo laboratório de bioprocessos de UNIFAL/MG campus Poços de Caldas, e foram confirmadas após a realização de ensaios de influência de pH, temperatura e concentração de substrato (Item 4.2.6).

Após a realização dos ensaios de atividade enzimática, o sobrenadante do meio reacional foi diluído com água destilada e as concentrações de açúcares redutores (AR) e de glicose foram obtidas pelos métodos DNS e GOD-PAP, respectivamente.

4.2.3.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

O método DNS (ácido dinitrossalicílico) foi utilizado para determinar a concentração de AR presente no meio reacional (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Preparou-se uma solução de DNS pela adição de 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) a 200 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2 mol.L^{-1} (solução A). Em paralelo, 300 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 500 mL de água destilada (solução B). A solução A foi adicionada a solução B, sob aquecimento e agitação constantes, até a sua completa dissolução. Após resfriamento, a solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 1.000 mL e o seu volume foi completado com água destilada. O reagente foi então armazenado em frasco âmbar, ao abrigo da luz.

A metodologia analítica se inicia com a adição de 1,0 mL do sobrenadante do meio reacional diluído com água destilada (após reação enzimática) e 1,0 mL da solução de DNS (preparada como descrito acima) a um tubo de ensaio. A solução obtida foi colocada sob fervura por 10 min e, em seguida, em banho de gelo por 5 min. Feito isso, foram adicionados 8 mL de água destilada a essa mesma solução. Para a obtenção do branco, as mesmas etapas foram realizadas, apenas substituindo a amostra por água destilada. As absorvâncias foram lidas em um espectrofotômetro (Edutec[®], modelo EEQ901A-B, Curitiba, Paraná) no comprimento de onda de 540 nm.

Para a construção da curva de calibração do método DNS preparou-se uma solução padrão de glicose 1,0 g.L⁻¹ e, a partir desta, foram feitas as diluições necessárias para obter concentrações na faixa de 0,0 até 1,0 g.L⁻¹.

Por fim, a concentração de AR no meio reacional foi obtida multiplicando-se a concentração dada pelo método pela respectiva diluição da amostra. Uma varredura de todo o espectro garantiu que não houve interferência do alginato na leitura da absorvância (ver Figura A-2, Apêndice A).

4.2.3.3 Determinação da concentração de glicose

O método GOD-PAP para a determinação da concentração de glicose no meio reacional consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato. A ação desse kit promove a oxidação da glicose pela glicose oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, o qual é oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea (BOBBIO e BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008).

A metodologia analítica se iniciou com a adição de 35 µL da amostra (sobrenadante oriundo da reação enzimática após diluição em água destilada) em um tubo de ensaio contendo 3,5 mL de solução do kit enzimático. A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker[®], modelo NI 1232, Piracicaba, São Paulo) a 37 °C por 5 min. Para a obtenção do branco foram realizadas as mesmas etapas, apenas substituindo a amostra por água destilada.

As absorvâncias foram lidas em um espectrofotômetro (Edutec[®], modelo EEQ901A-B) no comprimento de onda de 505 nm. A concentração de glicose no meio reacional foi obtida multiplicando-se a concentração determinada pelo método pela respectiva diluição da amostra. Uma varredura de todo o espectro garantiu que não houve interferência do alginato na leitura da absorvância (ver Figura A-1, Apêndice A).

Com a concentração desses açúcares, foi possível determinar as concentrações de frutose por meio da Equação (11) e de FOS pela Equação (12). As atividades de transfrutossilacção micelial ($A_T^{micelial}$) e hidrolítica micelial ($A_H^{micelial}$) foram calculadas pelas Equações (13) e (14), respectivamente.

4.2.4 Distribuição e morfologia de tamanho dos filamentos do micélio

Amostras de solução de biomassa reticulada + alginato após dispersão pelo Turrax[®] por 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 minutos tiveram a distribuição de tamanho dos filamentos determinada por meio do analisador de tamanho de partículas por espalhamento de luz laser Horiba LA-950V2 (Kioto, Japão), onde um feixe de luz laser monocromático incide sobre uma amostra de partículas, sofrendo um espalhamento causado por reflexão, refração ou difração. O ângulo desse espalhamento é função do tamanho e do formato das partículas. No entanto, essa técnica considera as partículas como esféricas, fornecendo diâmetros de esferas com o mesmo espalhamento de luz (FIGURA e TEIXEIRA, 2007). Os testes foram realizados no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas/SP.

Nas análises foram utilizados 10 g de amostra (2 g de amostra em base úmida + 8 g de água filtrada). Primeiramente a mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos e submetida a ultrassom por 30 segundos. Após essa preparação a amostra foi adicionada a câmara de leitura do equipamento, por onde circulava água filtrada, até atingir a transmitância adequada para as análises, a qual é indicada automaticamente pelo equipamento. Foram realizadas 6 leituras de cada preparação de amostra.

O critério de avaliação dos resultados (USP429 - Light Diffraction Measurement of Particle Size) considera um coeficiente de variação (%) das 6 leituras de $D_{50} < 10\%$, de $D_{10} < 15\%$ e de $D_{90} < 15\%$.

As amostras já preparadas para análise de granulometria foram utilizadas para avaliação das partículas em microscópio óptico Olympus (Tóquio, Japão) em aumentos totais de 100 e 1000 vezes com captação digital das imagens. Para isso, uma gota da amostra foi depositada em lâmina de vidro e coberta por lamínula, e, em seguida, observada no equipamento.

4.2.5 Caracterização das esferas de FTase imobilizada

A otimização das condições da biomassa reticulada com glutaraldeído envolvida em alginato foi baseada nos resultados de maximização do rendimento de FOS. Os ensaios foram

conduzidos variando-se o tipo de alginato empregado (baixa ou média viscosidade), o agente reticulante utilizado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e as suas respectivas concentrações, além do diâmetro médio das esferas.

4.2.5.1 Aspecto visual

As esferas de alginato foram avaliadas considerando aspectos visuais, como homogeneidade (ausência de bolhas de ar), textura, formato e cor. As observações foram feitas com o auxílio de uma lupa conta-fios (Solver, China).

4.2.5.2 Diâmetro médio das esferas

Os diâmetros das esferas foram medidos em fotografias digitalizadas obtidas com o auxílio da lupa conta-fios colocada sobre um papel milimetrado, com no mínimo 5 esferas de cada condição estudada. O diâmetro médio foi calculado por meio do software IMAGE J[®], com o seu respectivo desvio padrão

4.2.5.3 Propriedades mecânicas

A resistência mecânica à compressão das esferas foi avaliada pelo teste de compressão com o texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD, Gouldming, Inglaterra) utilizando-se uma célula de carga de 500 g e cilindro de compressão de 0,5 polegada de diâmetro (*probe*). A compressão foi realizada até 40% de deformação da amostra, a uma velocidade de pré-teste e teste de $1\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ em temperatura ambiente. A distância entre o *probe* e a placa plana foi ajustada em 5 mm. Foram avaliadas 10 esferas de cada formulação e a força máxima média foi determinada.

4.2.5.4 Morfologia das esferas

Observações da estrutura superficial tridimensional das esferas obtidas foram realizadas por meio de microscópio eletrônico de varredura de alto vácuo TM 3000 Tabletop Microscope, com magnitude de 15 a 30000 vezes e voltagem de aceleração de 15 kV (Hitachi High Technologies, Minato, Tóquio, Japão), utilizando técnica não destrutiva, que dispensa pré-tratamento da amostra (HITASHI, 2010).

4.2.5.5 Estabilidade da FTase armazenada a 4 °C

Com o intuito de verificar a estabilidade das esferas de alginato contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e armazenadas em geladeira (4 ± 1 °C), no formato e condições em que foram produzidas, foi realizado o monitoramento das atividades de transfrutoseilação e hidrolítica miceliais dessas esferas ao longo de 15 dias. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme descrito no Item 4.2.3.

4.2.5.6 Estabilidade térmica da FTase e determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos

A estabilidade térmica da enzima micelial livre e da imobilizada foi avaliada nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. Para isso, as enzimas foram incubadas nestas temperaturas por 1, 2, 4, 6, 20 e 24 horas e, após este período, suas atividades enzimáticas foram obtidas em triplicata conforme descrito no Item 4.2.3.

Para a avaliação da estabilidade térmica de uma enzima, é necessário determinar alguns parâmetros que influenciam no processo enzimático. Dois destes parâmetros são a constante de inativação térmica (K_D) e a energia de inativação térmica (E_D), pois simultaneamente à reação enzimática, também ocorre a reação de inativação térmica do biocatalisador. A constante de inativação térmica desta reação sofre influência da temperatura e é descrita pela Lei de Arrhenius (BORZANI et al., 2001; PETERSON et al., 2007):

$$K_D = A_D \cdot e^{\frac{-E_D}{R \cdot T}} \quad (2)$$

sendo A_D o fator de frequência.

Para se determinar K_D , utilizou-se o modelo linearizado da Equação (3) (GOMES et al., 2006,):

$$\ln A = \ln A_0 - K_D \cdot t \quad (3)$$

sendo A a atividade de transfrutoseilação remanescente após tratamento térmico durante um certo período de incubação, A_0 a atividade de transfrutoseilação inicial e t o tempo de incubação.

Linearizando a Equação (2), pode-se determinar E_D por meio do coeficiente angular da reta ($\frac{E_D}{R}$) obtida a partir de um gráfico de $\ln K_D$ versus $\frac{1}{T}$, como mostrado na Equação (4) (MIRANDA et al., 2014):

$$\ln K_D = \ln A_D - \frac{E_D}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4)$$

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) também é um fator afetado pela estabilidade de um processo enzimático, sendo conhecido como o tempo necessário para que a atividade enzimática se reduza à metade de seu valor inicial, como mostrado na Equação (5) (HEIDTMANN et al., 2012).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_D} \quad (5)$$

Para o caso de biocatalisadores imobilizados, a meia vida enzimática é crucial na determinação da eficiência de imobilização, por meio do fator de estabilidade (FE), representado pela Equação (6) (SOUZA et al., 2016).

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ livre}} \quad (6)$$

sendo $t_{1/2} \text{ imobilizada}$ e $t_{1/2} \text{ livre}$ os tempos de meia vida da enzima imobilizada e da enzima livre, respectivamente.

Por fim, os parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica das enzimas tanto na forma livre quanto na forma imobilizada, são representados pelas Equações (7), (8) e (9), que descrevem a variação de entalpia (ΔH^0), a variação na energia livre de Gibbs (ΔG^0) e a variação de entropia (ΔS^0) durante a desnaturação térmica, respectivamente (HEIDTMANN et al., 2012). Ressalta-se que valores elevados de ΔH^0 e ΔG^0 indicam uma maior estabilidade térmica do biocatalisador (FERREIRA, 2017).

$$\Delta H^0 = E_D - R \cdot T \quad (7)$$

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln \frac{K_D \cdot h}{K_B \cdot T} \quad (8)$$

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T} \quad (9)$$

sendo T a temperatura experimental (K), R a constante universal dos gases ideais ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), h a constante de Planck ($1,84 \cdot 10^{-37} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$) e K_B a constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$).

Com os resultados obtidos, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos apresentados acima foram então calculados e analisados.

4.2.5.7 Estabilidade da FTase armazenada sob diferentes pHs

A estabilidade frente ao pH da enzima micelial livre e imobilizada foi avaliada nos pHs de 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 8,5. Para isso, as enzimas foram incubadas por 24 horas a 4 °C nestes pHs e, após este período, suas atividades enzimáticas foram obtidas em triplicata conforme descrito no Item 4.2.3.

4.2.5.8 Estabilidade operacional em reciclagem da enzima livre e imobilizada

Após obter as melhores condições para o aprisionamento da biomassa celular nas esferas de alginato e caracterizá-las, avaliou-se o reuso da FTase microbiana imobilizada e livre para aplicação na produção de FOS.

Uma massa definida de biomassa foi utilizada na reação de produção de FOS (Item 4.2.3). Ao término de cada reação, o biocatalisador foi recuperado do meio reacional, lavado com água destilada em abundância para a remoção das moléculas de reagentes e/ou produtos do seu microambiente e utilizado novamente em uma reação de síntese de FOS, dando origem a um novo ciclo. Ao término de cada ciclo as atividades enzimáticas foram determinadas e quantificadas conforme descrito no Item 4.2.3. Dessa forma, foram obtidas as atividades do biocatalisador em função do número de ciclos de operação a que este foi submetido, ou seja, em função do número de vezes que uma mesma amostra foi reutilizada em reações de produção de FOS. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Neste item, foram conduzidos ensaios de reuso da biomassa livre e imobilizada durante 12 ciclos consecutivos, de uma hora cada. E, em um segundo caso, foram realizados 5 ciclos de uso, de 4 horas cada, para avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador após o esgotamento da sacarose no meio reacional.

4.2.6 Efeito das condições de reação na produção de FOS

Após a seleção da formulação (agentes reticulantes, tipo de alginato, diâmetro e concentração de biomassa) que produz as esferas contendo a biomassa aprisionada com o maior potencial enzimático, foi realizada uma série de ensaios visando determinar as atividades de transfrutossilacção e hidrolítica da FTase micelial livre e aprisionada.

4.2.6.1 Efeito da temperatura do meio reacional nas atividades de transfrutossilacção e hidrolítica

As atividades enzimáticas do biocatalisador livre e imobilizado foram determinadas variando-se a temperatura do meio reacional (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C), visando definir a temperatura ótima para a FTase micelial, ou seja, a temperatura de máxima atividade de transfrutossilacção. As atividades de transfrutossilacção e hidrolítica foram determinadas conforme descrito no Item 4.2.3. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.2.6.2 Efeito do pH do meio reacional nas atividades de transfrutossilacção e hidrolítica

As atividades enzimáticas para a enzima livre e imobilizada foram determinadas variando-se o pH do meio reacional (4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5), visando obter o pH ótimo da FTase micelial, ou seja, o pH de máxima atividade de transfrutossilacção. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as atividades enzimáticas foram determinadas conforme descrito no Item 4.2.3.

4.2.6.3 Influência da concentração de substrato e determinação dos parâmetros cinéticos

Para o estudo dos efeitos da concentração de substrato na cinética da enzima livre e imobilizada, as reações envolvendo a FTase micelial 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) nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 g.L⁻¹. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme descrito no Item 4.2.3.

A dependência da velocidade inicial de reação (V_0) em função da concentração de substrato (S), bem como a validade da aplicação dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e de Hill e a descrição desta dependência, foram obtidas a partir das Equações (15) e (16), respectivamente, que descrevem os modelos avaliados, por meio da determinação dos parâmetros cinéticos do biocatalisador livre e imobilizado (Michaelis-Menten: K_m e $V_{máx}$) (Hill: $K_{0,5}$, $V_{máx}$ e n).

$$V_0 = V_{máx} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (15)$$

$$V_0 = V_{máx} \cdot \frac{[S]^n}{[S]^n + (K_{0,5})^n} \quad (16)$$

sendo $V_{m\acute{a}x}$ a velocidade máxima de reação ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), K_m a constante de Michaelis-Menten ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), $K_{0,5}$ a constante de Hill ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e n o coeficiente de Hill.

A cinética enzimática de transfrutossilacão dos biocatalisadores livre e imobilizado (reticulado e aprisionado em gel de alginato) foi avaliada nos tempos de 30 e 60 segundos de reação, nas concentrações de sacarose de 100, 200, 400 e 600 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. As velocidades iniciais de transfrutossilacão foram determinadas nos dois tempos avaliados, para essas quatro concentrações de substrato, isto é, a inclinação da reta de gráficos de concentração de FOS versus tempo fornecem essas velocidades.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE MASSA SECA NO MICÉLIO ÚMIDO LIVRE E IMOBILIZADO

A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos para o teor de massa seca presente na biomassa úmida em quatro formas distintas, com a biomassa livre, reticulada com glutaraldeído e com a biomassa livre e reticulada com glutaraldeído aprisionadas em gel de alginato de baixa viscosidade utilizando $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de CaCl_2 como agente reticulante. Esses valores médios obtidos para a massa seca foram utilizados nas Equações (13) e (14) do Item 4.2.3 para o cálculo das atividades enzimáticas.

Tabela 5.1 - Teor de massa seca no micélio úmido da biomassa livre, reticulada com glutaraldeído, livre aprisionada e na biomassa reticulada com glutaraldeído, aprisionada em gel de alginato de baixa viscosidade.

Condição da biomassa	Teor de massa seca médio (%)
Livre	$12,9 \pm 0,27$
Reticulada	$12,8 \pm 0,19$
Livre aprisionada	$2,80 \pm 0,17$
Reticulada aprisionada	$2,85 \pm 0,12$

Fonte: Autora.

Os teores de massa seca médios encontrados, 2,80% e 2,85%, para a biomassa livre e reticulada aprisionadas, respectivamente, são inferiores aos 3,0% antecipados pela formulação apresentada na Tabela 4.1. Essa diferença pode ser atribuída à perda de matéria durante a filtração e na reticulação com glutaraldeído. Nos cálculos esses valores foram corrigidos, considerando a perda de material detectada.

5.2 DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DE TAMANHO DOS FILAMENTOS DO MICÉLIO

A distribuição de tamanhos dos filamentos da biomassa reticulada + alginato B.V. foi realizada por meio de espalhamento de luz laser (Item 4.2.4). As curvas da distribuição de tamanhos após a desintegração do material pelo Turrax[®] por 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 minutos a uma velocidade de 1.000 rpm se encontram na Figura 5.1, assim como a distribuição do material original, isto é, sem passar pela desintegração no Turrax[®]. As curvas indicam

valores de diâmetros médios obtidos a partir de seis leituras da mesma amostra, em diferentes tempos. Em todos os tempos de desintegração a distribuição de tamanhos dos filamentos obtida mostrou-se bimodal. Entretanto, com o material original a curva obtida foi monomodal. As curvas refletem, portanto, uma relação aproximada entre diâmetro e comprimento dos filamentos de biomassa. Mesmo assim, deixam evidente que a biomassa original (sem dispersão), com "diâmetro equivalente" em torno de 1500 μm , à medida que é submetida a um tratamento mais prolongado no Turrax[®], produz uma massa crescente de segmentos menores, mantendo um pico de distribuição em torno de 9 μm .

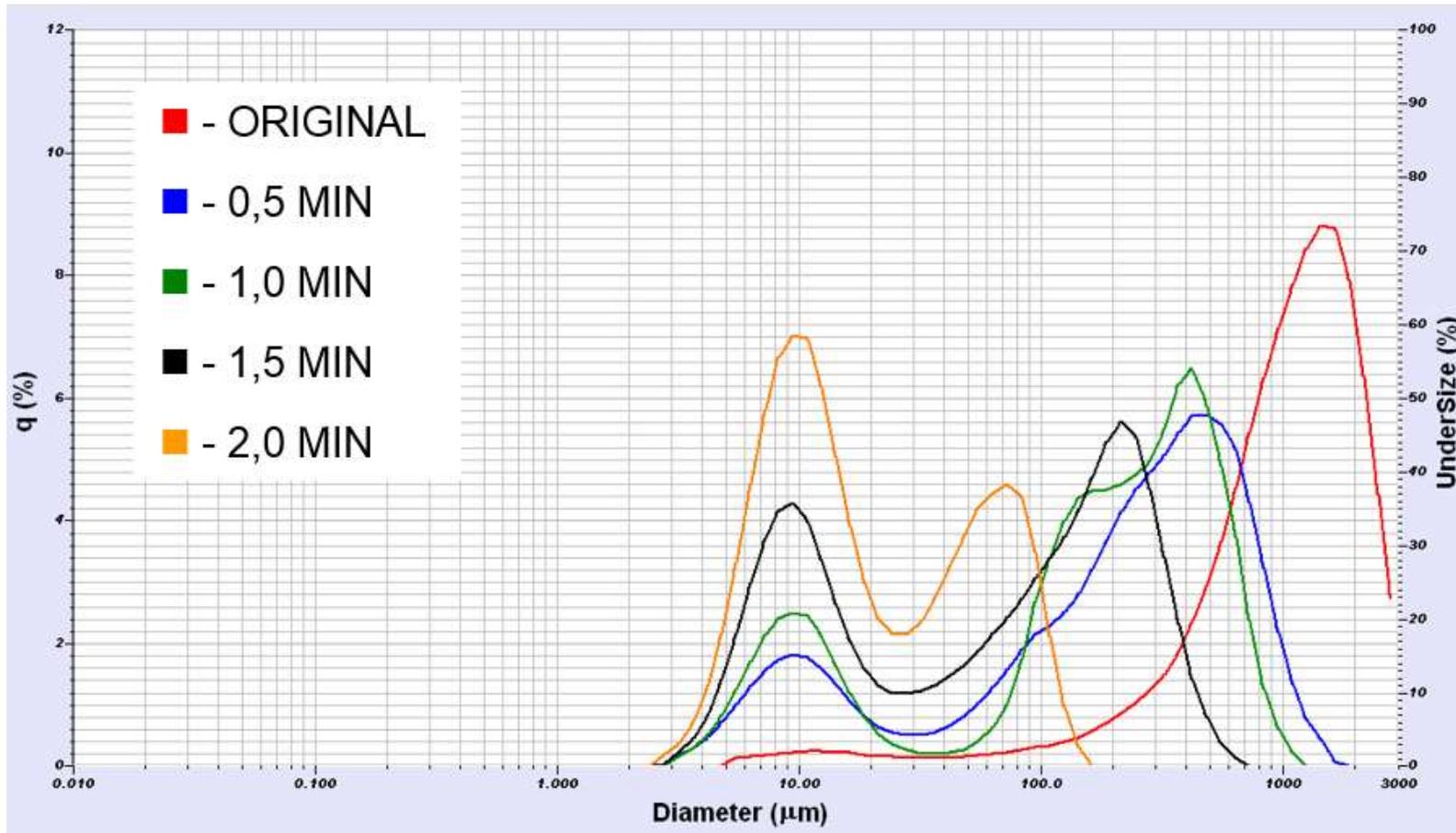


Figura 5.1 - Distribuição dos tamanhos dos filamentos da biomassa reticulada após dispersão mecânica da solução de alginato com o Turrax[®] por 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 minutos (1000 rpm) e da biomassa reticulada original (sem dispersão mecânica). Diâmetro das partículas em μm ; frequência em %.
Fonte: Autora.

Os diâmetros médios das partículas (mediana - D_{50} e decis - D_{10} a D_{90}) provenientes da distribuição dos tamanhos de partículas dessas amostras são mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Diâmetros médios de partículas: mediana (D_{50}) e decis (D_{10} a D_{90}) característicos da distribuição de tamanhos de filamentos da biomassa reticulada após dispersão mecânica da solução de alginato com o Turrax® por 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 minutos (1000 rpm) e da biomassa reticulada original (sem dispersão mecânica - 0 min).

Amostra	Diâmetro médio (μm)				
	0,0 min	0,5 min	1,0 min	1,5 min	2,0 min
D_{10}	$288,0 \pm 28,1$	$11,0 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,1$
D_{20}	$526,4 \pm 33,4$	$54,9 \pm 8,6$	$24,2 \pm 9,5$	$10,1 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,1$
D_{30}	$727,6 \pm 39,0$	$119,4 \pm 11,4$	$110,7 \pm 4,3$	$16,0 \pm 2,1$	$9,8 \pm 0,1$
D_{40}	$918,4 \pm 44,4$	$188,4 \pm 15,0$	$154,7 \pm 6,0$	$39,9 \pm 7,4$	$11,9 \pm 0,1$
D_{50}	$1107,4 \pm 50,2$	$260,5 \pm 18,8$	$209,1 \pm 8,7$	$82,1 \pm 8,1$	$15,2 \pm 0,3$
D_{60}	$1300,9 \pm 56,3$	$342,9 \pm 21,1$	$278,6 \pm 10,8$	$125,8 \pm 15,6$	$24,1 \pm 1,3$
D_{70}	$1509,8 \pm 62,4$	$438,8 \pm 22,4$	$358,3 \pm 10,7$	$170,6 \pm 18,2$	$41,9 \pm 2,7$
D_{80}	$1758,2 \pm 68,0$	$557,4 \pm 26,4$	$443,9 \pm 13,4$	$219,5 \pm 17,0$	$59,6 \pm 3,5$
D_{90}	$2116,6 \pm 72,9$	$729,9 \pm 36,6$	$564,7 \pm 19,8$	$287,0 \pm 18,5$	$80,5 \pm 4,0$

Coefficientes de variação (%): D_{10} : 9,75, D_{50} : 4,54 e D_{90} : 3,45 para 0,0 min. D_{10} : 4,91, D_{50} : 7,22 e D_{90} : 5,01 para 0,5 min. D_{10} : 2,20, D_{50} : 4,15 e D_{90} : 3,51 para 1,0 min. D_{10} : 1,58, D_{50} : 9,89 e D_{90} : 6,46 para 1,5 min. D_{10} : 0,89, D_{50} : 2,06 e D_{90} : 5,01 para 2,0 min.

Fonte: Autora.

A morfologia das partículas para cada um dos casos avaliados foi obtida como descrito no Item 4.2.4. Os resultados encontrados são mostrados nas Figuras 5.2 a 5.6.

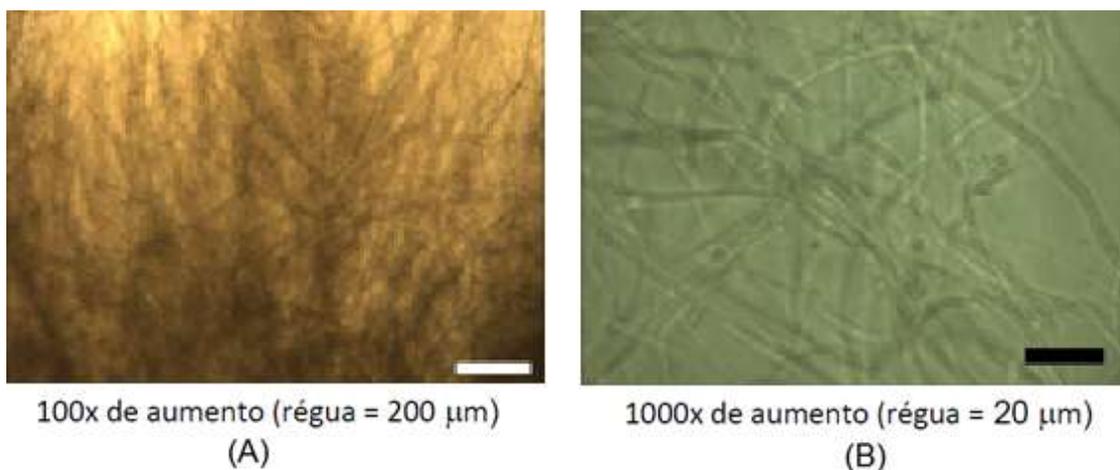


Figura 5.2 - Morfologia da amostra sem dispersão da biomassa reticulada.

Legenda: A) Aumento de 100 vezes - régua de 200 μm

B) Aumento de 1000 vezes - régua de 20 μm

Fonte: Autora.

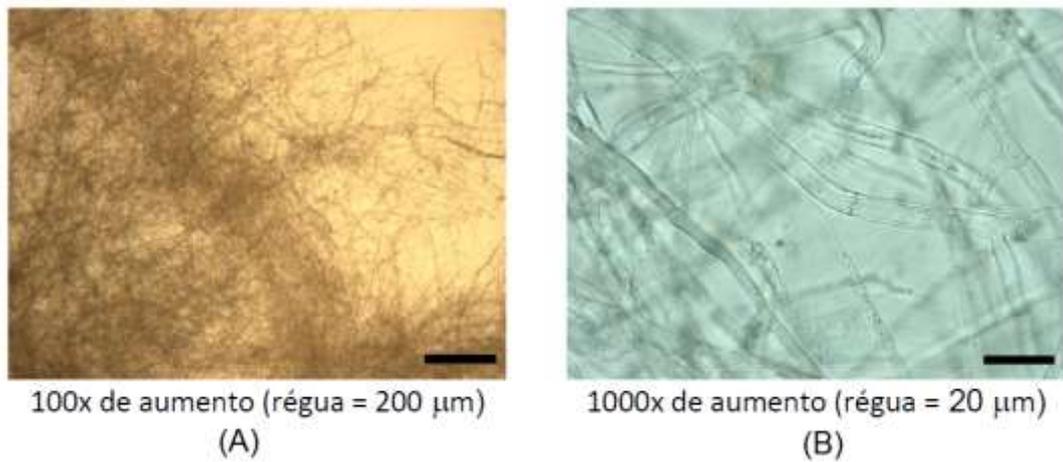


Figura 5.3 - Morfologia da amostra de 0,5 minuto de moagem da biomassa reticulada.

Legenda: A) Aumento de 100 vezes - régua de 200 μm

B) Aumento de 1000 vezes - régua de 20 μm

Fonte: Autora.

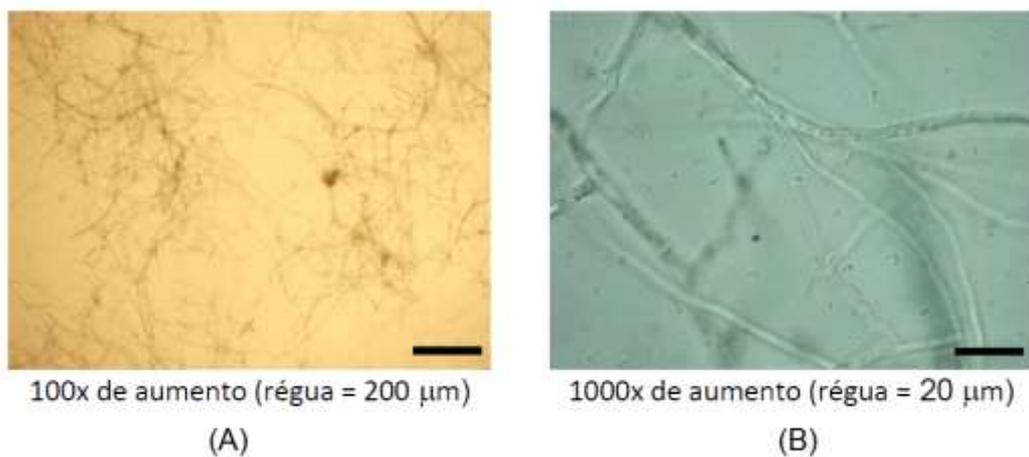


Figura 5.4 - Morfologia da amostra de 1,0 minuto de moagem da biomassa reticulada.

Legenda: A) Aumento de 100 vezes - régua de 200 μm

B) Aumento de 1000 vezes - régua de 20 μm

Fonte: Autora.

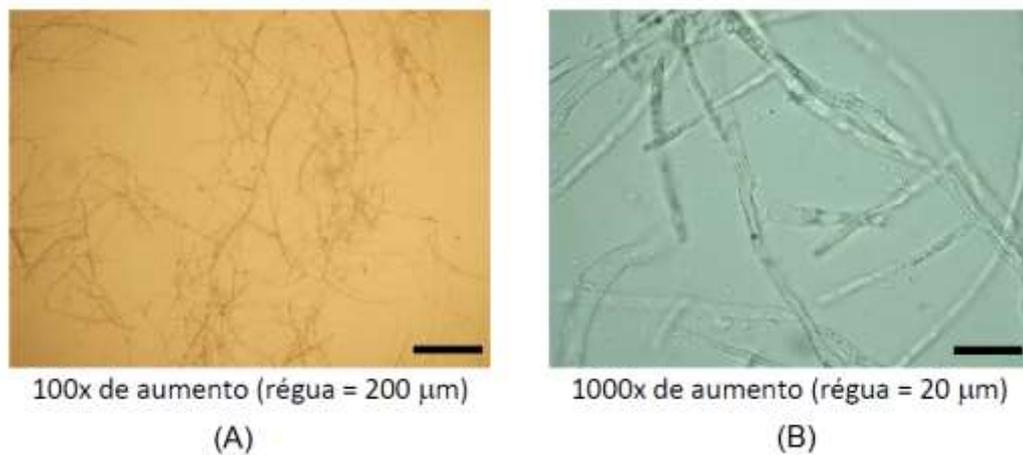


Figura 5.5 - Morfologia da amostra de 1,5 minutos de moagem da biomassa reticulada.

Legenda: A) Aumento de 100 vezes - régua de 200 µm

B) Aumento de 1000 vezes - régua de 20 µm

Fonte: Autora.

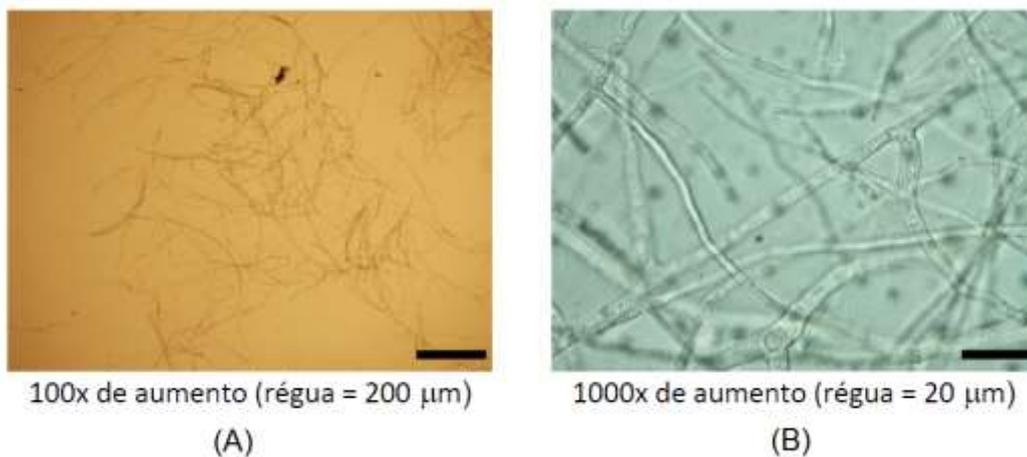


Figura 5.6 - Morfologia da amostra de 2,0 minutos de moagem da biomassa reticulada.

Legenda: A) Aumento de 100 vezes - régua de 200 µm

B) Aumento de 1000 vezes - régua de 20 µm

Fonte: Autora.

As imagens confirmam a natureza filamentosa da biomassa, típica de fungos. Acompanhando a sequência de micrografias (Figuras 5.2 a 5.6), é possível perceber o aumento do número de cortes desses filamentos, confirmando a redução nos valores medidos dos diâmetros equivalentes com o aumento no tempo de dispersão mecânica da solução de biomassa reticulada + alg. B.V., como mostrado na Figura 5.1 e na Tabela 5.2.

A ruptura dos filamentos promove a exsudação do conteúdo enzimático que, ao ser incorporado às esferas de alginato, incrementam a área superficial e, conseqüentemente, a taxa de reação química. A Figura 5.7 apresenta os resultados de atividade enzimática e seletividade em função do tempo de dispersão no Turrax®.

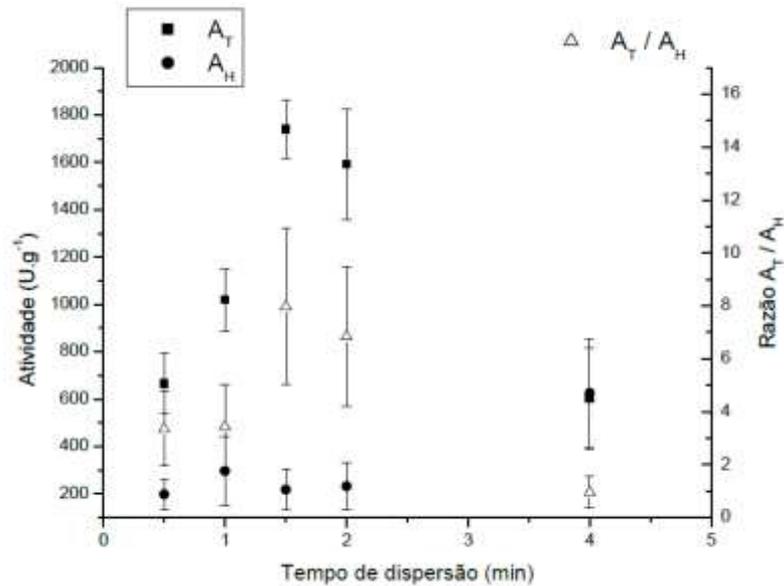


Figura 5.7 - Atividades de transfrutose e hidrólise da FTase micelar reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alginato B.V. utilizando o cálcio ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) como íon reticulante, e razões A_T/A_H , em função do tempo de dispersão em homogeneizador Turrax®.

Fonte: Autora.

Esses resultados indicaram um crescimento nas atividades de transfrutose e nos rendimentos de FOS até 1,5 minutos de dispersão no Turrax®, com um pequeno decréscimo em 2 minutos e uma redução ainda maior em 4 minutos de moagem.

Alguns autores promovem uma ruptura celular completa da estrutura da biomassa por dispersão usando o Turrax® (30 - 40 minutos) (HANG et al., 2017) ou por sonificação. Essas pesquisas, entretanto, enfrentam desprendimentos e/ou inativação quando essa biomassa é aprisionada. Como um compromisso entre os extremos, a presente pesquisa se limitou ao tratamento no Turrax® por 2 min.

5.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS BIOMASSA LIVRE E IMOBILIZADA

Ensaio para a definição do tipo de biomassa a ser utilizada foram realizados com a biomassa livre (1) e a biomassa reticulada com glutaraldeído (2), assim como com a biomassa livre envolvida em gel de alginato de baixa viscosidade (4,0% m/m), empregando $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de agente reticulante ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (3), e com a biomassa reticulada aprisionada em alginato, nas mesmas condições (4). Esses ensaios foram conduzidos em triplicata, isto é, para cada tipo de biomassa foi obtido um número suficiente de esferas para realizar reações em triplicata e, em cada reação, os produtos obtidos (açúcares redutores e glicose) foram determinados em duplicata.

Os valores das atividades para todas as condições citadas estão dispostos na Tabela 5.3. A tabela também apresenta resultados das atividades de transfrutossilacção obtidas empregando a biomassa livre e reticulada com glutaraldeído previamente dispersada manualmente pelo uso de um bastão de vidro por 2 minutos, já que o homogeneizador Turrax® não pôde ser utilizado nesses casos, pois a biomassa não estava em suspensão.

Tabela 5.3 - Atividades enzimáticas (transfrutossilacção e hidrolítica) das biomassas livre e imobilizada por diferentes métodos. Reacção enzimática: Temperatura de 50 °C, pH de 5,5 e concentração de substrato de 400 g.L⁻¹.

Condição		A _T (U.g ⁻¹)	A _H (U.g ⁻¹)	A _T /A _H
Biomassa livre	DM	1079 ± 41	251 ± 25	4,3 ± 4,2
	ND	696 ± 21	213 ± 121	3,3 ± 1,8
Biomassa reticulada	DM	1334 ± 88	399 ± 55	3,3 ± 0,4
	ND	986 ± 71	210 ± 62	4,7 ± 1,1
Biomassa livre aprisionada	D	1320 ± 103	188 ± 44	7,0 ± 0,9
Biomassa reticulada aprisionada	D	1642 ± 43	135 ± 35	12,1 ± 2,3

D: biomassa dispersada com Turrax®; DM: biomassa dispersada manualmente; ND: biomassa não dispersada.
Fonte: Autora.

Analisando os valores da Tabela 5.3 verifica-se que os desvios-padrão obtidos são elevados, o que tem sido frequente em reacções enzimáticas (XIE et al., 2012; NEVES, 2015; MAGALHÃES, 2010).

Considerando os valores médios da Tabela 5.3, a tendência mais contundente que se pode confirmar é o benefício de se efetuar uma dispersão prévia da biomassa, com rompimento dos filamentos miceliais e possível exsudação de seu conteúdo enzimático. Esse ganho já é notável com uma simples dispersão manual da biomassa livre e da biomassa reticulada com glutaraldeído, produzindo incrementos na atividade de transfrutossilacção da ordem de 40%. A possibilidade de utilizar o Turrax® na solução de alimentação do sistema de gotejamento torna o processo de dispersão mais eficiente e estanque, e quando complementado com o aprisionamento, produz os valores mais altos de A_T. O incremento obtido com a biomassa livre aprisionada em relação à biomassa livre natural é da ordem de 90%, enquanto que essa relação para a biomassa reticulada é de 66%. Esses ganhos obtidos com a dispersão mais eficiente dos filamentos miceliais tornam inócuas quaisquer tentativas de quantificar efeitos difusionais ou perdas por lixiviação atribuíveis ao processo de imobilização, pela comparação entre reacções com e sem envolvimento, uma vez que a disponibilidade dos agentes ativos é diferente nos dois casos.

Uma outra tendência extremamente favorável à seletividade da reação ao se implementar a imobilização da carga enzimática, é o aumento da A_T associado a uma diminuição da A_H . As razões A_T/A_H são superiores aos valores encontrados com a biomassa não dispersada antes da reação. Observou-se uma queda na A_H com o uso da biomassa livre aprisionada e com o micélio reticulado aprisionado, de 251 U.g⁻¹ (biomassa livre) para 188 e 135 U.g⁻¹, respectivamente. No caso da biomassa somente reticulada com glutaraldeído, houve um aumento na A_H com a dispersão prévia da biomassa (399 U.g⁻¹), enquanto o material não homogeneizado manteve sua atividade hidrolítica praticamente constante.

No caso da reticulação essa melhoria na A_T pode ser atribuída a presença do glutaraldeído, o qual possui a capacidade de aumentar a estabilidade enzimática, tornando o biocatalisador menos vulnerável à perda de atividade ao longo de uma reação (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005). Além disso, o processo de reticulação também pode provocar um aumento na resistência da enzima à extração por água durante a lavagem do micélio, reduzindo as perdas da enzima por arraste, como descrito por Long et al. (1996) para a reticulação da lipase aderida ao micélio de *Aspergillus flavus*.

O envolvimento, por sua vez, proporciona a retenção da atividade enzimática, pois não envolve ligações químicas entre o suporte e a proteína, possibilitando uma modificação mínima na estrutura da enzima, não promovendo a inativação ou a distorção de seu sítio ativo (ZUCCA e SANJUST, 2014), além de proteger o biocatalisador do contato direto com o meio reacional, impedindo a perda da enzima aprisionada (GANAIE; LATEEF, GUPTA, 2014a). Os problemas envolvendo o desprendimento do biocatalisador (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012) e limitações difusionais (BRADY e JORDAAN, 2009; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009) podem ter sido minimizados pelo cruzamento prévio da enzima com o agente bifuncional (glutaraldeído) (BRADY e JORDAAN, 2009; FERNANDES, 2010). Dessa forma, a combinação dessas melhorias proporcionadas à estabilidade e atividade do biocatalisador pelo processo de reticulação com glutaraldeído e pelo envolvimento em alginato, fez com que a biomassa reticulada aprisionada apresentasse o melhor rendimento dentre os três casos estudados, e, de certo modo, compensa possíveis limitações difusionais (BRADY e JORDAAN, 2009; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

A redução da atividade hidrolítica após a imobilização da biomassa pode ser atribuída a um aumento na afinidade entre a enzima e a sacarose (substrato). Durante a reação enzimática, ocorre uma competição entre a molécula de água e a de sacarose na transferência do grupo frutossil, a qual depende da afinidade entre enzima e substrato (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007). Essa alteração de afinidade promove um aumento

na frequência das reações de transferência de um grupo frutossil para uma molécula de sacarose, ocasionando uma melhoria na atividade de transfrutossilção e reduzindo a transferência de grupos frutossil para o meio aquoso (atividade hidrolítica).

De acordo com Mattiasson e Hahn-Hagerdal (1982), a imobilização de enzimas tende a reduzir a atividade da água, i.e., diminui o conteúdo de água livre, reduzindo assim a disponibilidade de moléculas de água para a hidrólise. Dessa forma, com um aumento nas atividades de transfrutossilção da FTase micelial imobilizada e uma redução nas atividades hidrolíticas, as razões A_T/A_H são favorecidas, e, conseqüentemente, quanto maiores as razões obtidas, maiores são os rendimentos para a produção de frutooligossacarídeos associados (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; MARESMA et al., 2010).

Por fim, os melhores resultados obtidos para a enzima reticulada aprisionada (A_T : 1642 U.g⁻¹, A_H :135 U.g⁻¹, A_T/A_H : 12,1) com relação à enzima livre aprisionada (A_T : 1320 U.g⁻¹, A_H :188 U.g⁻¹, A_T/A_H : 7,0) podem também estar relacionados à aglomeração da biomassa causada pelo glutaraldeído, que muito provavelmente melhorou a difusão do substrato através das esferas (BARRANCO-FLORIDO et al., 2001).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE FTASE IMOBILIZADA

5.4.1 Efeito da concentração do cátion reticulante

Os ensaios de obtenção das esferas de alginato (baixa e média viscosidade) utilizando a biomassa reticulada foram conduzidos utilizando o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agentes reticulantes. Com o cloreto de cálcio foram avaliadas as concentrações de 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5 e 1,0 mol.L⁻¹ e para o cloreto de bário foram utilizadas as concentrações de 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹. Os testes foram conduzidos em triplicata.

Nesses ensaios, apenas um bico de gotejamento (0,7 mm) foi utilizado e as condições de reação de transfrutossilção padrão (ver Item 4.2.3.1) foram utilizadas.

5.4.1.1 Agente reticulante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A Figura 5.8 apresenta as atividades obtidas com diferentes graus de reticulação com Ca^{2+} , usando esferas produzidas com o alginato de baixa viscosidade.

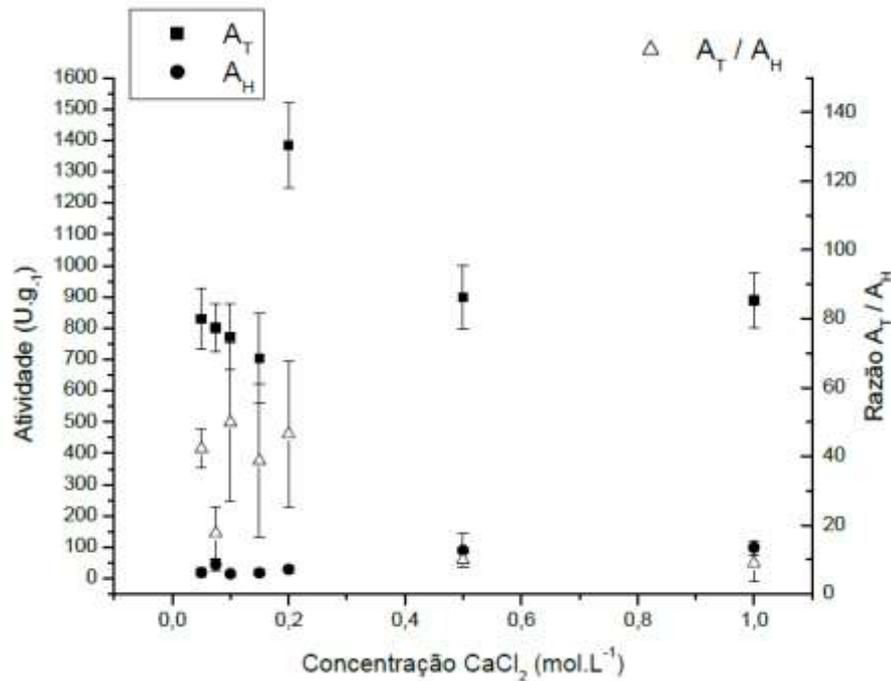


Figura 5.8 - Atividades enzimáticas de transfrutossilatação e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. B.V. (4% m/m) utilizando biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U.g}^{-1}$).

Fonte: Autora.

Os resultados apresentados na Figura 5.8 indicaram que a concentração ótima de cloreto de cálcio ocorre em torno de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Nesse ponto, a atividade de transfrutossilatação é máxima ($1383 \pm 134 \text{ U.g}^{-1}$), a atividade hidrolítica é baixa ($29 \pm 12 \text{ U.g}^{-1}$) e, conseqüentemente, a razão A_T/A_H associada é elevada (46), o que indica um alto rendimento de FOS. Ouwerx et al. (1998) e Klock e Melvik et al. (2002) relataram a impossibilidade de se produzir esferas com concentrações de Ca^{2+} inferiores a $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ para alginatos de alta proporção de grupos M/G, também conhecidos como alginatos de alto M, que é o tipo de biopolímero empregado nessa pesquisa. As esferas obtidas utilizando concentrações de CaCl_2 menores que $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ eram frágeis, isto é, se desestruturavam facilmente com a compressão.

Além disso, foi observado que quanto maior é a concentração de CaCl_2 , mais esférico é o formato da partícula obtida, a qual apresentava um tamanho uniforme, homogeneidade visual e uma textura adequada, como mostrado na Figura 5.9, que apresenta a fotografia de algumas partículas obtidas nas condições de Ca otimizadas. Observa-se que o formato esférico predomina com ligeira tendência para um esferoide prolato. As partículas esféricas representam a forma geométrica mais comum para aplicação na imobilização de células e enzimas, proporcionando uma redução nas limitações difusionais, além de um aumento na estabilidade mecânica e química (DE-BASHAN e BASHAN, 2010).

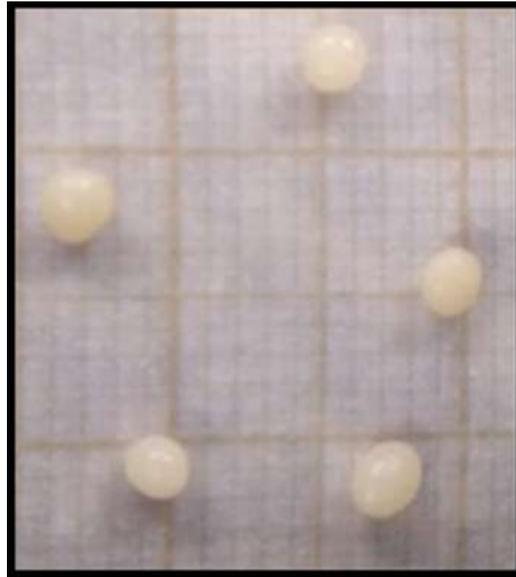


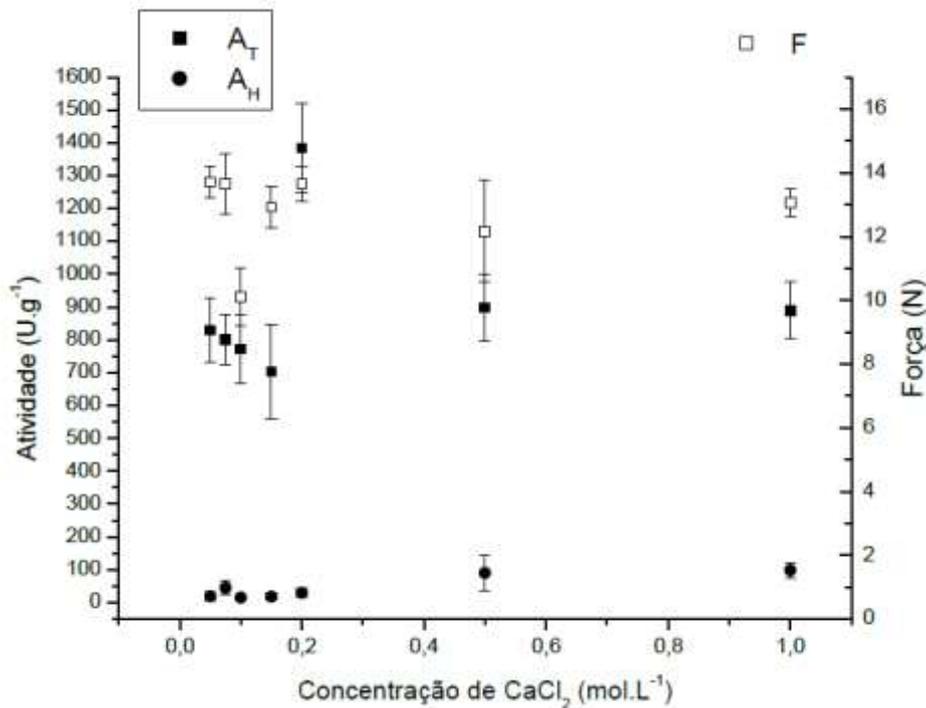
Figura 5.9 - Fotografia de esferas de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com 0,2 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O.

Fonte: Autora.

A elevação da concentração de íons Ca²⁺ promove uma aceleração na cinética de gelificação, resultando em um rápido aprisionamento e estabilização das esferas (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006). Em contrapartida, a utilização de altas concentrações de solução de cloreto de cálcio pode ocasionar dificuldades com relação ao fluxo de substrato e produtos, impondo limitações difusionais ao uso do biocatalisador (COVIZZI et al., 2007; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

De acordo com Ganaie et al. (2014b), em concentrações de CaCl₂ acima de 1% m/v, a atividade da FTase diminuiu devido a alterações no pH ótimo, fazendo com que surgissem problemas relacionados à difusão do substrato nas esferas. Roig, Rashid e Kenndy (1995) também relataram uma diminuição na atividade da protease com o aumento na concentração do agente de reticulação, bloqueando seus sítios ativos e inativando o biocatalisador. Por essa razão deve-se trabalhar em uma faixa média de concentração de CaCl₂, como no caso da concentração ótima de trabalho definida nessa pesquisa (0,2 mol.L⁻¹), não impondo limitações ao uso do biocatalisador imobilizado.

A resistência mecânica à compressão das esferas de alg. B.V. reticuladas com soluções de diferentes concentrações de CaCl₂ está apresentada na Figura 5.10.



F: Força de resistência limite à compressão mecânica.

Figura 5.10 - Resistência mecânica das esferas de alg. B.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de cálcio.

Fonte: Autora.

De-Bashan e Bashan (2010) afirmaram que a resistência à compressão tende a aumentar com a elevação da concentração do agente reticulante utilizado para a produção das esferas. Registra-se, porém, que os valores encontrados para a força de resistência limite à compressão na Figura 5.10 não são afetados de forma significativa pela variação nas concentrações de cloreto de cálcio. Na condição ótima apontada pela Figura 5.8 (0,2 mol.L⁻¹) a resistência mecânica obtida foi de $13,6 \pm 0,5$ N, um dos valores mais altos entre os obtidos para as concentrações testadas.

Dessa forma, considerando os resultados demonstrados, a concentração de cloreto de cálcio selecionada para a produção das esferas de alginato B.V. utilizando a biomassa reticulada foi de 0,2 mol.L⁻¹, por apresentar elevada atividade de transfrutossilagem e baixa atividade hidrolítica, o que resulta em uma razão A_T/A_H alta, associada à obtenção de partículas resistentes e esféricas.

A Figura 5.11 mostra as atividades de transfrutossilagem e hidrolítica exibidas pela FTase micelial reticulada e aprisionada em esferas de alg. M.V. (1,2% m/m), além das respectivas razões A_T/A_H para diferentes concentrações de cloreto de cálcio. Não foi possível manter um

fluxo contínuo de gotas com soluções de alg. M.V. em concentrações superiores a 1,2% m/m, pois foram verificadas dificuldades no bombeamento e bloqueios no bocal de gotejamento.

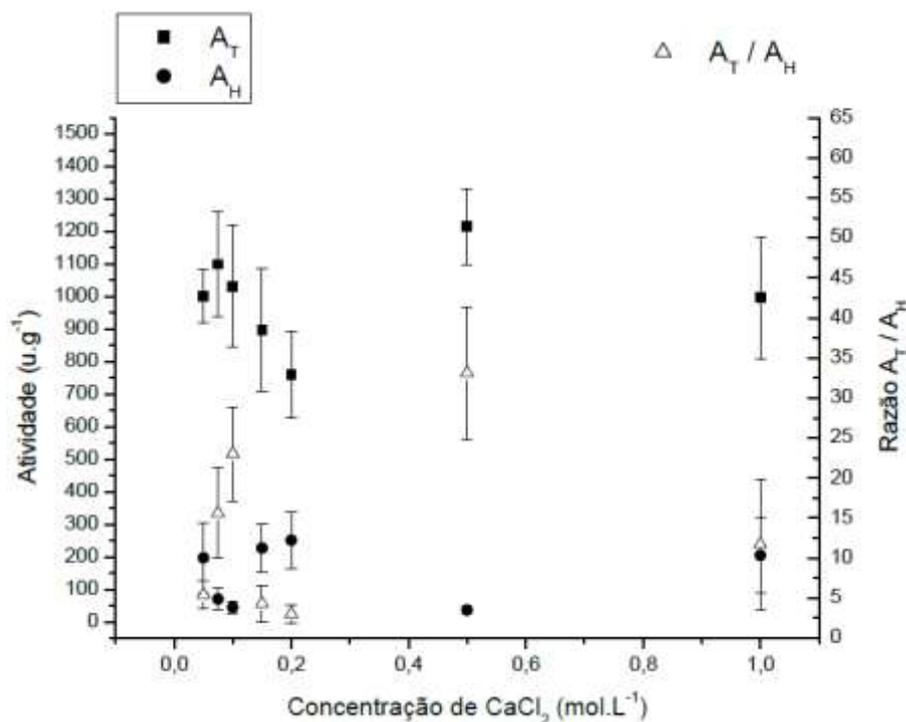


Figura 5.11 - Atividades enzimáticas de transfrutossilação e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando a biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U.g}^{-1}$).

Fonte: Autora.

Os resultados apresentados na Figura 5.11 indicaram que a concentração ótima de cloreto de cálcio ocorre em torno de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Nesse ponto, a atividade de transfrutossilação é máxima ($1215 \pm 117 \text{ U.g}^{-1}$), a atividade hidrolítica é mínima ($37 \pm 11 \text{ U.g}^{-1}$) e, conseqüentemente, a razão A_T/A_H associada também é a maior dentro do intervalo testado (33), o que indica um elevado rendimento em FOS.

Baixas concentrações de Ca^{2+} impossibilitaram a formação de esferas resistentes e altas concentrações de cloreto de cálcio podem ter ocasionado limitações difusionais ao uso do biocatalisador (COVIZZI et al., 2007; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009), resultando em baixas razões A_T/A_H nesses extremos. Comparando esses resultados com os obtidos com o alginato de baixa viscosidade, verifica-se que houve uma redução nas A_{TS} , um aumento nas A_{HS} , e, conseqüentemente, uma diminuição nas razões A_T/A_H , isto é, nos rendimentos de FOS obtidos.

Com o alginato de média viscosidade não foram obtidas partículas de formato esférico como no caso do alginato de baixa viscosidade. As partículas apresentaram formato de gota, com leves pontas, e achatadas, como mostrado na Figura 5.12.



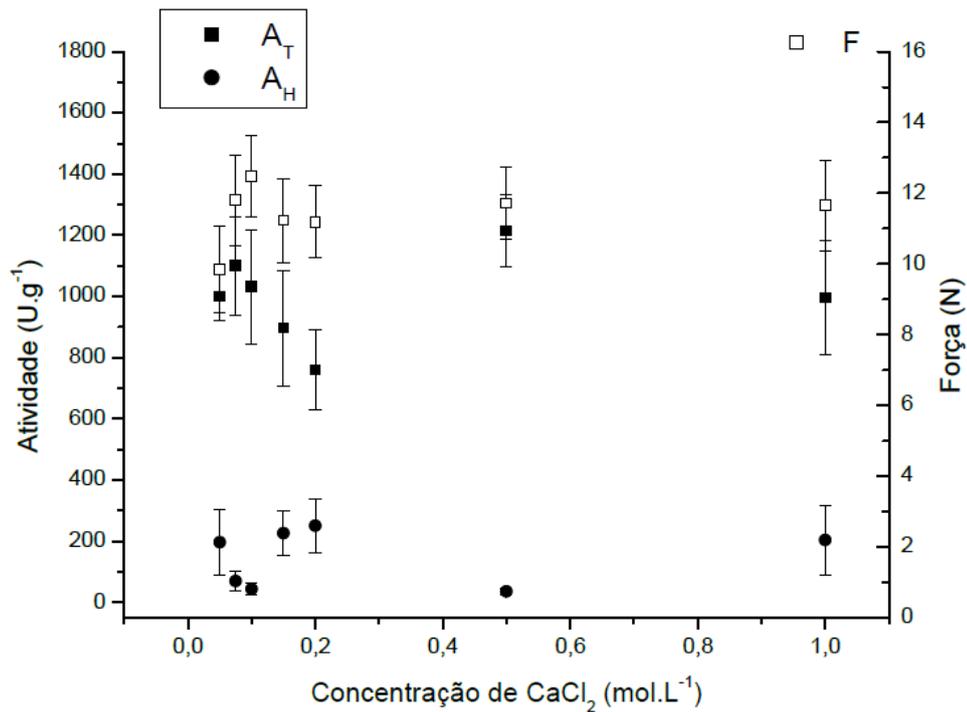
Figura 5.12 - Fotografia de esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Autora.

Ao serem gotejadas sobre a solução de CaCl_2 , as gotas de alginato precisam superar a elevada tensão superficial estabelecida durante o impacto e, por conta disso, podem se deformar após a penetração na solução reticulante (SEIFERT e PHILIPS, 1997). Um formato não esférico das partículas, segundo Lee, Ravindra e Chan (2013), reduz a força do gel em comparação com partículas esféricas. As partículas obtidas com o alg. B.V. (Figura 5.9) apresentaram um formato mais esférico do que as mostradas na Figura 5.12 e forneceram, portanto, melhores rendimentos de FOS.

A força de resistência mecânica à compressão das esferas de alginato de média viscosidade utilizando cloreto de cálcio como íon reticulante está apresentada na Figura 5.13.

Assim como já foi apontado para o alginato de baixa viscosidade, os pontos experimentais não foram afetados pela variação nas concentrações de cloreto de cálcio. Na condição ótima indicada na Figura 5.11 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de CaCl_2) a força de resistência mecânica obtida foi de $12 \pm 1,0 \text{ N}$. A resistência média obtida para o alginato de média viscosidade ($11,4 \pm 0,8 \text{ N}$) não se mostrou estatisticamente diferente da resistência média obtida para o alginato de baixa viscosidade ($12,7 \pm 1,3 \text{ N}$).



F: Força de resistência limite à compressão mecânica.

Figura 5.13 - Resistência mecânica das esferas de alg. M.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de cálcio.

Fonte: Autora.

De maneira geral, os resultados apontados para o alginato de média viscosidade indicaram a formação de partículas não esféricas, com formato de gota, e uma redução nos rendimentos de FOS com relação aos resultados obtidos com o alginato de baixa viscosidade. Portanto, a utilização do alginato de baixa viscosidade proporcionou melhores resultados no que diz respeito à estimativa da produção de frutooligossacarídeos.

5.4.1.2 Agente reticulante BaCl₂.2H₂O

Também foram conduzidos experimentos com os alginatos de baixa viscosidade (4,0% m/m) e de média viscosidade (1,2% m/m) utilizando diferentes concentrações de cloreto de bário (0,01, 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 mol.L⁻¹), empregando a biomassa reticulada. A Figura 5.14 apresenta as atividades de transfrutossilacção e hidrolítica obtidas empregando o alginato de baixa viscosidade na formação das esferas, assim como as razões A_T/A_H associadas a cada caso.

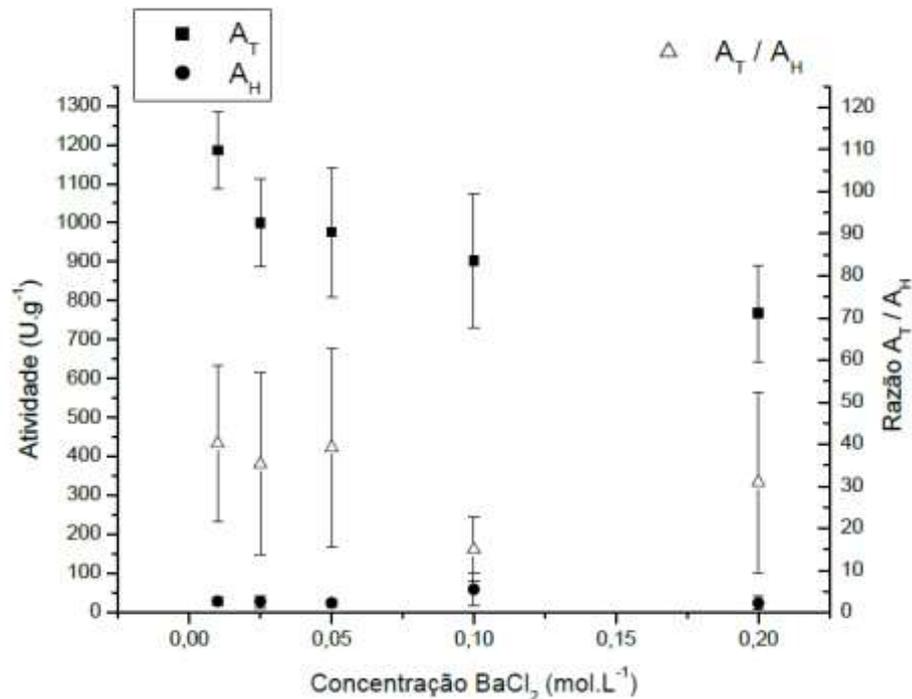


Figura 5.14 - Atividades enzimáticas de transfrutossilção e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ em esferas de alg. B.V. (4% m/m) utilizando biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 U.g^{-1}$).

Fonte: Autora.

Diferentemente dos resultados das Figuras 5.8 e 5.11, a atividade de transfrutossilção com Ba^{2+} decresceu continuamente com o aumento da concentração do reticulante. Desta forma, dentro dos limites investigados, a concentração ótima de cloreto de bário está em torno de $0,01 mol.L^{-1}$. Nesse ponto, a atividade de transfrutossilção é máxima ($1186 \pm 100 U.g^{-1}$), a atividade hidrolítica é baixa ($29 \pm 11 U.g^{-1}$) e, conseqüentemente, a razão A_T/A_H é elevada (40), o que indica um alto rendimento em FOS. Entretanto, considerando os desvios obtidos, a razão A_T/A_H foi similar na faixa de concentração de reticulante de $0,01$ a $0,05 mol.L^{-1}$. Portanto, a A_T foi o fator determinante para o estabelecimento da concentração ótima de $BaCl_2$ a ser empregada na obtenção das esferas. A razão A_T/A_H encontrada foi inferior ao caso em que se utilizou cloreto de cálcio como agente reticulante e alginato de baixa viscosidade (46), porém superior ao valor obtido com o alginato de média viscosidade e $CaCl_2$ (33). No entanto, na concentração ótima, não houve a formação de esferas. As partículas apresentaram formato de gota, assim como no caso do alginato de média viscosidade utilizando $CaCl_2$, como mostrado na Figura 5.15. Como mencionado anteriormente, partículas de formato não esférico reduzem a força do gel e os rendimentos obtidos em comparação com partículas esféricas devido a efeitos relacionados à transferência de massa (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013), e, de fato, nessa pesquisa, as concentrações muito baixas de cloreto de bário impossibilitaram a formação de esferas resistentes.

Dias, Rezende e Linardi (2000) relataram uma diminuição nas atividades enzimáticas ao utilizar células imobilizadas em alginato empregando o cloreto de bário como agente reticulante. Essa redução, segundo os autores, pode ter sido provocada pelo uso do bário, que reduziu o número de células vivas. Este fato pode ter ocorrido pela inibição causada pelo bário na ação das enzimas nitrilases. No presente estudo, o bário pode ter atuado da mesma forma, reduzindo as atividades de transfrutossilacção obtidas e, conseqüentemente, as razões A_T/A_H , impactando diretamente nos rendimentos de FOS.

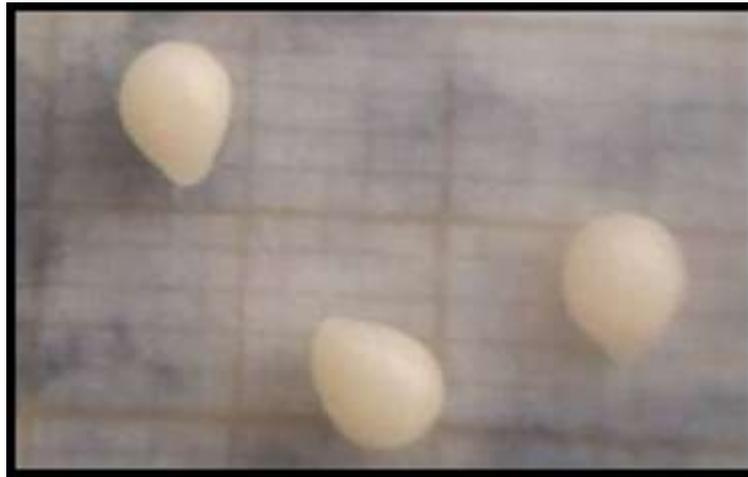


Figura 5.15 - Fotografia de esferas de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

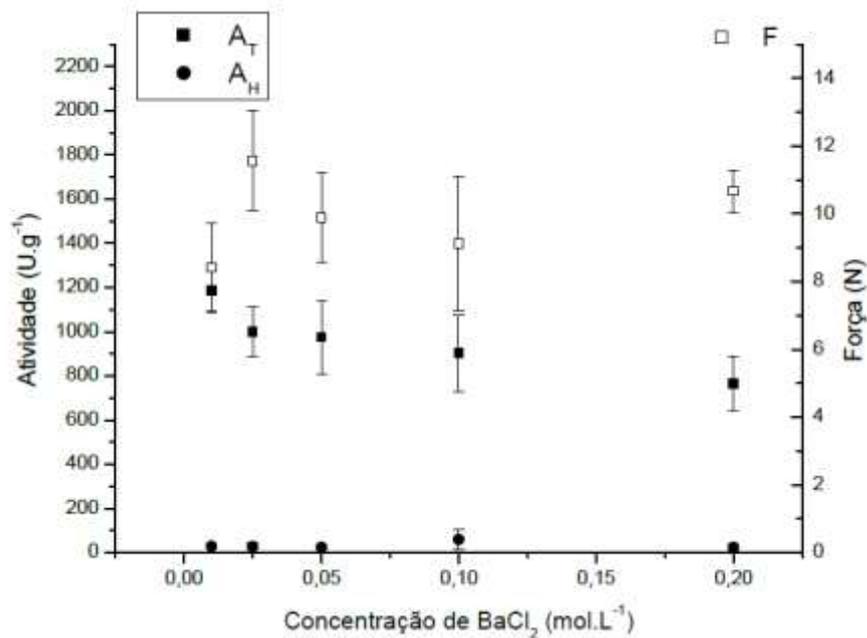
Fonte: Autora.

De acordo com Mørch et al. (2006), quando se utiliza um alginato com elevado teor de blocos M (alginato de alto M), que foi o empregado nessa pesquisa, ao substituir Ca^{2+} por Ba^{2+} como íon reticulante na produção das esferas, obtém-se uma ligação de íons menos eficiente nas junções do polímero. Por conta disso, os autores não observaram um efeito benéfico na estabilidade e na permeabilidade do gel quando gelificado em Ba^{2+} , em oposição ao alginato de cálcio de alto M.

A força de resistência mecânica à compressão das esferas de alginato de baixa viscosidade utilizando cloreto de bário nas concentrações testadas é apresentada na Figura 5.16.

Assim como descrito anteriormente ao utilizar o cloreto de cálcio, com o cloreto de bário a resistência à compressão mecânica não se altera significativamente com a variação nas concentrações de BaCl_2 . Observa-se uma tendência de aumento da resistência à medida que a concentração de Ba^{2+} diminui. Mas na condição ótima de produção de FOS indicada na Figura 5.14 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) a força de resistência mecânica diminuiu para $8,4 \pm 1,3 \text{ N}$, e representa o menor valor encontrado entre as concentrações testadas. Além disso, a resistência média obtida nesse caso foi de $9,9 \pm 1,2 \text{ N}$, resultado inferior à resistência média obtida com o alginato de

baixa viscosidade ($13 \pm 1,3$ N) e com o alginato de média viscosidade ($11 \pm 0,8$ N), utilizando CaCl_2 como agente reticulante. Esse resultado está de acordo com Mørch et al. (2006), que relataram que alginatos com alto teor de M reticulados com cloreto de cálcio formam géis mais fortes e resistentes em comparação com os géis obtidos utilizando o cloreto de bário. As partículas produzidas com bário foram brancas, fracas e leitosas.



F: Força de resistência limite à compressão mecânica.

Figura 5.16 - Resistência mecânica das esferas de alg. B.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de bário.

Fonte: Autora.

A Figura 5.17 apresenta as atividades de transfrutose e hidrolíticas obtidas empregando o alginato de média viscosidade e o cloreto de bário no aprisionamento da biomassa reticulada, assim como as razões A_T/A_H associadas a cada caso.

Analisando a Figura 5.17, verifica-se que a concentração ótima de cloreto de bário ocorreu em torno de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, onde a atividade de transfrutose é máxima ($1054 \pm 134 \text{ U.g}^{-1}$), a atividade hidrolítica é baixa ($38 \pm 13 \text{ U.g}^{-1}$) e, conseqüentemente, a razão A_T/A_H é elevada (28). Esse valor, porém, é inferior à razão obtida utilizando o cloreto de bário e o alginato de baixa viscosidade (40). Portanto, essa condição apresentou o menor rendimento de FOS entre os quatro casos estudados. Além disso, também não foram formadas partículas de formato esférico, como mostrado na Figura 5.18.

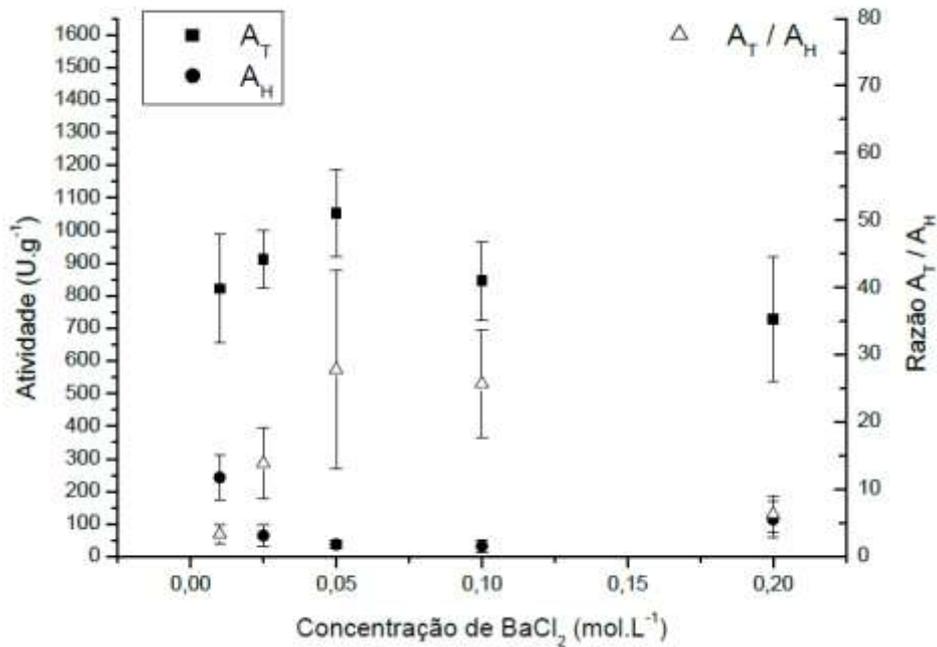


Figura 5.17 - Atividades enzimáticas de transfrutossilação e hidrolítica e razões A_T/A_H em função da concentração de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando biomassa reticulada com glutaraldeído (A_T biomassa livre não dispersada: $590,28 \pm 12,01 \text{ U.g}^{-1}$).

Fonte: Autora.



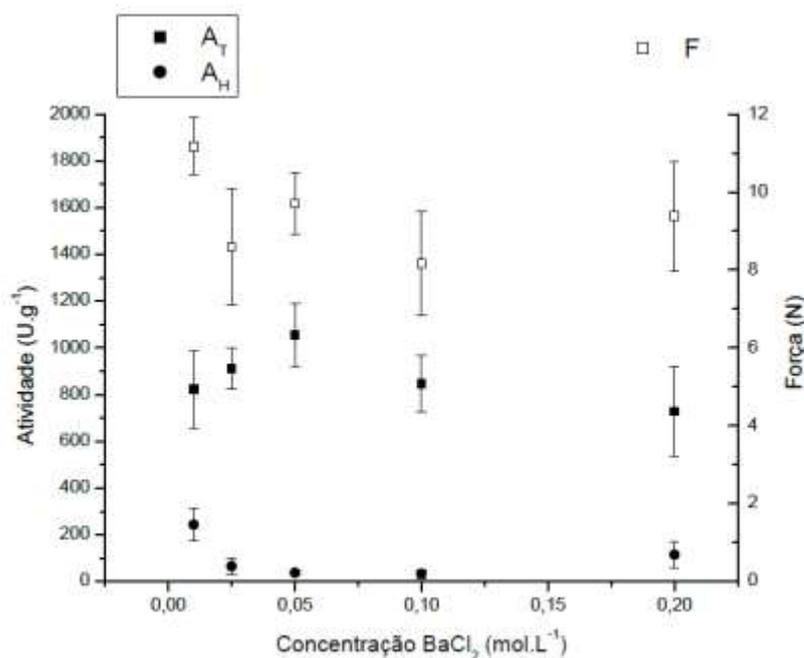
Figura 5.18 - Fotografia de esferas de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, reticuladas com $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Autora.

Com o alginato de média viscosidade, a redução nas atividades enzimáticas ao empregar o cloreto de bário como agente de reticulação foi ainda mais evidente do que com o alginato de baixa viscosidade, afetando diretamente as razões A_T/A_H obtidas. Com isso, verificou-se que o tipo de alginato empregado e sua viscosidade, assim como o íon de reticulação e sua concentração, são cruciais para as características das esferas contendo a biomassa reticulada.

Segundo Mørch et al. (2006), o uso de bário resultou em uma maior estabilidade e força das esferas ao utilizar um alginato de alto G. Além disso, a permeabilidade foi reduzida ao trocar os íons de cálcio por íons de bário. Por outro lado, com o alginato de alto M, o mesmo empregado nessa pesquisa, não se observou um efeito benéfico nesses parâmetros ao empregar o cloreto de bário na reticulação. Esse resultado da literatura segue a mesma tendência dos dados encontrados para o presente trabalho.

A força de resistência mecânica à compressão das esferas de alginato de média viscosidade utilizando cloreto de bário é apresentada na Figura 5.19. Como nos casos anteriores, a resistência à compressão não sofre grandes variações com as mudanças nas concentrações de BaCl_2 . Para a condição ótima mostrada na Figura 5.17 ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) a força de resistência mecânica obtida foi de $9,7 \pm 0,8 \text{ N}$, um dos maiores valores dentre as concentrações testadas, apesar de não ser estatisticamente representativo. A resistência média obtida nesse caso foi de $9,4 \pm 1,1 \text{ N}$, resultado semelhante ao obtido utilizando o alginato de baixa viscosidade e BaCl_2 ($9,9 \pm 1,2 \text{ N}$). Em ambos os casos, entretanto, a resistência média é menor do que a apresentada para as esferas obtidas com o CaCl_2 .



F: Força de resistência limite à compressão mecânica.

Figura 5.19 - Resistência mecânica das esferas de alg. M.V. contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído e reticulada por imersão em soluções de diferentes concentrações de cloreto de bário.

Fonte: Autora.

Essas tendências encontradas permitem concluir que o cloreto de bário não se apresenta como um agente reticulante eficiente na obtenção de esferas de alginato contendo a biomassa reticulada. Dessa forma, foi possível verificar que a estrutura da matriz do suporte tem

fundamental importância para a atividade catalítica e seu desempenho, afetando a atividade enzimática (DIAS; REZENDE; LINARDI, 2000).

Em conclusão, essa sequência de ensaios indicou que a condição que proporciona os melhores resultados no que diz respeito à estimativa da produção de frutooligossacarídeos se baseia na utilização do alginato de baixa viscosidade e do cloreto de cálcio como agente reticulante, na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, como mostrado na Tabela 5.4, que reinterpreta os resultados das condições ótimas de reticulação estabelecidas para os quatro casos apresentados.

Tabela 5.4 - Atividades de transfrutossilacção e hidrolíticas, razões A_T/A_H e forças de resistência à compressão mecânica obtidas nas condições ótimas de reticulação, com os alginatos de baixa e média viscosidade.

Tipo de alginato	Tipo de agente reticulante	Forças de compressão (N)	A_T (U.g^{-1})	A_H (U.g^{-1})	A_T/A_H
Baixa viscosidade	Ca^{2+}	$13,6 \pm 0,5$	1383 ± 134	29 ± 12	48
	Ba^{2+}	$8,4 \pm 1,3$	1186 ± 100	29 ± 11	41
Média viscosidade	Ca^{2+}	$11,7 \pm 1,0$	1215 ± 117	36 ± 11	34
	Ba^{2+}	$9,7 \pm 0,8$	1054 ± 134	38 ± 13	28

Fonte: Autora.

5.4.2 Efeito do diâmetro médio das esferas de alginato

Foram conduzidos ensaios variando-se o diâmetro médio das esferas de alginato produzidas, novamente utilizando o alginato de baixa viscosidade e o de média viscosidade e o Ca^{2+} e Ba^{2+} como íons reticulantes, com o intuito de investigar os efeitos causados pelo tamanho da partícula nas atividades enzimáticas. As condições otimizadas de concentrações dos agentes reticulantes foram utilizadas ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e alg. B.V., $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e alg. M.V., $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e alg. B.V. e $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e alg. M.V.). Na apresentação a seguir, apenas os resultados obtidos com Alg. B.V e reticulados com íons Ca^{2+} serão apresentados. Os resultados complementares estão nos APÊNDICES B e C.

A Figura 5.20 apresenta as atividades de transfrutossilacção e hidrolíticas obtidas com a FTase micelial reticulada aprisionada, bem como as razões A_T/A_H , empregando o alginato de baixa viscosidade e $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de cloreto de cálcio e bicos de gotejamento com aberturas de 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,8 e 0,7 mm, como descrito no Item 4.2.2.4 da metodologia.

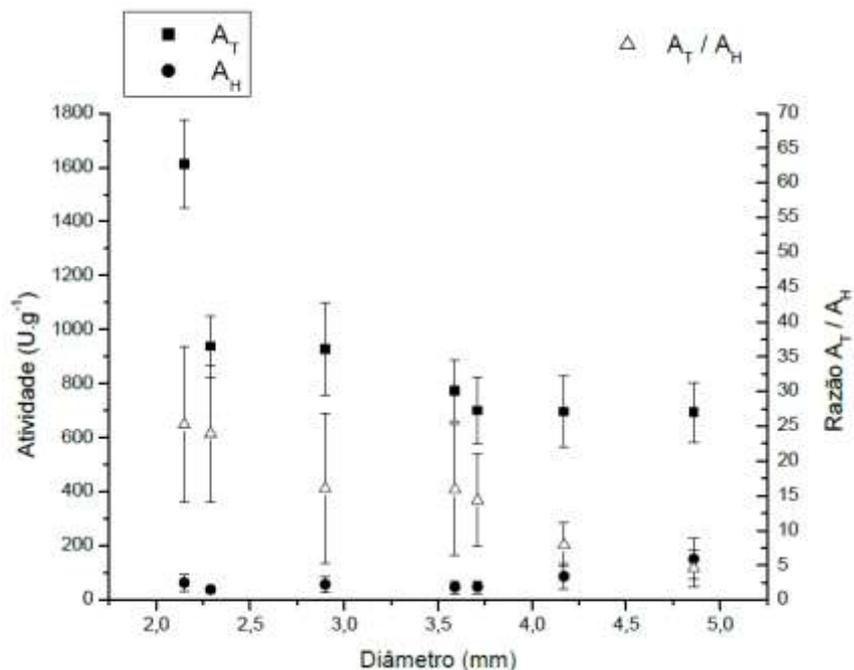


Figura 5.20 - Atividades enzimáticas de transfrutossilacção (A_T) e hidrolítica (A_H) e razões A_T/A_H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alg. B.V. (4,0% m/m), reticulada por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mol.L⁻¹), em função dos diâmetros das esferas (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64$ U.g⁻¹).

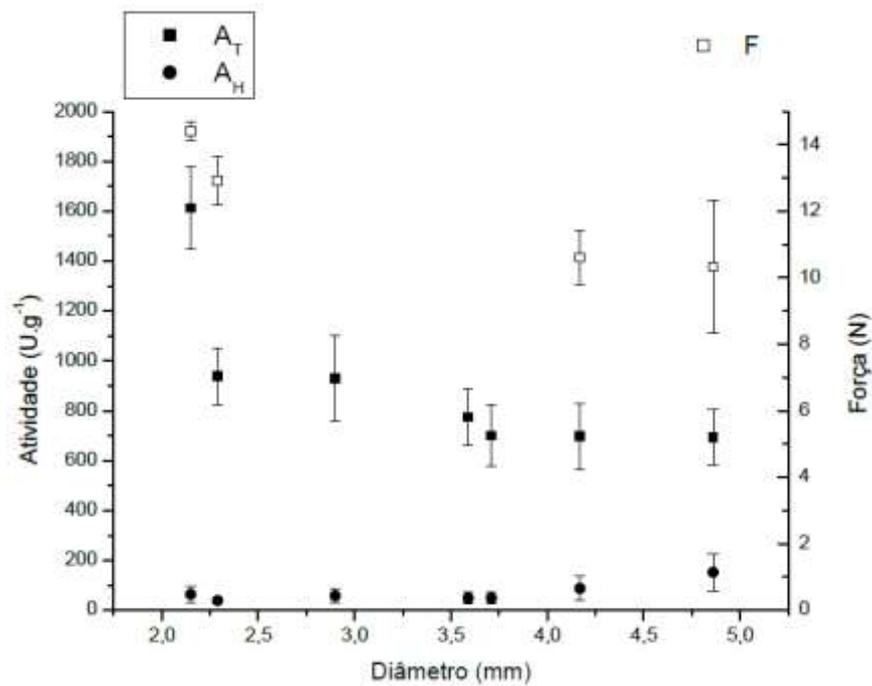
Fonte: Autora.

Verifica-se que ao diminuir o diâmetro das esferas, mantendo a mesma condição de reticulação das partículas, a atividade de transfrutossilacção aumenta e a atividade hidrolítica se mantém praticamente constante e em níveis baixos, o que faz com que as razões A_T/A_H sejam cada vez maiores à medida que o tamanho da gota diminui. Para o bico de gotejamento de menor abertura (0,7 mm), foi obtido o menor diâmetro de esfera ($2,15 \pm 0,08$ mm), a maior A_T (1613 ± 163 U.g⁻¹) e uma A_H baixa (64 ± 32 U.g⁻¹). Com isso, nesse caso, a razão A_T/A_H foi elevada (25). Entretanto, ao considerar os desvios calculados, as razões obtidas com os bicos de gotejamento de 0,7 e 0,8 mm foram similares. Com isso, o critério utilizado na escolha do diâmetro ótimo a ser empregado foi a atividade de transfrutossilacção superior obtida com o bico de menor abertura.

Em geral, partículas menores apresentam maiores rendimentos e produtividade do processo devido à menor limitação difusional, viabilizando quantidades de substratos adequadas, e, conseqüentemente, interferências irrelevantes no metabolismo celular (GANAIÉ et al., 2014b). Ainda de acordo com Ganaie et al. (2014b), a redução na atividade de transfrutossilacção da FTase em partículas grandes também pode ser explicada por desprendimentos da enzima.

Com relação aos bicos de gotejamento, o diâmetro das partículas de alginato de cálcio formadas é maior que o diâmetro dos bicos utilizados (HEINZEN; BERGER; MARISON, 2004; PONCELET et al., 1999). Nessa pesquisa, o menor bico testado foi o de abertura de 0,7 mm e o menor diâmetro de esfera obtido foi de 2,15 mm, com o alginato de baixa viscosidade. O tamanho da gota de alginato produzida é determinado pelo diâmetro externo do bico de gotejamento. Além disso, como observado, as gotas de alginato de cálcio produzidas a partir de um bico menor são mais esféricas do que as partículas formadas a partir de um bico de gotejamento maior (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). A influência do tamanho do bico no formato da esfera pode ser maior do que a das propriedades físicas da solução de alginato (STRAND; MORCH; SKJAK-BRAEK, 2000).

A força de resistência mecânica à compressão das esferas de alginato de baixa viscosidade e de média viscosidade também foi avaliada para diferentes diâmetros das partículas. A Figura 5.21 mostra os resultados obtidos para o alginato de baixa viscosidade empregando $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de cloreto de cálcio.



F: Força de resistência limite à compressão mecânica.

Figura 5.21 - Atividades enzimáticas de transfrutossilatação (A_T) e hidrolítica (A_H) e forças de resistência à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alg. B.V. (4,0% m/m), reticulada por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) em função dos diâmetros das esferas.

Fonte: Autora.

Na Figura 5.21 verifica-se que quanto menor o diâmetro das esferas de alginato maior a resistência mecânica à compressão das partículas obtidas. Dessa forma, pode-se concluir que esferas menores, além de apresentarem maior razão A_T/A_H , são mais resistentes mecanicamente. Essa tendência pode ser atribuída ao maior grau de reticulação obtido em

esferas pequenas e foi identificada para todos os casos avaliados nessa pesquisa. Entretanto, com o uso do Ba^{2+} foram obtidas resistências reduzidas quando comparadas aos valores obtidos com o Ca^{2+} , principalmente nos casos em que se utilizou o alginato de média viscosidade (APÊNDICE C).

Mais uma vez os ensaios realizados indicaram que a condição que proporciona os melhores resultados no que diz respeito à produção de FOS se baseia na utilização do alg. B.V. e do cloreto de cálcio ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizando o menor bico de gotejamento (0,7 mm), que fornece os menores diâmetros médios das esferas, como mostrado na Tabela 5.5, que traz os resultados das condições ótimas estabelecidas para os quatro casos apresentados.

Tabela 5.5 – Atividades de transfrutossilção e hidrolíticas, razões A_T/A_H e forças de resistência à compressão mecânica obtidas nas condições ótimas de reticulação e dos diâmetros médios, com os alginatos de baixa e média viscosidade.

Tipo de alginato	Tipo de agente reticulante	Diâmetro médio (mm)	Força de compressão (N)	A_T ($U.g^{-1}$)	A_H ($U.g^{-1}$)	A_T/A_H
Baixa viscosidade	Ca^{2+}	$2,15 \pm 0,08$	$14,4 \pm 0,3$	1613 ± 163	64 ± 32	25
	Ba^{2+}	$2,03 \pm 0,16$	$10,9 \pm 1,5$	1100 ± 225	79 ± 15	14
Média viscosidade	Ca^{2+}	$2,58 \pm 0,06$	$11,8 \pm 0,6$	1721 ± 137	207 ± 77	8
	Ba^{2+}	$2,13 \pm 0,17$	$10,3 \pm 0,5$	1261 ± 104	65 ± 28	19

Fonte: Autora.

5.4.3 Morfologia das esferas

As esferas obtidas com o alg. B.V. e o alg. M.V. reticuladas com cloreto de cálcio e cloreto de bário, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de alto vácuo, como descrito no Item 4.2.5.4 da metodologia, nas condições ótimas estabelecidas anteriormente.

5.4.3.1 Agente reticulante $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

A Figura 5.22 mostra uma micrografia de uma esfera de Alg. B.V. contendo a biomassa reticulada e produzida com o bico de gotejamento de 0,7 mm. A Figura 5.23 apresenta detalhes ampliados da superfície dessa esfera e a Figura 5.24 é uma fotografia da esfera fraturada, expondo detalhes de seu interior.

Observando a Figura 5.22 conclui-se que as esferas de alginato de cálcio de baixa viscosidade, obtidas na condição ótima estabelecida ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm), tem formato esférico, superfície regular e homogênea, porém com rugosidade. Nos detalhes ampliados da Figura 5.23, é possível reconhecer a estruturação

filamentosa da biomassa, semelhante às microscopias da solução homogeneizada (Figuras 5.2 a 5.6), assim como a presença de poros e algumas pequenas fendas, revelando parte da morfologia interna.



Figura 5.22 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 50 vezes).
Fonte: Autora.



Figura 5.23 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 200 vezes).
Fonte: Autora.

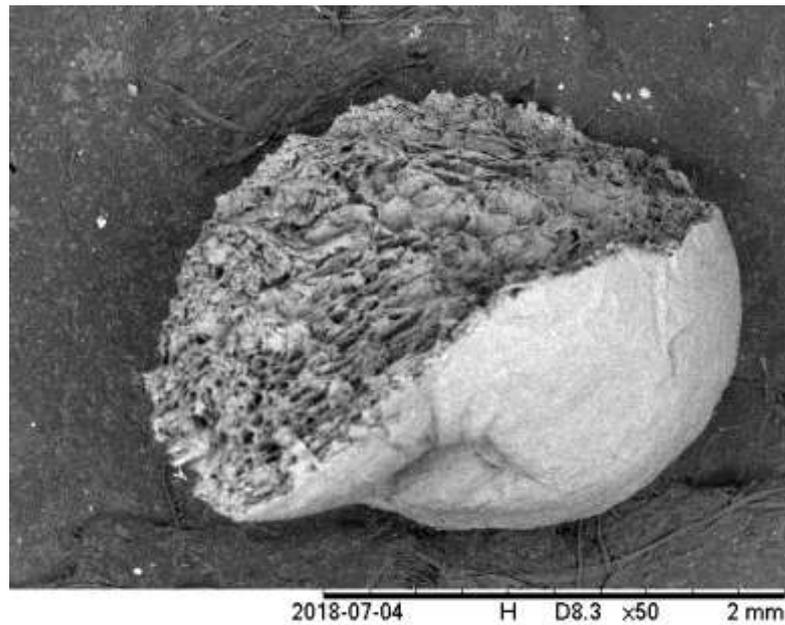


Figura 5.24 - Micrografia MEV da fratura da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 50 vezes).

Fonte: Autora.

No geral, observa-se uma boa cobertura da esfera mostrada nas Figuras 5.22 e 5.23. Fernandez-Arrojo et al. (2013) também relataram a formação de partículas esféricas e homogêneas, com uma superfície rugosa, no envolvimento da FTase de *Aspergillus aculeatus*. Pela Figura 5.24 comprova-se também o eficiente aprisionamento da biomassa reticulada, que pode ser visualizada no interior da esfera.

Uma imagem da superfície da esfera com essa mesma formulação obtida após a condução da reação enzimática está na Figura 5.25.

Uma avaliação da morfologia da superfície indica que após a condução da reação enzimática não foram observadas diferenças significativas na estrutura da esfera, que continua a evidenciar uma certa rugosidade, com poros e pequenas aberturas presentes em sua superfície, além de filamentos.

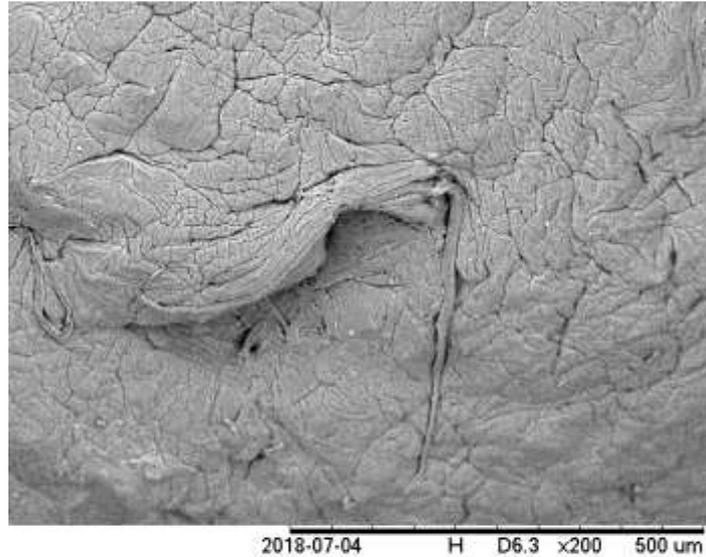


Figura 5.25 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada após a condução da reação enzimática, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 200 vezes).

Fonte: Autora.

A Figura 5.26 apresenta a micrografia de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) obtida utilizando-se $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm, sem a presença da biomassa reticulada. A Figura 5.27 mostra detalhes ampliados da superfície dessa esfera e a Figura 5.28 ilustra a esfera fraturada, expondo detalhes de seu interior.

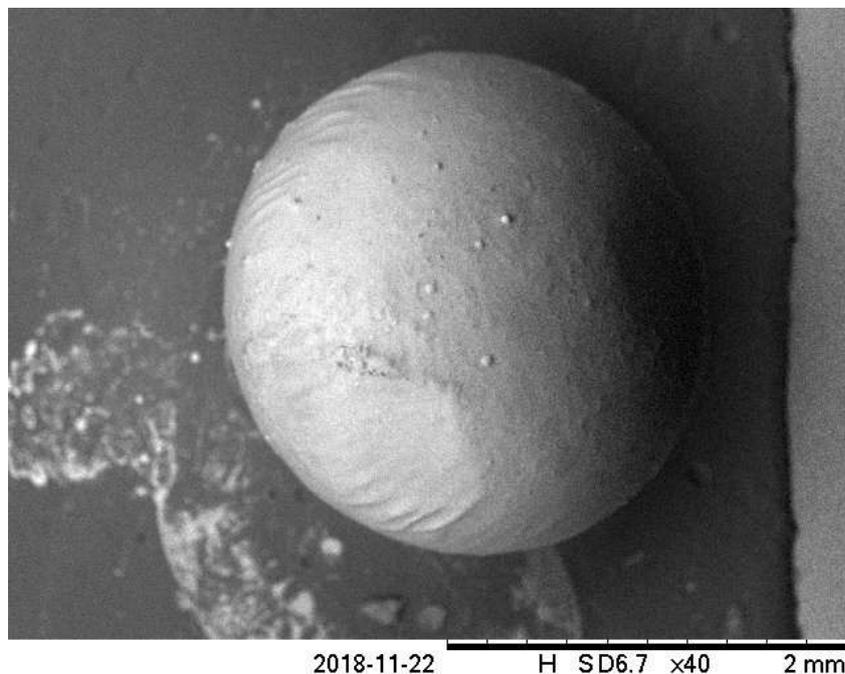


Figura 5.26 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) sem a carga de biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 40 vezes).

Fonte: Autora.

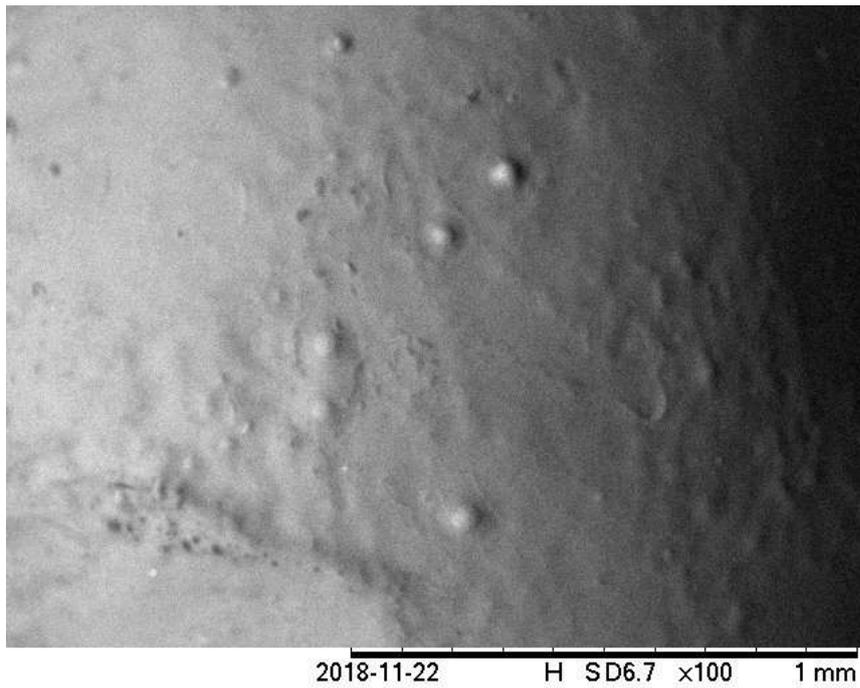


Figura 5.27 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) sem a carga de biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 100 vezes).

Fonte: Autora.



Figura 5.28 - Micrografia MEV da fratura da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) sem a carga de biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 40 vezes).

Fonte: Autora.

A partir das Figuras 5.26 e 5.27 é possível verificar que as partículas obtidas na ausência do biocatalisador continuam com um formato esférico, superfície regular e homogênea, com uma boa cobertura e com pequena rugosidade em alguns locais. Pela Figura 5.28, verifica-se que o interior dessa esfera possui a mesma estrutura de sua superfície, sendo preenchido pelo gel de alginato e, mais uma vez, comprova-se o aprisionamento da biomassa reticulada de maneira eficiente, como pode ser visualizado no interior da esfera mostrada na Figura 5.24.

A Figura 5.29 mostra uma esfera de Alg. M.V. contendo a biomassa reticulada, utilizando Ca^{2+} como íon reticulante.

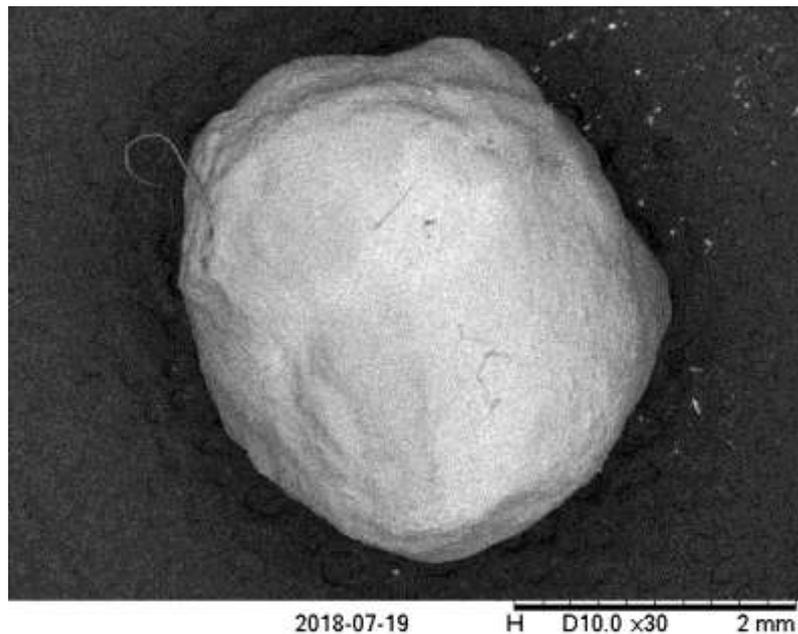


Figura 5.29 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ca^{2+} na concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de $0,7 \text{ mm}$ (aumento de 30 vezes). Fonte: Autora.

Verifica-se que com o alginato de média viscosidade as partículas obtidas não apresentam formato esférico perfeito, o que pode ter auxiliado na redução das atividades enzimáticas, como já mencionado anteriormente (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). Entretanto, a superfície da esfera se apresenta uniforme e homogênea, sem fissuras visíveis, e, de fato, com uma cobertura mais perfeita. A superfície do gel se mostra nitidamente mais homogênea do que a obtida com o uso do alginato de baixa viscosidade reticulado com $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Isso pode ser atribuído a um melhor poder de gelificação do Alg. M.V. e ao uso de uma reticulação mais intensa. VOO et al. (2016) também relataram que para altas concentrações de Ca^{2+} foram impostas limitações difusionais e uma estrutura de gel mais homogênea foi formada. Em contrapartida, essa maior eficiência no aprisionamento pode ter contribuído para a redução nos rendimentos de FOS, devido às limitações difusionais impostas

pelo uso de altas concentrações de reticulante (COVIZZI et al., 2007; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

5.4.3.2 Agente reticulante $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A Figura 5.30 mostra a micrografia de uma esfera de alg. B.V. contendo a biomassa reticulada, obtida utilizando-se Ba^{2+} como íon reticulante e o bico de gotejamento de 0,7 mm, e a Figura 5.31 apresenta detalhes da sua superfície.



Figura 5.30 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 40 vezes).

Fonte: Autora.



Figura 5.31 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. B.V. (4,0% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 200 vezes).

Fonte: Autora.

Nas Figuras 5.30 e 5.31, as esferas de alginato de bário de baixa viscosidade, obtidas na condição ótima estabelecida, não apresentaram formato esférico, com uma superfície rugosa e irregular, evidenciando a presença de poros e grandes aberturas, que podem ter ocasionado a lixiviação do biocatalisador. A baixa concentração de cloreto de bário empregada gerou esferas pouco resistentes mecanicamente, o que pode ter facilitado o aparecimento de rachaduras. Todos esses fatores podem atuar na redução das atividades enzimáticas verificada nesse caso, com relação aos resultados obtidos com o cálcio. Mørch et al. (2006), ao utilizarem o bário como agente reticulante e o alginato de alto M, obtiveram partículas brancas, frágeis e leitosas.

As Figuras 5.32 e 5.33 mostram uma esfera de alg. M.V. contendo a biomassa reticulada produzida por meio da utilização de Ba^{2+} como íon reticulante e do bico de gotejamento de 0,7 mm, e detalhes da superfície dessa mesma esfera, respectivamente.

Com o alg. M.V. as partículas produzidas apresentaram formato de gota, o que pode ter auxiliado na redução das atividades enzimáticas, como já mencionado (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013), com relação ao uso do cálcio. A superfície da partícula também se apresenta muito rugosa e deformada, porém sem rachaduras. O uso de uma concentração maior de cloreto de bário com o alginato de média viscosidade pode ter auxiliado na formação de gotículas sem grandes aberturas em sua superfície, o que não foi observado para o alginato de baixa viscosidade empregando também o íon bário como reticulante.

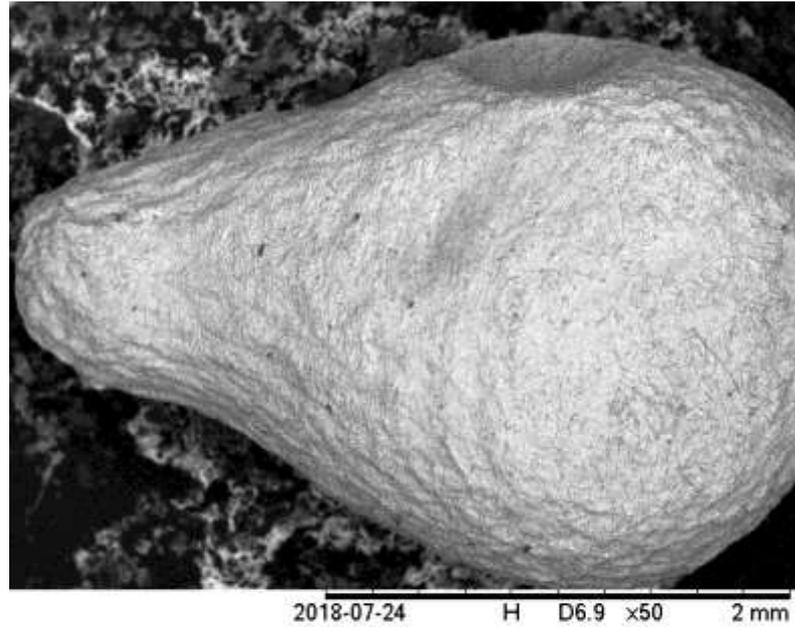


Figura 5.32 - Micrografia MEV de uma esfera de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 50 vezes).

Fonte: Autora.

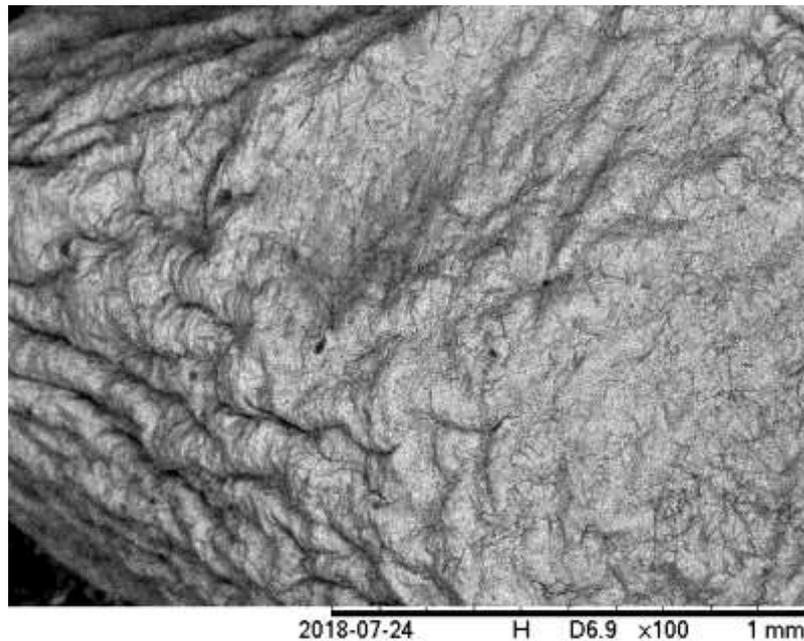


Figura 5.33 - Micrografia MEV da superfície da esfera de alg. M.V. (1,2% m/m) contendo a biomassa reticulada, utilizando como íon reticulante Ba^{2+} na concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e bico de gotejamento de 0,7 mm (aumento de 200 vezes).

Fonte: Autora.

Portanto, mais uma vez foi comprovado que o uso do alginato de baixa viscosidade reticulado com $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e do bico de gotejamento de 0,7 mm, se apresenta como a melhor alternativa, dentre os testes realizados, para a obtenção de esferas contendo a FTase reticulada, alcançando maiores rendimentos de FOS, melhores resistências mecânicas e

produzindo partículas menores, mais esféricas, homogêneas, porosas e sem rachaduras aparentes.

Ressalta-se, entretanto, que pode ter havido influência do vácuo do equipamento utilizado nas micrografias obtidas, podendo ocasionar a desestruturação física de algumas esferas.

5.4.4 Estabilidade da FTase armazenada a 4 °C

Foram conduzidos ensaios para avaliar a estabilidade da FTase durante o armazenamento das esferas de alginato de baixa viscosidade e de média viscosidade, empregando cloreto de cálcio e de bário como agentes reticulantes. Segundo Lee, Ravindra e Chan et al. (2013), o gel de alginato pode se desestruturar ao longo de um certo período de tempo. Por outro lado, a imobilização da FTase pode trazer a estabilização de armazenamento, desde que seja adequadamente projetada (FLORES-MALTOS et al., 2014).

Para quantificar essa estabilidade ao longo do tempo, as partículas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C por 15 dias e suas atividades enzimáticas foram determinadas ao longo desse período. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A Figura 5.34 apresenta as atividades de transfrutoseilação, hidrolíticas e as razões A_T/A_H obtidas em ensaios de tempo de estocagem a 4 °C conduzidos com esferas produzidas com o bico de gotejamento de 0,7 mm, alginato de baixa viscosidade e 0,2 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O (a), alginato de média viscosidade e 0,5 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O (b), alginato de baixa viscosidade e 0,01 mol.L⁻¹ de BaCl₂.2H₂O (c) e alginato de média viscosidade e 0,05 mol.L⁻¹ de BaCl₂.2H₂O (d).

Analisando e comparando os resultados experimentais exibidos na Figura 5.34, verifica-se que apenas os ensaios conduzidos com o alginato de baixa viscosidade e 0,2 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O (a) produziram esferas que, no nono dia de estocagem a 4 °C, apresentaram uma retenção de 95% de sua atividade de transfrutoseilação inicial, com uma atividade hidrolítica baixa, inferior a 100 U.g⁻¹, e uma pequena redução na razão A_T/A_H (de 25,2 (inicial) para 17,5 no nono dia de estocagem).

Nos outros três modos de aprisionamento, a A_T decresce linearmente desde o primeiro dia. Com o alginato de média viscosidade e 0,5 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O (b) essa queda é de cerca de 110 U.g⁻¹.dia⁻¹. Nos dois aprisionamentos que utilizaram o bário como reticulante, a perda de atividade foi da ordem de 90 U.g⁻¹.dia⁻¹, com uma queda menos acentuada com o alginato de baixa viscosidade (c e d).

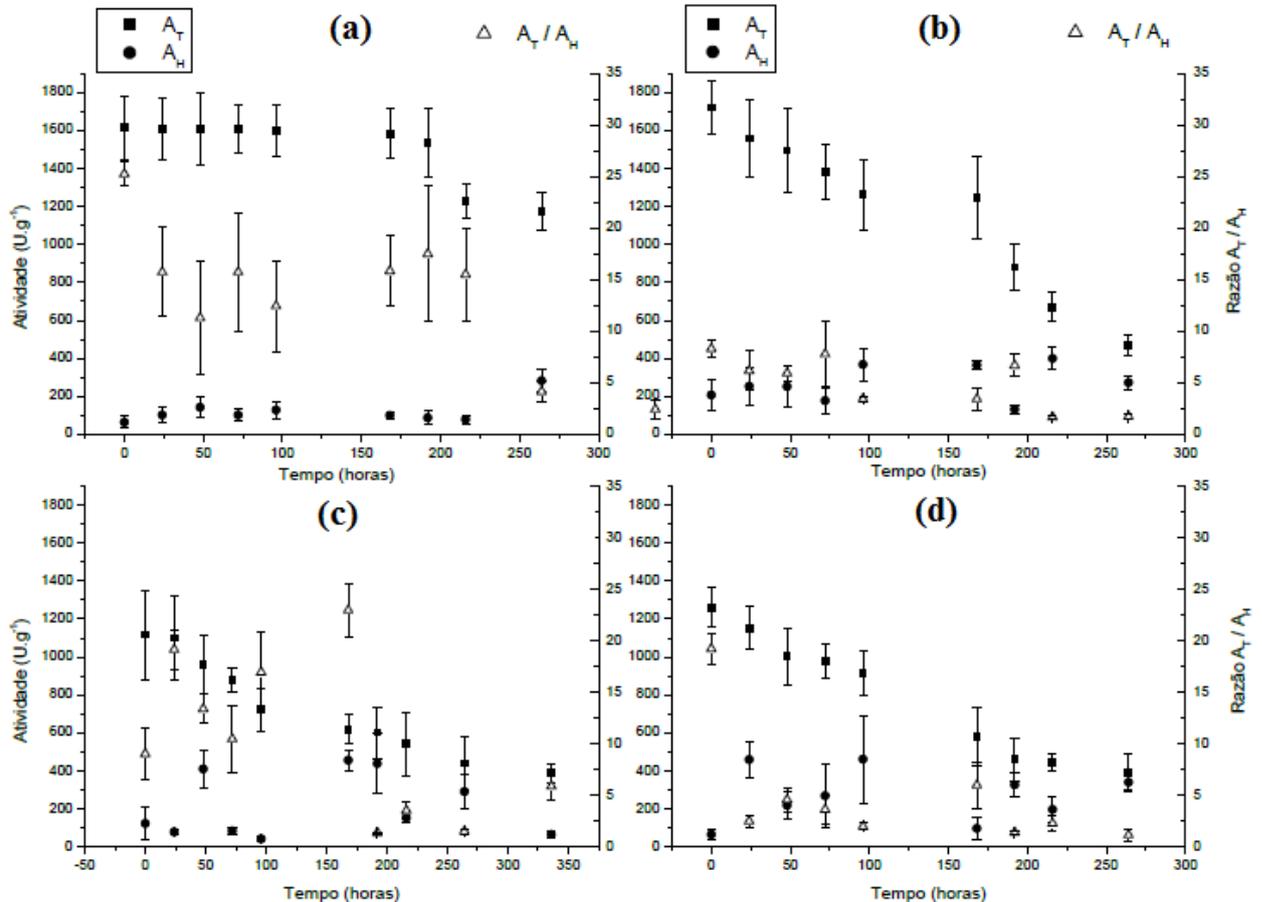


Figura 5.34 - Atividades de transfrutoseilação e hidrolíticas e razões A_T/A_H da biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alg. B.V. (4,0% m/m) utilizando $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (a); alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (b); alg. B.V. (4,0% m/m) utilizando $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (c); alg. M.V. (1,2% m/m) utilizando $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (d); em função do tempo de estocagem das esferas a 4°C e utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64 \text{ U.g}^{-1}$).
Fonte: Autora.

Dessa forma, confirma-se que o uso do alginato de baixa viscosidade (4,0% m/m), do cloreto de cálcio como agente de reticulação ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) e do bico de gotejamento de 0,7 mm, que produz as esferas de menor diâmetro dentre os bicos testados, permite o armazenamento do produto aprisionado por até nove dias, sem perda significativa de atividade (redução de cerca de 5% na A_T inicial). Por outro lado, ensaios com a biomassa livre indicaram uma estabilidade de armazenamento de apenas cinco dias.

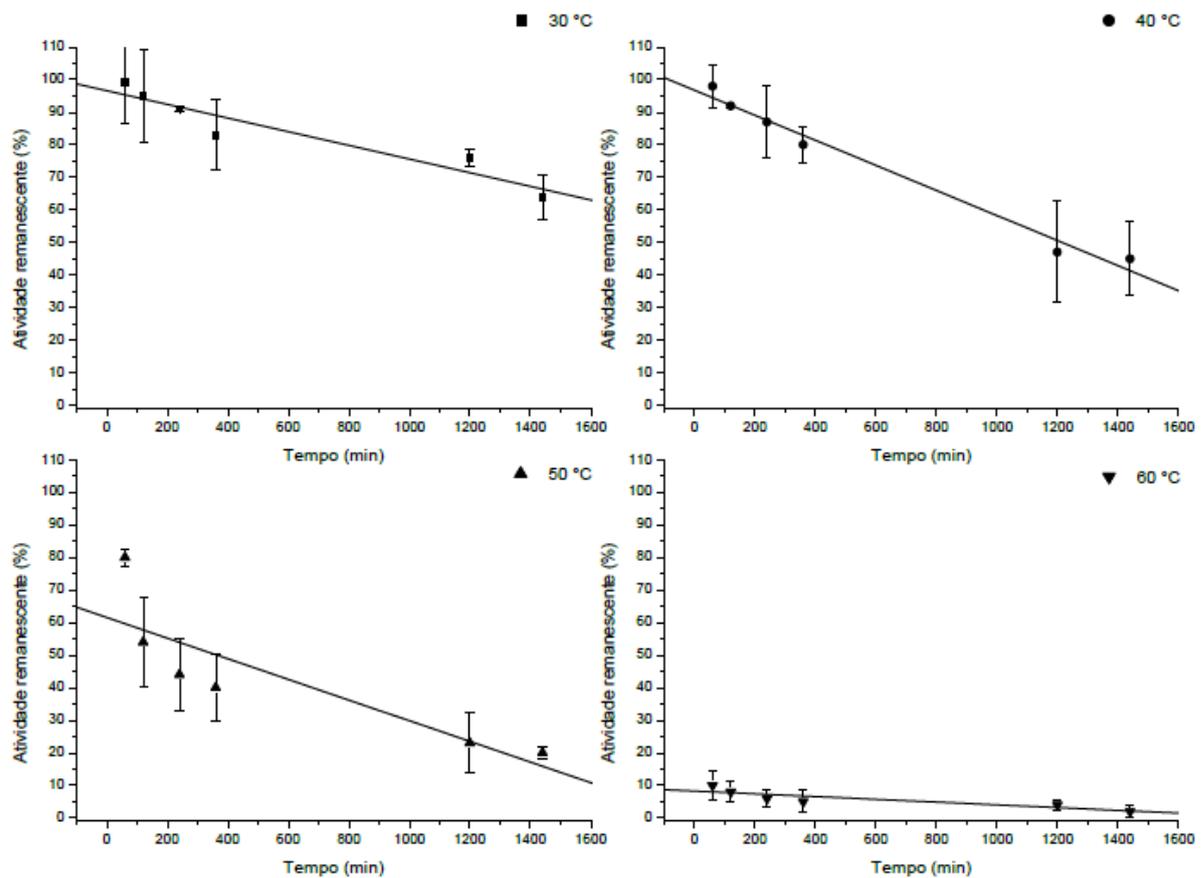
Os resultados de todos os ensaios realizados, assim como observações microscópicas, indicaram que o envolvimento com 4% m/m de alg. B.V. e o uso de uma solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ conduziu às melhores conversões de transfrutoseilação. Essas condições, portanto, foram mantidas nos demais ensaios de caracterização.

5.4.5 Estabilidade térmica da FTase e determinação de parâmetros termodinâmicos

Conforme os resultados apresentados no Item 5.4.4, a reatividade da biomassa reticulada e aprisionada em alginato de baixa viscosidade apresentou uma queda de cerca de 5% em sua atividade de transfrutossilção inicial após nove dias de armazenamento a temperatura de 4 °C. Quando mantida a temperaturas mais altas, entretanto, essa biomassa se deteriora, perdendo seu poder reativo.

Os ensaios de estabilidade térmica foram conduzidos com a biomassa livre e com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato de cálcio, como descrito no Item 4.5.6 da metodologia. O material foi mantido por até 24 horas sob temperaturas de 30, 40, 50 ou 60 °C e então alimentado no reator. A Figura 5.35 apresenta a atividade de transfrutossilção remanescente da biomassa livre pré-tratada termicamente.

Sob a temperatura de incubação de 30 °C, a biomassa livre manteve 83% de sua atividade inicial após 6 horas de incubação ($854 \pm 93 \text{ U.g}^{-1}$), e reteve 64% de sua atividade após 24 horas ($658 \pm 45 \text{ U.g}^{-1}$). A 40 °C, a A_T residual caiu para 80% após 6 horas de incubação ($823 \pm 45 \text{ U.g}^{-1}$) e foi para 45% depois de 24 horas ($459 \pm 53 \text{ U.g}^{-1}$). A 50 °C a atividade enzimática foi reduzida para 40 e 20% de sua A_T inicial após 6 ($414 \pm 42 \text{ U.g}^{-1}$) e 24 horas de incubação ($204 \pm 4 \text{ U.g}^{-1}$), respectivamente. A 60 °C a A_T residual caiu para 5% após 6 horas ($36 \pm 9 \text{ U.g}^{-1}$) e para 2% de sua A_T inicial após um período de incubação de 24 horas ($52 \pm 2 \text{ U.g}^{-1}$). Esses resultados indicaram que a FTase micelial livre somente manteve boa parte de sua estabilidade quando mantida por apenas 1 hora nas temperaturas de incubação de 30 e 40 °C.



A_T padrão: $1028 \pm 112 \text{ U.g}^{-1}$.

Figura 5.35 - Atividade remanescente da FTase micelial livre submetida a diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C) por 1, 2, 4, 6, 20 e 24 horas.

Fonte: Autora.

Cunha (2017) também afirmou que a frutossiltransferase micelial de *Aspergillus oryzae* IPT 301 é estável somente na faixa de temperatura de 30 a 40 °C, com as atividades relativas de transfrutossililação entre 80 e 100% de seu valor inicial após 1 hora de incubação. Garcia (2018) também identificou que a FTase micelial (mesma fonte) foi estável a 30 e 40 °C.

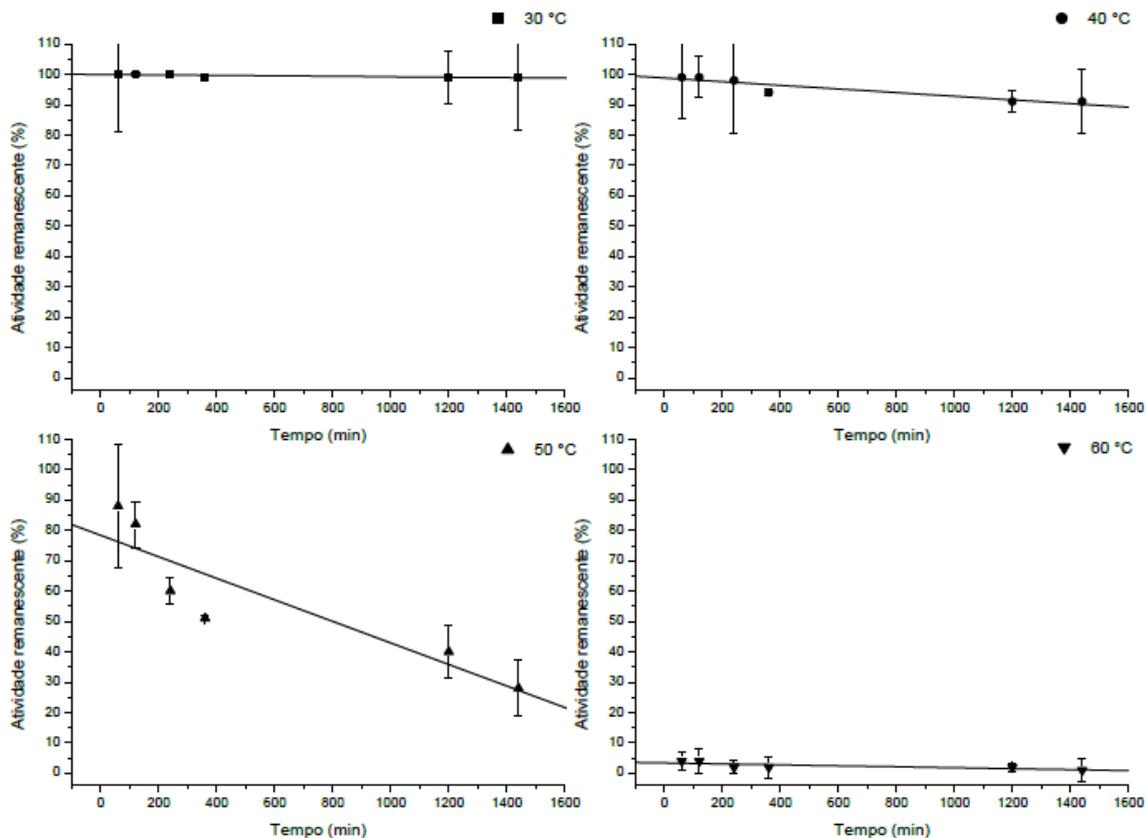
À 50 e 60 °C observou-se um decréscimo acentuado da atividade enzimática, atingindo praticamente a completa inativação da enzima a 60 °C. Cunha (2017) reportou que em temperaturas superiores a 45 °C também foi verificada uma queda significativa na atividade, até atingir a completa inativação do biocatalisador a 65 °C. Hayashi et al. (1990) também afirmaram que a FTase intracelular de *Aureobasidium sp.* ATCC 20254 apresentou baixa estabilidade térmica para temperaturas maiores que 50 °C, até alcançar a completa inativação em 70 °C após 15 min de incubação.

A Figura 5.36 mostra os resultados de inativação térmica obtidos com a biomassa reticulada com glutaraldeído e envolvida em gel de alginato de cálcio de baixa viscosidade, e mantida por até 24 horas às temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C. Os valores experimentais

lançados na Figura 5.36 indicam que a atividade de transfrutossilacção é mantida quando o material aprisionado é acondicionado por 24 horas à 30 °C ($1772 \pm 306 \text{ U.g}^{-1}$). A 40°C, a A_T caiu para 91% após 24 horas de incubação ($1627 \pm 174 \text{ U.g}^{-1}$), um valor aceitável. Com 50 °C a A_T foi reduzida para 28% depois de 24 horas ($507 \pm 47 \text{ U.g}^{-1}$) e, a 60 °C, caiu para 1% de sua A_T inicial após 24 horas de incubação ($16 \pm 6 \text{ U.g}^{-1}$).

Comparando os resultados apresentados nas Figuras 5.35 e 5.36, nas mesmas temperaturas de ensaios, a estabilidade térmica enzimática do material aprisionado foi superior do que a observada para a enzima livre, exceto a 60 °C. Esse fato comprova a melhoria que o envolvimento dessa biomassa reticulada promoveu na estabilidade da FTase. Ganaie et al. (2014b) também afirmaram que a estabilidade térmica da FTase aprisionada em alginato de cálcio aumenta quando comparada ao uso do biocatalisador livre.

A partir da Equação (3), Item 4.2.5.6, foram determinados os valores das constantes de desnaturação térmica (K_D) da enzima livre e imobilizada nas temperaturas avaliadas nesse estudo, por meio do coeficiente angular das retas obtidas nas Figuras 5.37 e 5.38, respectivamente. As equações de reta e seus valores de R^2 se encontram na Tabela 5.6.



A_T padrão: $1795 \pm 176 \text{ U.g}^{-1}$.

Figura 5.36 - Atividade remanescente da FTase micelial reticulada aprisionada submetida a diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C) por 1, 2, 4, 6, 20 e 24 horas.

Fonte: Autora.

Na Figura 5.39 está representado o ajuste linear da Equação de Arrhenius para a inativação térmica (Equação (2) do Item 4.2.5.6), o qual fornece a Equação (4) deste mesmo item, que permite determinar a energia de desnaturação térmica (E_D) da FTase presente na biomassa livre e na biomassa imobilizada. Com base nos dados experimentais apresentados nas Figuras 5.35, 5.36, 5.37, 5.38 e 5.39 foram determinados alguns parâmetros, como o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), o fator de estabilidade (FE), a constante de desnaturação térmica (K_D), a energia de desnaturação térmica (E_D) e as variações de entalpia (ΔH^0), energia livre de Gibbs (ΔG^0) e entropia (ΔS^0) de desnaturação térmica. Esses resultados estão dispostos na Tabela 5.7.

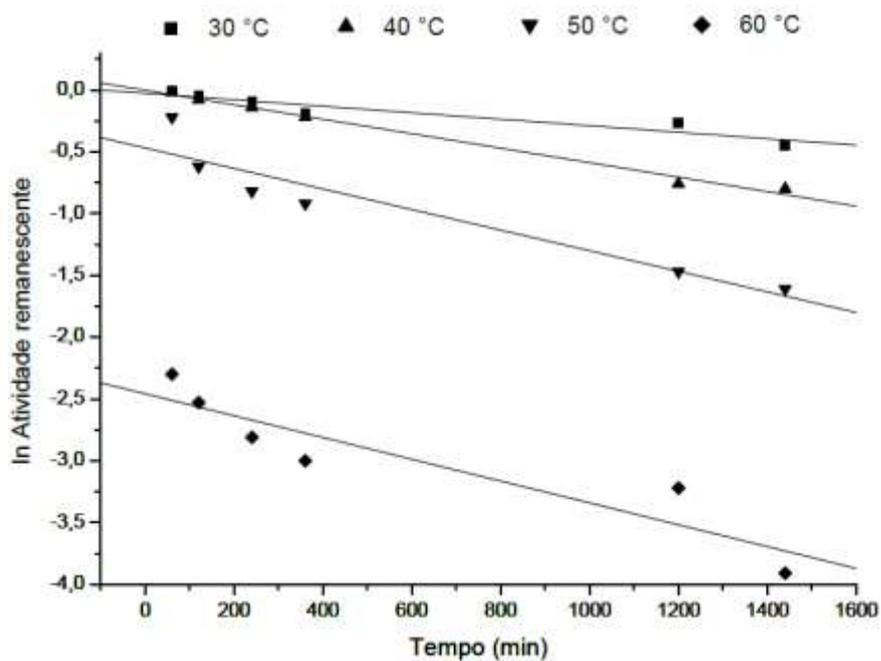


Figura 5.37 - Ajuste linear para a determinação da constante de desnaturação térmica (K_D) da FTase micelial livre. Fonte: Autora.

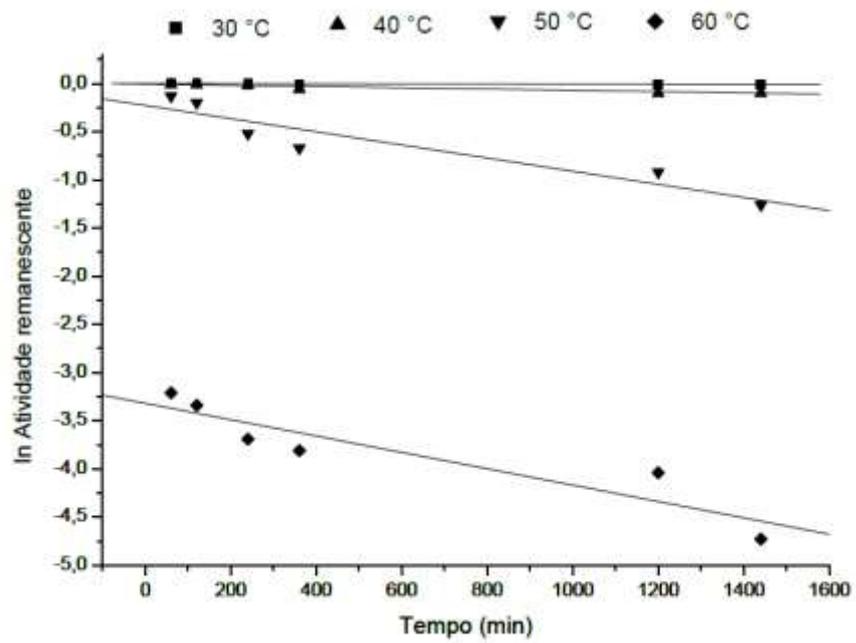


Figura 5.38 - Ajuste linear para a determinação da constante de desnaturação térmica (K_D) da FTase micelial imobilizada.

Fonte: Autora.

Tabela 5.6 - Equações de reta e valores de R^2 para os dados das Figuras 5.37 e 5.38.

	FTase	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
Equação da reta	L	$y = -0,028 - 3 \cdot 10^{-4} \cdot X$	$y = -0,049 - 6 \cdot 10^{-4} \cdot X$	$y = -0,468 - 8 \cdot 10^{-4} \cdot X$	$y = -2,458 - 9 \cdot 10^{-4} \cdot X$
	I	$y = -0,001 - 8 \cdot 10^{-6} \cdot X$	$y = -0,010 - 7 \cdot 10^{-5} \cdot X$	$y = -0,225 - 7 \cdot 10^{-4} \cdot X$	$y = -3,319 - 8 \cdot 10^{-4} \cdot X$
R^2	L	0,91	0,99	0,90	0,85
	I	0,97	0,91	0,89	0,85

L: FTase micelial livre; I: FTase micelial reticulada e aprisionada em alginato de sódio; $y = \ln$ Atividade remanescente; $X =$ tempo (min).

Fonte: Autora.

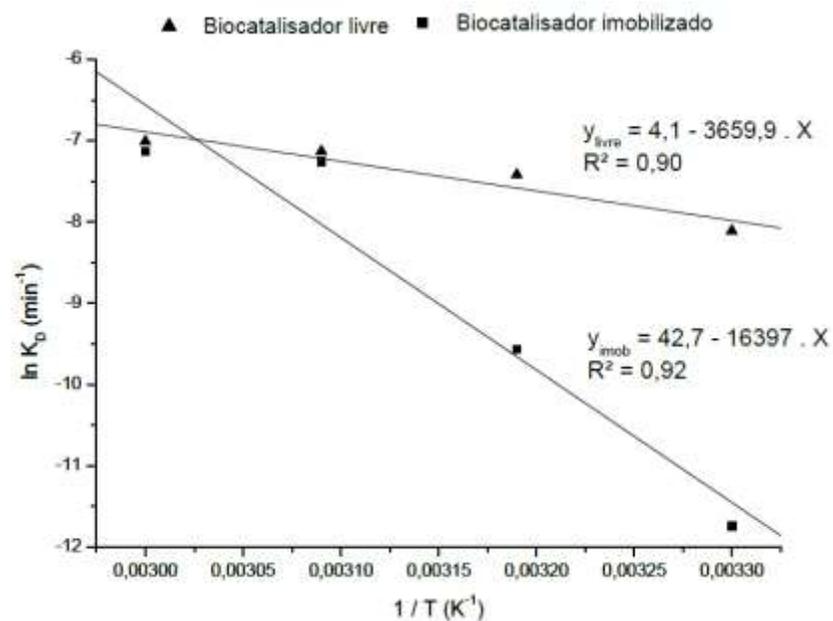


Figura 5.39 - Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desnaturação térmica (E_D) da FTase micelial livre e imobilizada.

Fonte: Autora.

Tabela 5.7 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a FTase micelial livre e imobilizada, incubada em diferentes temperaturas.

Parâmetros	FTase	Temperatura (°C)			
		30	40	50	60
K_D (min⁻¹)	L	3,0.10 ⁻⁴	6,0.10 ⁻⁴	8,0.10 ⁻⁴	9,0.10 ⁻⁴
	I	8,0.10 ⁻⁶	7,0.10 ⁻⁵	7,0.10 ⁻⁴	8,0.10 ⁻⁴
t_{1/2} (min)	L	2310	1155	866	770
	I	86643	9902	990	866
FE	-	37,50	8,57	1,14	1,13
E_D (KJ.mol⁻¹)	L		30,43		
	I		136,32		
ΔH⁰ (KJ.mol⁻¹)	L	27,91	27,82	27,74	27,66
	I	133,80	133,72	133,64	133,55
ΔG⁰ (KJ.mol⁻¹)	L	86,57	87,53	89,47	91,83
	I	95,70	93,13	89,83	92,15
ΔS⁰ (KJ.mol⁻¹.K⁻¹)	L	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19
	I	0,13	0,13	0,14	0,12

L: FTase micelial livre; I: FTase micelial reticulada e aprisionada em alginato de sódio; K_D = constante de desnaturação térmica; t_{1/2} = tempo de meia-vida; FE = fator de estabilidade; E_D = energia de desnaturação térmica; ΔH⁰ = variação de entalpia de desnaturação térmica; ΔG⁰ = variação de energia livre de Gibbs de desnaturação térmica; ΔS⁰ = variação de entropia de desnaturação térmica.

Fonte: Autora.

Em todos os casos estudados, os tempos de meia vida obtidos com a biomassa imobilizada foram superiores às meia vidas encontradas com a biomassa livre. Isso indica que após a reticulação e o aprisionamento a enzima resiste um tempo maior para perder 50% de sua A_T inicial em diferentes temperaturas, com relação à enzima livre. Dessa forma, quanto maior o t_{1/2} maior é o período de resistência do biocatalisador a uma certa temperatura (SOUZA et al., 2015). O fator de estabilidade (FE) auxilia na determinação da eficiência de imobilização por meio da relação entre a meia vida do biocatalisador imobilizado e da enzima livre (SOUZA et al., 2016). Os FE calculados para as quatro diferentes temperaturas foram positivos, o que indica uma maior estabilidade da biomassa imobilizada com relação à livre.

Além disso, ressalta-se que as meia vidas foram sendo reduzidas à medida que a temperatura de incubação aumentava. Isso ocorre devido ao aumento da desnaturação térmica da enzima. A meia vida obtida para a temperatura de 30 °C para o biocatalisador imobilizado foi de 86643 min (60 dias), um valor cerca de 38 vezes superior ao da enzima livre nessa mesma temperatura (1,60 dias).

Chien, Lee e Lin (2001) promoveram a produção de FOS utilizando a FTase de *Aspergillus japonicus* imobilizada em glúten, obtendo-se um t_{1/2} de 34 dias, a 37 °C. Nishizawa et al. (2000) também obtiveram FOS a partir da FTase de *Aspergillus niger* ATCC 20611

imobilizada em uma membrana cerâmica ativada por um reagente de acoplamento de silano, em um reator de membrana de fluxo forçado, alcançando um $t_{1/2}$ de 35 dias, a 50 °C e pH 6,0.

A energia de desnaturação térmica (E_D) (Figura 5.39), calculada por meio do coeficiente angular das retas obtidas, foi de 30,43 KJ.mol⁻¹ para a biomassa livre e de 136,32 KJ.mol⁻¹ para a biomassa imobilizada. A regressão linear dos pontos no intervalo de temperatura avaliado (30 a 60 °C) apresentou um bom ajuste tanto com o biocatalisador imobilizado ($R^2 = 0,92$) quanto com a enzima livre ($R^2 = 0,90$).

Com relação a E_D da enzima livre, Garcia (2018) obteve um aumento de 1,08 vezes nesse parâmetro após reticular a FTase com glutaraldeído, e, no presente trabalho, ao aprisionar a FTase reticulada, verifica-se um aumento de 4,48 vezes na E_D após a imobilização. Esse parâmetro expressa a quantidade de energia necessária para promover a desnaturação da enzima nas condições avaliadas (AGUIAR-OLIVEIRA e MAUGERI, 2011). Dessa forma, a reticulação da biomassa com glutaraldeído e o envolvimento do micélio em gel de alginato de cálcio promoveram uma melhoria na termoestabilidade do biocatalisador, visto que após a imobilização é necessário fornecer uma quantidade de energia térmica maior para que a enzima seja desnaturada.

Analisando os parâmetros termodinâmicos obtidos, verifica-se que a variação de entalpia de desnaturação térmica média do biocatalisador imobilizado ($134 \pm 0,1$ KJ.mol⁻¹) foi 4,81 vezes maior que a da enzima livre ($28 \pm 0,1$ KJ.mol⁻¹). ΔH^0 representa a quantidade total de energia necessária para levar a enzima do estado fundamental ao estado excitado. De maneira geral, quanto maior E_D maior será ΔH^0 . Portanto, como E_D foi maior com a biomassa imobilizada do que com o micélio livre, a variação de entalpia de desnaturação também apresentou maiores valores para a FTase reticulada aprisionada. Altos valores para E_D e ΔH^0 estão diretamente relacionados a uma elevada termoestabilidade do biocatalisador (SAQIB et al., 2010).

Com relação à variação de entropia de desnaturação térmica média obtida, houve um aumento em ΔS^0 com a enzima imobilizada ($0,13 \pm 0,01$ KJ.mol⁻¹. K⁻¹) com relação à enzima livre ($-0,19$ KJ.mol⁻¹. K⁻¹). De acordo com Siddiqui et al. (1997), a desnaturação térmica de enzimas provoca a ruptura da estrutura da proteína, gerando um sistema desorganizado, o que provoca uma elevação na entropia do sistema, resultando em entropias positivas de desnaturação, como verificado com a biomassa imobilizada. Isso ocorre porque o grau de desordem tende a aumentar na transição do estado fundamental para o estado excitado.

A desativação térmica enzimática também é dependente da variação da energia livre de Gibbs de desnaturação, a qual resulta das forças estabilizadoras presentes na estrutura de uma

substância, que, no processo de desnaturação, podem ser representadas por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, muitas das quais são perdidas durante a desativação térmica (SAQIB et al., 2010). A variação na energia livre de Gibbs é o parâmetro mais confiável para se avaliar a estabilidade de uma enzima, pois considera tanto as contribuições da entalpia quanto de entropia. Quanto menor for o seu valor, significa que o biocatalisador perde estabilidade e se desnatura de forma mais espontânea (SAQIB et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

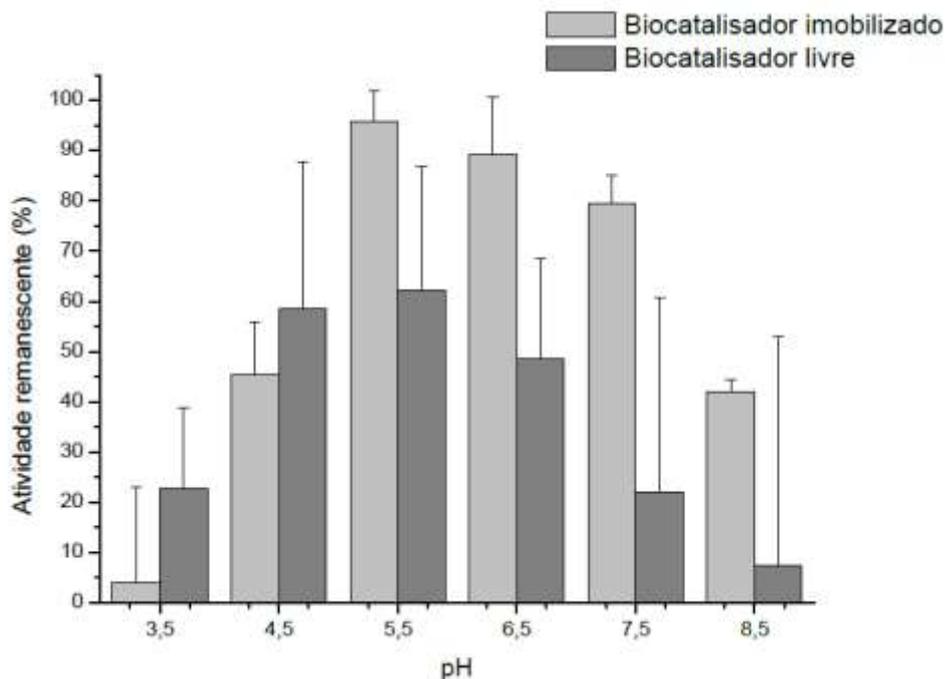
A FTase imobilizada apresentou valores de ΔG^0 positivos e maiores do que os resultados com a enzima livre e, segundo Marangoni (2003) e Damodaran (2006), maiores valores de ΔG^0 indicam uma maior estabilidade térmica do biocatalisador. Isso significa que mais uma vez a biomassa reticulada aprisionada apresentou maior termoestabilidade, ou seja, a biomassa imobilizada é menos favorável ao desdobramento de proteínas (AGUIAR-OLIVEIRA E MAUGERI, 2011).

Além disso, no equilíbrio, quando a concentração de proteína no estado fundamental é maior que a concentração no estado desnaturado, o valor de ΔG^0 é positivo. Dessa forma, para ambos os casos apresentados, a transição do estado fundamental para o estado excitado (desnaturado) não é um processo espontâneo, isto é, ocorre somente com o fornecimento de energia a partir de condições padrão de reação (FONSECA et al., 2006).

Após analisar todos os parâmetros descritos nesse item, verificou-se que após o procedimento de reticulação com glutaraldeído e envolvimento da FTase em gel de alginato de cálcio, o biocatalisador apresentou uma maior estabilidade térmica e meia vida quando comparado à enzima livre. Vale ressaltar que a imobilização pode afetar o comportamento da enzima em relação à sua estabilidade térmica e outros aspectos, ou destacar fenômenos imperceptíveis quando a enzima está na sua forma livre (BROMBERG; MARX; FRISHMAN, 2008; BHATTI et al., 2007; SADANA, 1998).

5.4.6 Estabilidade da FTase armazenada sob diferentes pHs

Amostras de biomassa livre e de biomassa imobilizada foram mantidas por 24 horas em oito diferentes soluções tampão tris-acetato, a 4 °C, com pHs variando de 3,5 a 8,5. Após esse período de incubação determinou-se a atividade de transfrutoseilação de cada caso, seguindo as condições padrão da reação enzimática (T = 50 °C, pH = 5,5 e concentração de sacarose = 400 g.L⁻¹). Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 5.40.



A_T padrão biomassa livre: $1028 \pm 112,1 \text{ U.g}^{-1}$; A_T padrão biomassa imobilizada: $1795 \pm 176,3 \text{ U.g}^{-1}$.

Figura 5.40 - Estabilidade da FTase micelial livre e reticulada aprisionada após 24 horas de incubação em soluções tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, sob diferentes pHs.

Fonte: Autora.

A biomassa livre apresentou A_{TS} remanescentes maiores que 48% em uma faixa de pH entre 4,5 e 6,5. Já a biomassa imobilizada foi estável ao pH na faixa de 5,5 a 7,5, com atividades de transfrutossilção superiores a 79% da A_T inicial. Foi observada uma melhoria significativa na estabilidade ao pH ao imobilizar a FTase micelial, além de um deslocamento do intervalo de estabilidade dessa enzima para valores alcalinos após a imobilização.

Segundo Ganaie et al. (2014b), a FTase micelial livre de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364 começou a perder atividade em pH 6,5, porém o biocatalisador imobilizado em esferas de alginato reteve sua atividade até pH 7,5, que foi o mesmo comportamento obtido no presente trabalho. Segundo os autores, o deslocamento do pH para um valor alcalino após a imobilização pode ter ocorrido devido a interações secundárias entre a enzima e a matriz polimérica. Os grupos polares do alginato podem ter interagido com os grupos funcionais da FTase, provocando uma alteração nas características de pH do biocatalisador.

Cunha (2017) observou que a FTase micelial livre de *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi estável em uma faixa de pH de 6,0 a 8,0, com atividades residuais superiores a 80% nesse intervalo. Garcia (2018), utilizando a mesma enzima, verificou que o biocatalisador tanto na sua forma livre quanto reticulado com glutaraldeído se mostrou estável para pHs entre 4,5 e 7,5, novamente com atividades relativas superiores a 80% nessa faixa.

Huang et al. (2016), Lateef, Oloke e Prapulla (2007), Sangeetha, Ramesh e Prapulla (2005) e Hayashi et al. (1990) indicaram faixas de estabilidade ao pH para FTases miceliais de *Aspergillus aculeatus* M105, *Aureobasidium pullulans* CFR 77, *Aspergillus oryzae* CFR 202 e *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 de 5,0 a 11,0, 3,5 a 10,0, 5,0 a 7,0 e 5,0 a 6,0, respectivamente. Além disso, Ganaie, Lateef e Gupta et al. (2014a) apontaram faixas de estabilidade ao pH de 5,0 a 7,0 e 5,5 a 6,5 para FTases miceliais de *Aspergillus oryzae* CFR 202 e *Aspergillus niger*, respectivamente. Por fim, Hayashi et al. (1992) alcançaram uma faixa de estabilidade ao pH de 5,0 a 10,0 para a FTase micelial de *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 imobilizada em sílica porosa. Com isso, verifica-se que as amplas faixas de estabilidade ao pH encontradas na literatura e nessa pesquisa representam um fator crucial para a aplicação de enzimas em escala industrial, facilitando o próprio processo de produção e até mesmo a estocagem (XU et al., 2015; HAYASHI et al., 1990).

5.4.7 Estabilidade operacional em reciclagem da enzima livre e imobilizada

A estabilidade operacional dos biocatalisadores livre e imobilizado foi avaliada de duas formas. Primeiramente foram conduzidos 12 ciclos consecutivos, de 1 hora cada, e, em um segundo caso, foram realizados 5 ciclos de reuso do biocatalisador, sendo que cada ciclo foi conduzido por um período de 4 horas, como descrito no Item 4.2.5.8. As condições ótimas na formulação e metodologia de uso das FTases foram utilizadas (Alg. B.V. 4% m/m, 0,2 mol.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e bico de gotejamento de 0,7 mm). A Figura 5.41 apresenta os resultados obtidos das atividades relativas de transfrutossilatação ao longo dos ciclos (1 hora de reação enzimática).

As curvas na Figura 5.41 indicam explicitamente que a biomassa imobilizada apresentou um comportamento mais estável à perda de atividade enzimática do que a biomassa livre, no decorrer dos 12 ciclos de reutilização do biocatalisador monitorados nesse trabalho. Até o sexto ciclo, a biomassa imobilizada reteve sua atividade inicial, com uma redução de cerca de 5% ($1834 \pm 32 \text{ U.g}^{-1}$), enquanto a biomassa livre apresentou desde o início, aproximadamente, uma redução de 10% por ciclo de seu potencial reativo. Ao final dos 12 ciclos de produção avaliados, o biocatalisador imobilizado apresentou 52% de sua A_T inicial ($995 \pm 46 \text{ U.g}^{-1}$), enquanto o micélio livre apenas reteve 21% de sua atividade enzimática inicial ($170 \pm 4 \text{ U.g}^{-1}$).

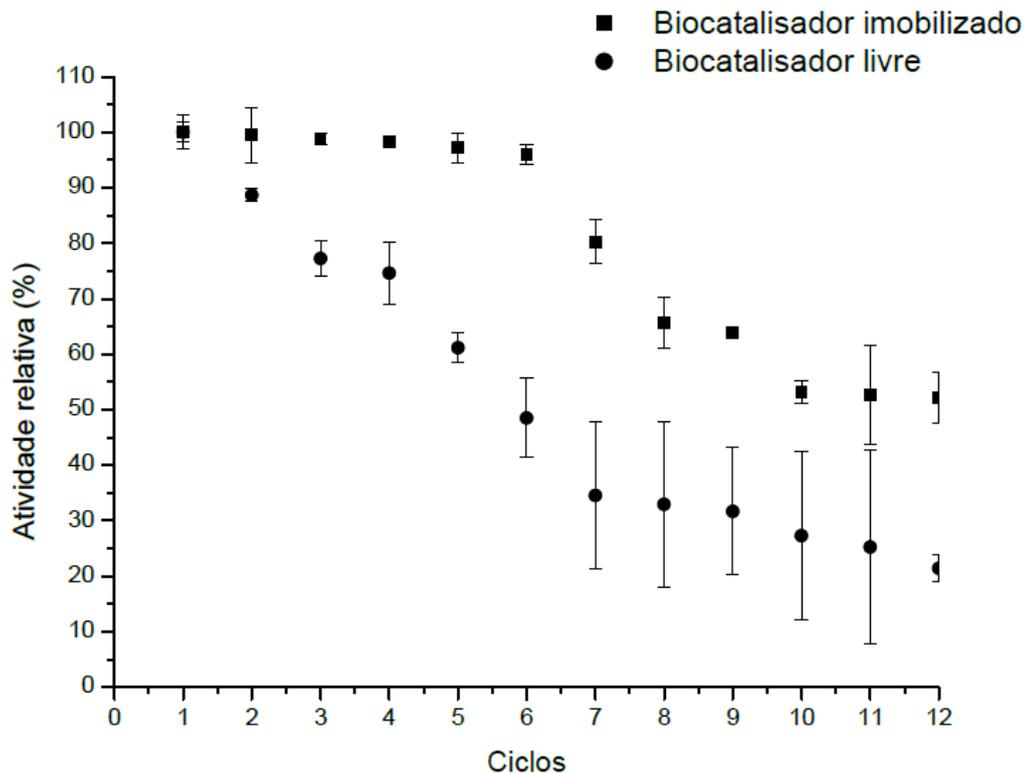


Figura 5.41 - Estabilidade operacional dos biocatalisadores livre e imobilizado ao longo de 12 ciclos de uso, totalizando 12 horas de reação de transfrutossilacção. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5, a 50 °C.

Fonte: Autora.

Resultados similares foram obtidos por Ganaie et al. (2014b), que imobilizaram a FTase micelial de *A. flavus* NFCCI 2364 em alginato de cálcio. Ao testar o reuso do biocatalisador imobilizado para a produção de FOS, os autores não observaram grandes reduções nas atividades enzimáticas até o sétimo ciclo de produção. A partir do oitavo ciclo verificou-se uma redução significativa nas atividades, o que pode ter ocorrido devido à desintegração das esferas de alginato contendo a FTase, ocasionando o desprendimento da enzima e reduzindo assim os rendimentos de FOS.

Mussatto, Rodrigues e Teixeira (2009) também encontraram resultados semelhantes para o reuso da FTase de *A. japonicus* ATCC 20236 na obtenção de FOS, com a enzima apresentando atividades elevadas nos sete ciclos iniciais de produção. Esses autores observaram, entretanto, que a relação A_T/A_H máxima foi alcançada no final do primeiro ciclo e este valor foi sendo reduzido nos ciclos subsequentes, devido a elevações na atividade hidrolítica. Em contraponto, no presente estudo, as razões A_T/A_H só foram reduzidas no décimo primeiro e décimo segundo ciclos de produção, com um aumento significativo nas A_H s. Essas alterações nas razões A_T/A_H podem ocorrer devido a alterações nas condições da reação

enzimática, como pH e temperatura, ou por meio da ação das próprias cepas empregadas na obtenção da enzima (CHEN; LIU, 1996).

A elevada estabilidade operacional obtida com o biocatalisador imobilizado pode promover uma produção efetiva de FOS e de menor custo, pois reduz a necessidade de produção de biomassa, além de não exigir vários inóculos, viabilizando a reutilização do biocatalisador em escala industrial, como, por exemplo, em reator de leito fixo (GANAIE et al., 2014b).

Essa melhoria na estabilidade operacional do biocatalisador imobilizado com relação à enzima livre pode ter ocorrido devido à presença do glutaraldeído, que apresenta a capacidade de aumentar a estabilidade enzimática, fazendo com que a enzima seja menos vulnerável à perda de atividade no decorrer da reação (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005). Aliado a esse fato, a retenção da atividade também pode ter sido facilitada pelo envolvimento da FTase em alginato, que por não envolver ligações químicas entre o suporte e a proteína, não favorece a inativação ou a distorção de seus sítios ativos e protege o biocatalisador do contato direto com o meio reacional, impedindo a lixiviação da enzima aprisionada (ZUCCA e SANJUST, 2014; GANAIE; LATEEF, GUPTA, 2014a). A partir desses resultados, confirma-se mais uma vez a aplicabilidade da FTase de *Aspergillus Oryzae* IPT 301 reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alginato de cálcio, nas condições ótimas obtidas, na produção de FOS, com um grande potencial de uso do biocatalisador imobilizado em processos contínuos.

A estabilidade operacional do biocatalisador também foi avaliada em bateladas de 4 horas cada. Esse período de tempo foi escolhido por corresponder ao esgotamento da sacarose presente no meio reacional, isto é, a obtenção da máxima concentração de FOS no meio, tanto com a biomassa livre quanto com o biocatalisador imobilizado, como mostrado nas Figuras D.1 e D.2 (Apêndice D), respectivamente. A Figura 5.42 apresenta os resultados obtidos das atividades relativas de transfrutoseilação ao longo dos ciclos, cada um com 4 horas de reação enzimática.

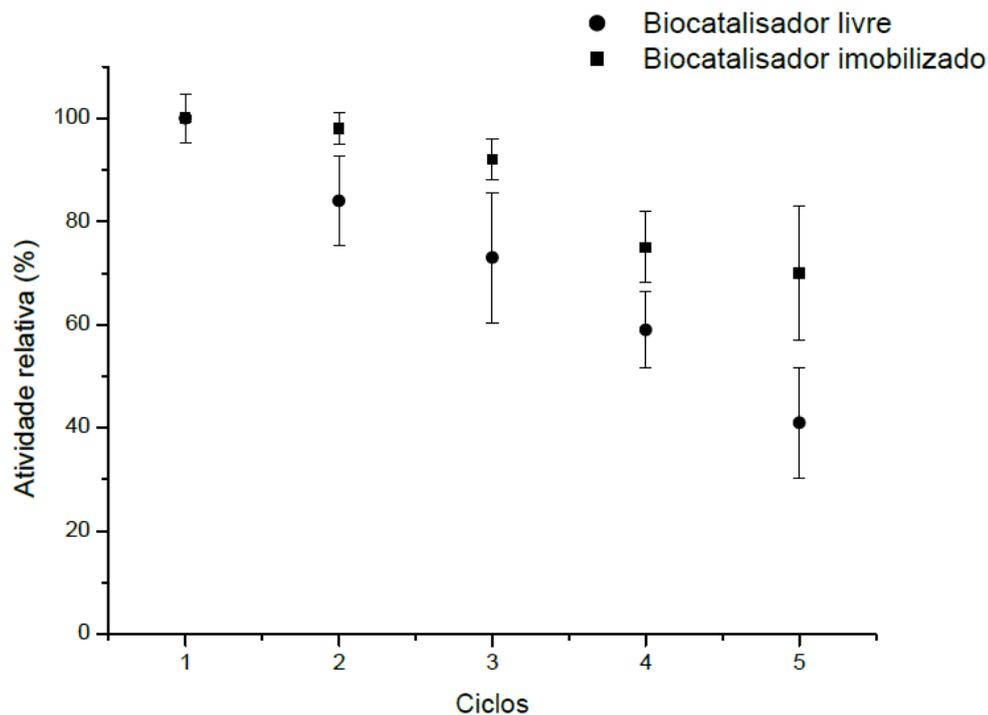


Figura 5.42 - Estabilidade operacional dos biocatalisadores livre e imobilizado ao longo de 5 ciclos de uso, de 4 horas cada, totalizando 20 horas de reação de transfrutoseilação. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L^{-1} e solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: Autora.

Verifica-se, na Figura 5.42, que a biomassa imobilizada apresentou novamente um comportamento mais estável à perda de atividade enzimática do que a biomassa livre, ao longo dos 5 ciclos de utilização do biocatalisador. A biomassa imobilizada manteve a sua atividade após a primeira batelada de 4 horas e reteve 92% de sua atividade inicial até o terceiro ciclo ($1522 \pm 60 \text{ U.g}^{-1}$), e 70% no quinto e último ciclo ($1160 \pm 151 \text{ U.g}^{-1}$). Por outro lado, com a biomassa livre houve uma queda constante e de cerca de 15% na A_T por ciclo de uso, sendo que no quinto ciclo, avaliado após 20 horas de reação, a enzima reteve apenas 41% de seu potencial reativo ($589 \pm 63 \text{ U.g}^{-1}$). Com esses resultados, também foi possível confirmar a maior aplicabilidade comercial do biocatalisador imobilizado com relação à sua forma livre, a partir da avaliação de reações sucessivas em batelada, após o esgotamento do substrato no meio reacional.

5.5 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FOS

5.5.1 Efeito da temperatura do meio reacional nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica

A influência da temperatura do meio reacional nas atividades enzimáticas foi avaliada conforme descrito no Item 4.2.6.1. A Figura 5.43 mostra os resultados encontrados com a biomassa livre.

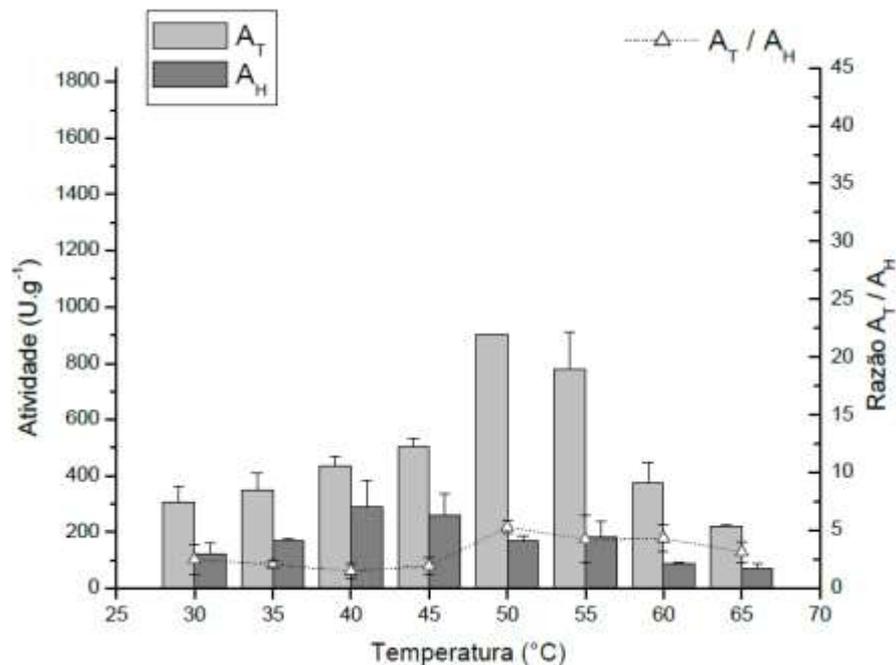


Figura 5.43 - Efeito da temperatura nas atividades de transfrutossilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L^{-1} e solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,5.

Fonte: Autora.

Com a biomassa livre, a atividade de transfrutossilação máxima foi obtida na temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($901 \pm 1,5 \text{ U.g}^{-1}$). Nessa temperatura a atividade hidrolítica apresentou um valor baixo ($170 \pm 18 \text{ U.g}^{-1}$), o que contribuiu para a obtenção da máxima razão A_T/A_H também a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (5,3). A faixa de temperatura em que a FTase micelial apresentou máxima atividade de transfrutossilação está compreendida entre 50 e $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em pesquisas realizadas por Santos-Moriano et al. (2015), Hirayama, Sumi e Hidaka (1989) e Cunha (2017), a faixa de temperatura ótima encontrada para a atividade de transfrutossilação da FTase micelial livre foi de 35 a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, de 50 a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e de 45 a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Em temperaturas fora dessa faixa foi observada uma rápida desativação enzimática.

Com relação às razões A_T/A_H , a faixa ótima de temperatura obtida se encontra entre 50 e $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, que é aproximadamente o intervalo onde as A_T s são máximas. Segundo Cunha (2017)

essa região de máximas razões se deu entre 45 e 55 °C, o que também vai de encontro ao observado nessa pesquisa. Cuervo-Fernández et al. (2004) obtiveram razões entre as atividades entre 3,5 e 5,0, ao avaliar os efeitos térmicos em meio reacional em pH 5,5. Essas razões foram semelhantes às obtidas para esse estudo.

A influência da temperatura do meio reacional nas atividades enzimáticas da biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato de cálcio estão apresentadas na Figura 5.44. A constatação mais óbvia ao se comparar as Figuras 5.43 e 5.44 é a surpreendente valorização de A_T com uma manutenção de baixos valores de A_H que se obtém com o envolvimento. Essas diferenças já foram apresentadas na Tabela 5.3.

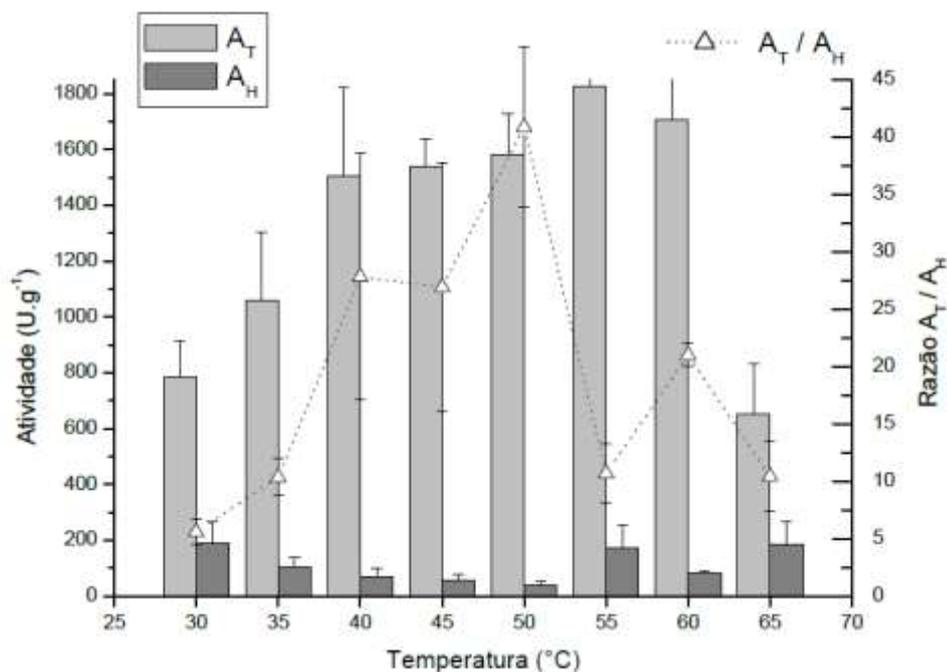


Figura 5.44 - Efeito da temperatura nas atividades de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato (4,0% m/m) de cálcio (0,2 mol.L⁻¹), utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L⁻¹ e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5.

Fonte: Autora.

Com a biomassa reticulada aprisionada, a atividade de transfrutoseilação máxima foi obtida na temperatura de 55 °C (1828 ± 166 U.g⁻¹). Nessa temperatura a atividade hidrolítica não foi mínima (171 ± 85 U.g⁻¹), resultando em uma razão A_T/A_H de 10. Na temperatura de 50 °C, a atividade de transfrutoseilação foi um pouco menor (1583 ± 144 U.g⁻¹), mas a atividade hidrolítica foi mínima (38 ± 11 U.g⁻¹), o que contribuiu para a obtenção da máxima razão A_T/A_H nessa temperatura (41). Por esse motivo, a temperatura ótima da FTase imobilizada continuou a ser considerada como sendo de 50 °C, assim como a FTase livre. Por outro lado, o

envolvimento ampliou a faixa de temperatura em que a FTase micelial apresentou altas atividades de transfrutossilacão, que se estendeu de 40 a 60 °C.

As atividades hidrolíticas foram relativamente altas nas temperaturas de 30 e 35 °C, onde a β -frutofuranosidase pode ter atuado como hidrolase, ocasionando um aumento na hidrólise da sacarose e provocando uma elevação das A_{HS} , tendência que ocorre em temperaturas mais amenas. Por outro lado, na temperatura de 65 °C, verificou-se uma queda na A_T e uma elevação significativa na A_H , o que pode ter ocorrido em razão de a hidrólise enzimática da sacarose ser facilitada em temperaturas mais altas (ALMEIDA et al., 2005).

Ganaie et al. (2014b) relataram que a temperatura de máxima A_T da FTase aprisionada em alginato foi de 60 °C. Esses autores ainda afirmaram que em temperaturas mais altas, pode ocorrer perda de atividade enzimática devido à lixiviação do biocatalisador da matriz polimérica, a qual pode ter sofrido entumescimento ou degradação, como observado para a temperatura de 65 °C.

5.5.2 Efeito do pH do meio reacional nas atividades de transfrutossilacão e hidrolítica

Avaliou-se a influência do pH do meio reacional nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacão da FTase micelial livre e da FTase reticulada com glutaraldeído e aprisionada em alginato de cálcio, como descrito no Item 4.2.6.2. Os resultados encontrados para a biomassa livre se encontram na Figura 5.45.

Com a biomassa livre, a atividade de transfrutossilacão máxima foi obtida para o pH de 5,5 ($909 \pm 59 \text{ U.g}^{-1}$). Nesse pH a atividade hidrolítica apresentou um valor baixo ($84 \pm 5,3 \text{ U.g}^{-1}$), o que contribuiu para a obtenção da máxima razão A_T/A_H ($10,8 \pm 0,02$) dentro do intervalo testado.

Nas condições mais ácidas a atividade hidrolítica foi predominante e apresentou o seu maior valor em pH 4,5 ($164 \pm 6,7 \text{ U.g}^{-1}$). De acordo com Oliveira (2007), em pHs baixos a atividade hidrolítica pode ser atribuída à hidrólise ácida da sacarose, provocando um aumento na A_H e uma consequente redução na razão A_T/A_H .

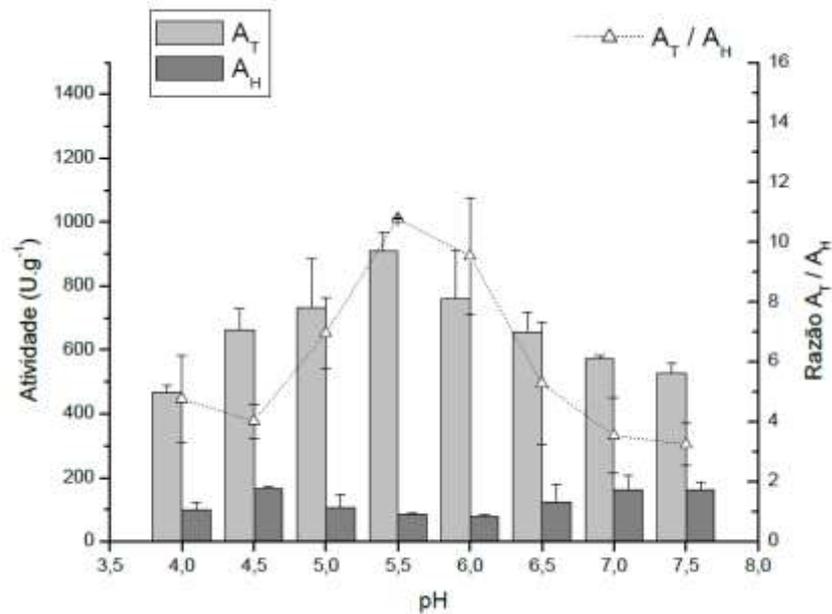


Figura 5.45 - Efeito do pH nas atividades de transfrutose (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L⁻¹ e soluções tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, a 50 °C.

Fonte: Autora.

A faixa de pH em que a FTase micelial livre apresentou as máximas A_{TS} e razões A_T/A_H está compreendida entre 5,0 e 6,0. A atividade de transfrutose e a razão A_T/A_H apresentaram uma queda em pHs inferiores e superiores a esse intervalo ótimo. Cunha (2017), Cuervo-Fernández et al. (2007) e Garcia (2018) consideraram que a faixa de pH ótimo da FTase micelial livre produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301, assim como nesse estudo, está em torno de 5,5 a 6,0, 5,5 a 8,0 e 5,0 a 8,0, respectivamente. Pesquisas desenvolvidas por Chen, Sheu e Duan (2014), Santos-Moriano et al. (2015) e Hirayama, Sumi e Hidaka (1989) apontaram uma faixa ótima de pH entre 5,5 e 6,5 (*Aspergillus japonicus*), 5,5 e 5,8 (*Zymomonas mobilis*) e 5,0 e 6,0 (*Aspergillus niger* ATCC 20611), respectivamente.

Os resultados obtidos com a biomassa reticulada aprisionada estão dispostos na Figura 5.46.

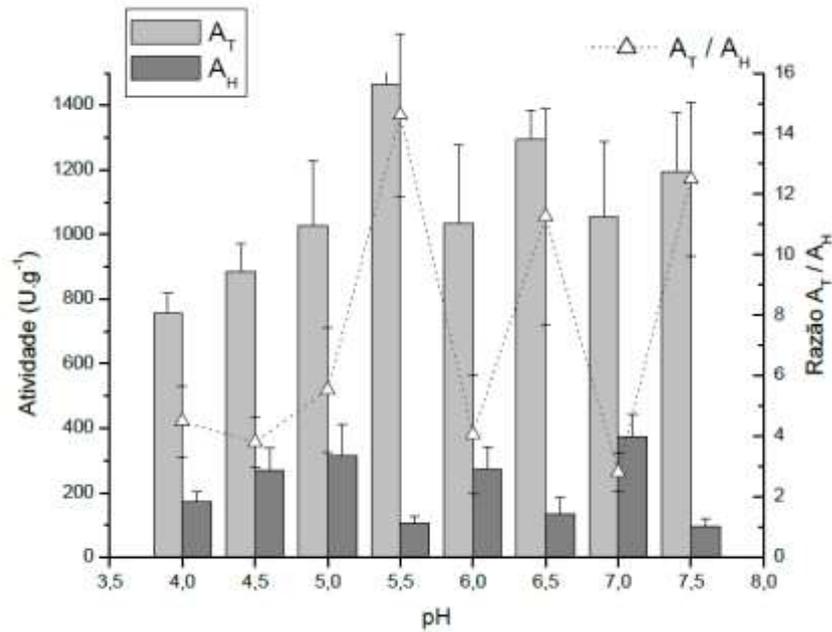


Figura 5.46 - Efeito do pH nas atividades de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e na razão A_T/A_H da FTase micelial reticulada com glutaraldeído e aprisionada em gel de alginato (4,0% m/m) de cálcio (0,2 mol.L⁻¹), utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm. Meio reacional constituído por solução de sacarose 400 g.L⁻¹ e soluções tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, a 50 °C.

Fonte: Autora.

Com a biomassa reticulada aprisionada, a atividade de transfrutoseilação máxima foi obtida com o pH de 5,5 ($1464 \pm 219 U \cdot g^{-1}$). Nesse pH, a atividade hidrolítica foi baixa ($106 \pm 21 U \cdot g^{-1}$), resultando na máxima razão A_T/A_H (14,6). A faixa de pH de maior atividade de transfrutoseilação está compreendida entre 5,0 e 7,5. Com relação às razões A_T/A_H , a faixa ótima obtida é a mesma das máximas atividades de transfrutoseilação, exceto para os pHs 6,0 e 7,0.

Ao comparar os resultados obtidos com a biomassa livre com os do micélio reticulado aprisionado, verifica-se que o pH de máxima atividade de transfrutoseilação e de máxima razão A_T/A_H se manteve em 5,5. Houve um aumento significativo nas A_T s obtidas com o biocatalisador imobilizado em relação à enzima livre, fato que pode ser justificado pelos mesmos motivos mencionados anteriormente no Item 5.5.1. Também foi observado um aumento nas razões A_T/A_H obtidas com o micélio imobilizado. Para as razões máximas (pH 5,5), por exemplo, o valor passou de 10,8 com a biomassa livre para 14,6 com a biomassa imobilizada.

Nesse trabalho, assim como apontado por Ganaie et al. (2014b), as A_T s do biocatalisador livre começaram a ser reduzidas em pH 6,5. Entretanto, com a enzima imobilizada em alginato, a atividade se manteve alta até pH 7,5. O deslocamento do intervalo de pH ótimo para um valor mais alcalino após a imobilização pode ter ocorrido devido a interações secundárias entre a enzima e a matriz polimérica. Os grupos polares do alginato podem ter interagido com os grupos

funcionais da FTase, provocando alterações nas influências causadas pelo pH nas atividades enzimáticas (GANAIE et al., 2014b). Com isso, verifica-se que o pH ótimo da enzima imobilizada não foi alterado com relação ao pH ótimo da enzima livre. O biocatalisador imobilizado, porém, se tornou menos sensível a alterações de pH.

5.5.3 Influência da concentração de substrato do meio reacional nas atividades de transfrutossilatação e hidrolítica e determinação dos parâmetros cinéticos

A influência da concentração de substrato (sacarose) sobre as atividades de transfrutossilatação e hidrolíticas da FTase micelial livre e reticulada aprisionada foi avaliada conforme descrito no Item 4.2.6.3 da metodologia. Os resultados obtidos com o biocatalisador livre e imobilizado estão apresentados nas Figuras 5.47 e 5.48, respectivamente.

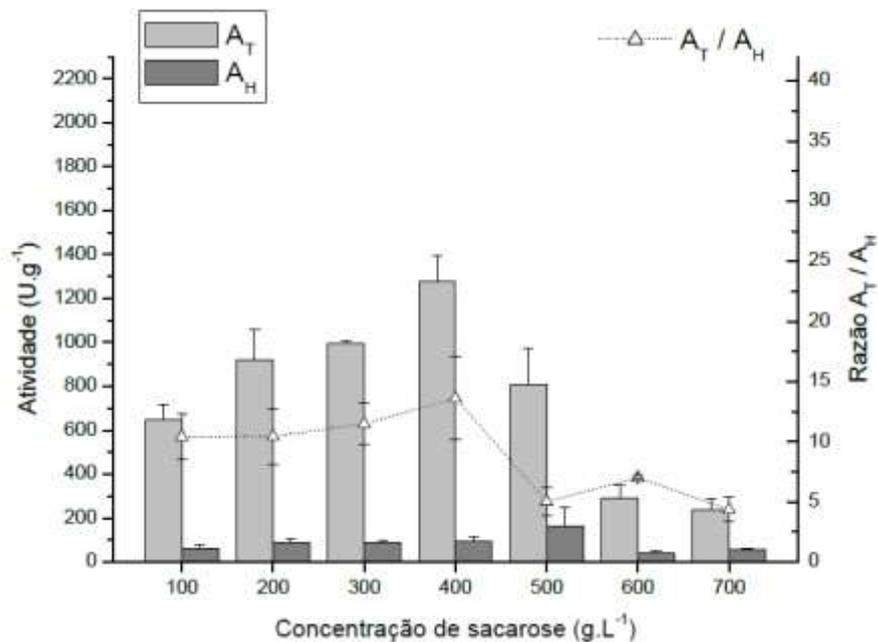


Figura 5.47 - Efeito da concentração de substrato nas atividades de transfrutossilatação e hidrolítica e na razão A_T/A_H da FTase micelial livre. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5, a 50°C .

Fonte: Autora.

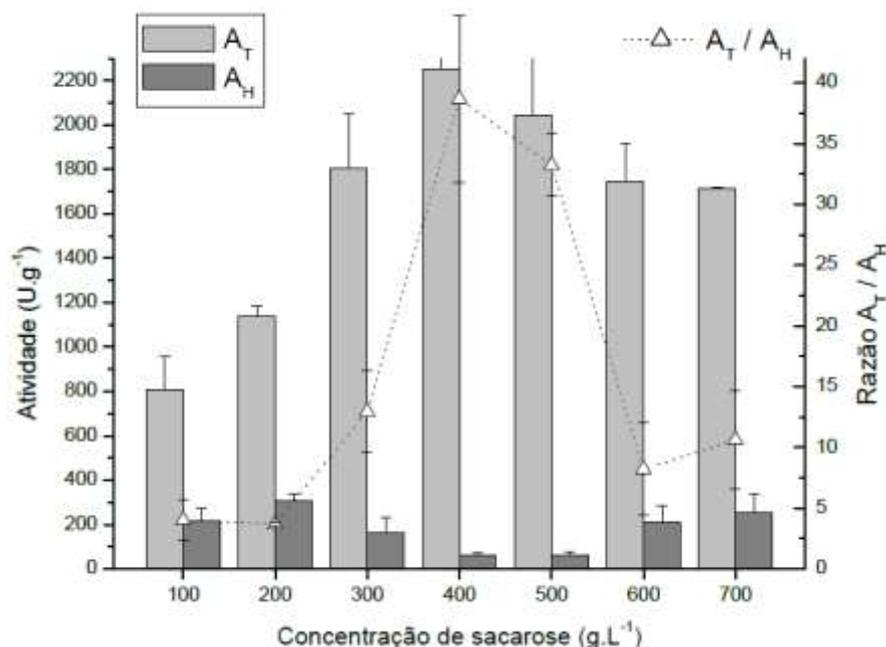


Figura 5.48 - Efeito da concentração de substrato nas atividades de transfrutoseilação e hidrolítica e na razão A_T/A_H da FTase micelial imobilizada (reticulada + aprisionada), utilizando alg. B.V., 0,2 mol.L⁻¹ de cloreto de cálcio e bico de gotejamento de 0,7 mm na obtenção das esferas. Meio reacional constituído por solução de sacarose a diferentes concentrações e solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5, a 50 °C.

Fonte: Autora.

As Figuras 5.47 e 5.48 indicam que a máxima atividade de transfrutoseilação ocorreu com a concentração de sacarose de 400 g.L⁻¹, que também correspondeu a máxima razão A_T/A_H , para os dois casos. Entretanto, com a biomassa livre, as A_{TS} foram relativamente altas na faixa de 200 a 500 g.L⁻¹, enquanto com a biomassa imobilizada as atividades se mantiveram elevadas na faixa de 300 a 700 g.L⁻¹.

Cunha (2017) e Garcia (2018) obtiveram as maiores atividades de transfrutoseilação com concentrações de sacarose de 470,6 g.L⁻¹ ($A_T = 259,1$ U.g⁻¹) e entre 264,3 e 480,2 g.L⁻¹ ($A_T = 800$ U.g⁻¹), com a FTase micelial de *Aspergillus Oryzae* IPT 301 livre e reticulada com glutaraldeído, respectivamente. Com isso, verificou-se um aumento significativo na atividade enzimática, cerca de 2,82 vezes, ao envolver a biomassa reticulada em alginato de cálcio, se comparado à enzima somente reticulada. Além disso, nos dois casos as A_{TS} mais baixas foram obtidas para as menores concentrações de substrato avaliadas, o que pode ser atribuível à desintegração da biomassa (2 min com Turrax®), etapa presente na obtenção da FTase aprisionada em alginato.

Após a FTase micelial ter alcançado sua atividade de transfrutoseilação máxima (utilizando 400 g.L⁻¹ de sacarose) observou-se um decréscimo nas A_{TS} , em ambos os casos apresentados, o que pode indicar uma possível inibição pelo substrato devido à saturação do complexo enzimático pelo substrato ou por algum dos produtos formados (ANTOŠOVÁ;

POLAKOVIČ, 2001). Além disso, essa redução pode ser proveniente da acessibilidade limitada do substrato na matriz (ASHFAQUE; SOLOMON; PATHAK, 2015).

Com a biomassa livre as atividades hidrolíticas se mantiveram baixas ao utilizar baixas concentrações de substrato, assim como apontado por Cunha (2017), e as melhores razões A_T/A_H foram obtidas na faixa de 100 a 400 g.L⁻¹. Entretanto, com a biomassa imobilizada houve um aumento nas A_H s em concentrações de sacarose inferiores a 300 g.L⁻¹. Esse mesmo comportamento também foi observado por Garcia (2018) e Zeng et al. (2016). Em contraponto, as menores atividades hidrolíticas foram verificadas na faixa de 400 a 500 g.L⁻¹ de sacarose, que, conseqüentemente, foi o intervalo onde foram obtidas as maiores razões A_T/A_H , ou seja, os maiores rendimentos de FOS.

A cinética enzimática de transfrutossilação dos biocatalisadores livre e imobilizado (reticulado e aprisionado em gel de alginato) foi avaliada a partir dos modelos de Michaelis-Menten e de Hill utilizando o software Origin[®] 2017 nos tempos de 30 e 60 segundos de reação, e com as concentrações de sacarose de 100, 200, 400 e 600 g.L⁻¹. Primeiramente foram determinadas as velocidades iniciais de transfrutossilação nos dois tempos avaliados, para essas quatro concentrações de substrato, e, em seguida, foram obtidas as Figuras 5.49 e 5.50, que apresentam os ajustes aos dados experimentais obtidos, com os biocatalisadores livre e imobilizado, respectivamente. A Tabela 5.8 apresenta os coeficientes de determinação de erros (R^2) para os ajustes realizados. Os parâmetros cinéticos para cada modelo estão dispostos nas Tabelas 5.9 e 5.10, que mostram os resultados obtidos também com a biomassa livre e imobilizada, respectivamente.

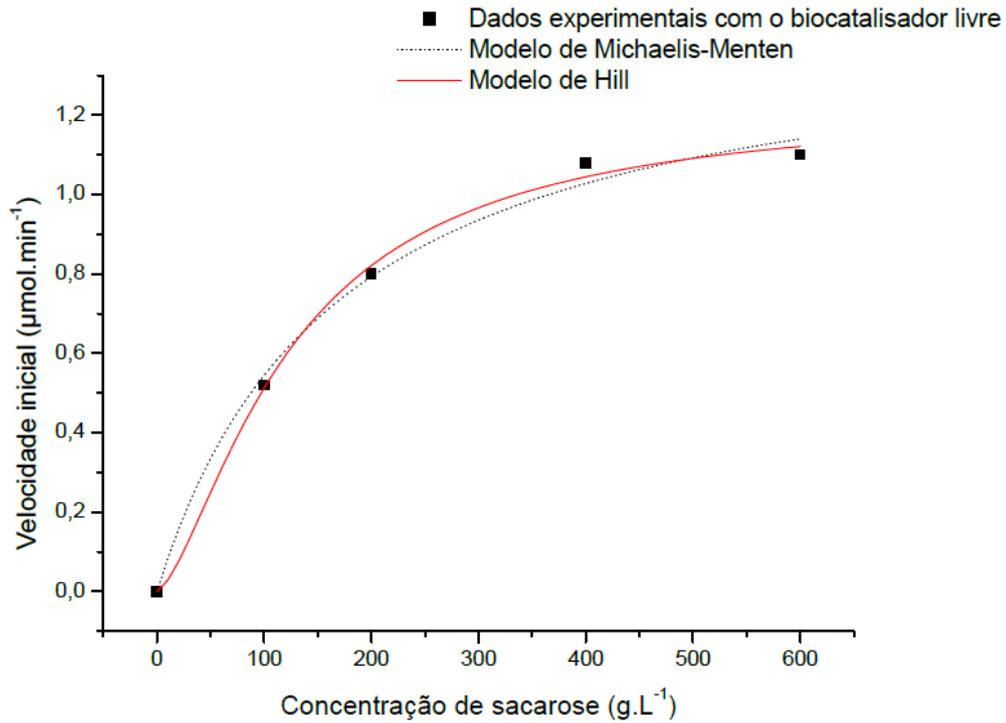


Figura 5.49 - Comparação dos resultados obtidos experimentalmente e previstos pelos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill com a FTase micelial livre.

Fonte: Autora.

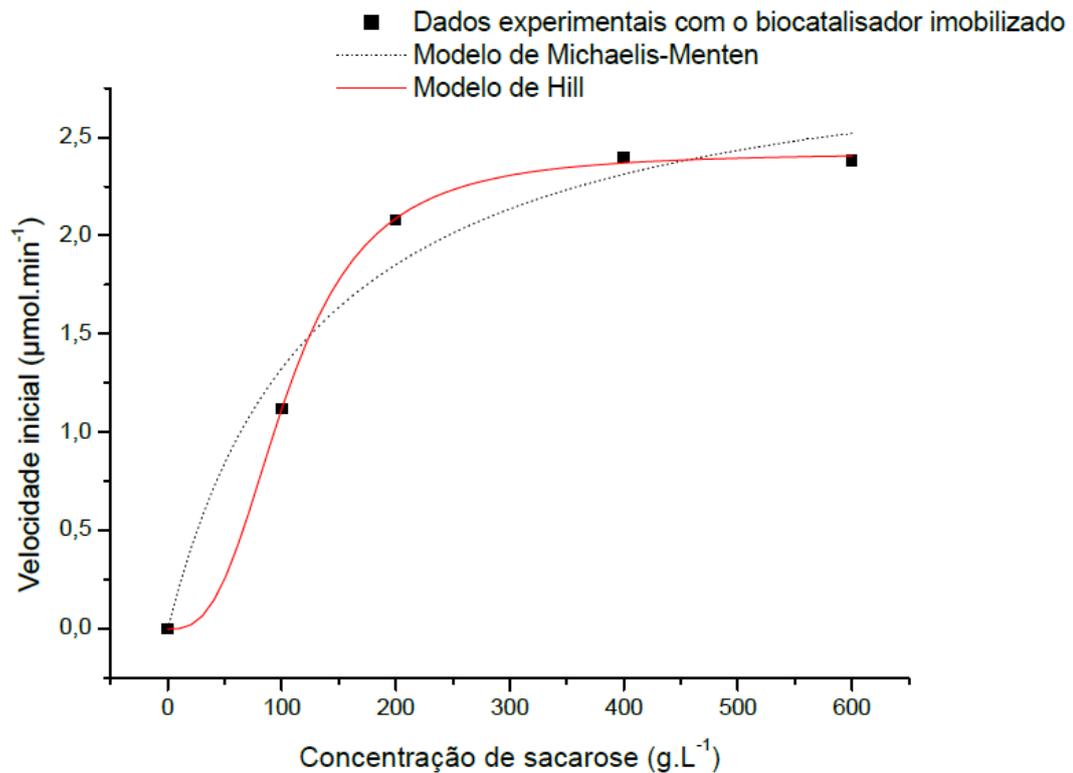


Figura 5.50 - Comparação dos resultados obtidos experimentalmente e previstos pelos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill com a FTase micelial imobilizada (reticulada e aprisionada em gel de alg. B.V. reticulada com 0,2 mol.L⁻¹ de Ca²⁺ e utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm na obtenção das esferas).

Fonte: Autora.

Tabela 5.8 - Coeficientes de determinação de erros obtidos com diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial livre e imobilizada.

	Modelo	R²
Biomassa livre	Modelo de Michaelis-Menten	0,994
	Modelo de Hill	0,997
Biomassa imobilizada	Modelo de Michaelis-Menten	0,972
	Modelo de Hill	0,999

Fonte: Autora.

Tabela 5.9 - Parâmetros cinéticos obtidos com a FTase micelial livre.

	Modelo de Michaelis-Menten	Modelo de Hill
V_{máx} (μmol.min⁻¹)	1,46 ± 0,09	1,23 ± 0,09
K_m (g.L⁻¹)	168,06 ± 29,76	-
K_{0,5} (g.L⁻¹)	-	125,20 ± 15,52
N	-	1,49 ± 0,34

Fonte: Autora.

Tabela 5.10 - Parâmetros cinéticos obtidos com a FTase micelial imobilizada.

	Modelo de Michaelis-Menten	Modelo de Hill
V_{máx} (μmol.min⁻¹)	3,07 ± 0,38	2,42 ± 0,02
K_m (g.L⁻¹)	132,11 ± 52,12	-
K_{0,5} (g.L⁻¹)	-	105,47 ± 1,85
N	-	2,86 ± 0,20

Fonte: Autora.

O ajuste dos dados experimentais ao modelo de Hill apresentou maiores coeficientes de determinação de erros (R²) com o biocatalisador imobilizado, se comparado ao modelo de Michaelis-Menten (MM). Portanto, nesse caso, verifica-se que o modelo de Hill ajustou-se de maneira mais satisfatória aos dados que o modelo de MM. Com a biomassa livre os valores de R² foram muito similares, o que justifica o uso do modelo de Michaelis-Menten, que é mais comum e possui menos parâmetros que o modelo de Hill, facilitando a obtenção de resultados. Além disso, a relação entre concentração de substrato e velocidades iniciais seguiu uma curva hiperbólica. Portanto, concentrações mais baixas de substrato levaram à cinética de primeira ordem, onde a taxa de reação aumenta à medida que a concentração do substrato também aumenta.

Analisando as Tabelas 5.9 e 5.10, verifica-se uma redução no valor de K_m (MM) de 168,06 para 132,11 g.L⁻¹ e de K_{0,5} (Hill) de 125,20 g.L⁻¹ para 105,47 g.L⁻¹ (Hill), após a

reticulação e aprisionamento da biomassa em alginato de cálcio. Isso indica uma redução na concentração de substrato em que a velocidade de reação é dada pela metade da velocidade máxima de produção de FOS após a imobilização, o que representa um aumento na afinidade da enzima pelo substrato após o processo de reticulação e aprisionamento em gel de alginato (SHULER e KARGI, 2002).

Também foi verificada uma elevação na velocidade máxima de reação, para os dois modelos avaliados, passando de 1,46 para 3,07 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (MM) e de 1,23 para 2,42 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (Hill) com a FTase micelial livre e reticulada aprisionada, respectivamente.

O possível aumento de afinidade do biocatalisador pela sacarose após a imobilização pode ajudar a explicar a elevação nas atividades de transfrutossilacção obtidas, a redução nas A_H s e o conseqüente aumento nas razões A_T/A_H , isto é, nos rendimentos de FOS. Esse acréscimo de afinidade promove um aumento na frequência das reações de transferência de um grupo frutossil para uma molécula de sacarose, ocasionando uma melhoria na atividade de transfrutossilacção e reduzindo a transferência de grupos frutossil para o meio aquoso (atividade hidrolítica) (HIDAKA; HIRAYAMA; SUMI, 1988; CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007).

O modelo de Hill geralmente possui um bom ajuste quando se utiliza enzimas que transferem grupos frutossil (GHAZI et al., 2007). Os coeficientes de Hill (n) obtidos com a biomassa livre (1,49) e com o micélio imobilizado (2,86) (Tabelas 5.9 e 5.10) indicam uma cooperatividade positiva, ou seja, uma elevação na afinidade dos sítios ativos da enzima pelo substrato após a reação da primeira molécula de substrato com um sítio ativo (WEISS, 1997), sendo que a cooperatividade foi ainda maior quando se utilizou o biocatalisador imobilizado.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo comprovou que a utilização da FTase micelial obtida por fermentação de *Aspergillus oryzae* IPT 301, previamente reticulada com glutaraldeído, dispersada mecanicamente e envolvida em alginato de cálcio, produz esferas com boa estabilidade frente a agressões do meio e apresenta um comportamento superior em termos de atividade de transfrutossilção e produtividade.

As seguintes conclusões complementares são listadas:

A. Com relação à metodologia de envolvimento e sua estabilidade:

- a) A dispersão mecânica pelo Turrax[®] dos filamentos do micélio na solução polimérica de gotejamento intensifica a capacidade enzimática da FTase;
- b) O tipo de biopolímero empregado (solução contendo 4,0% em massa de alginato de baixa viscosidade), a concentração de biomassa seca nas esferas (3,0% em massa), o íon divalente reticulante e sua concentração (0,2 mol.L⁻¹ de CaCl₂), bem como o diâmetro da abertura do bico de gotejamento utilizado (0,7 mm), são fatores essenciais para se maximizar as características de conservação das esferas e a eficiência de sua atividade de transfrutossilção;
- c) Esferas assim produzidas mantinham sua atividade enzimática após nove dias de armazenamento a 4 °C;
- d) As esferas contendo a biomassa reticulada apresentaram uma maior estabilidade térmica e meia vida quando comparadas à enzima livre, sendo termoestáveis nas temperaturas de 30 e 40 °C;
- e) As esferas perdem apenas cerca de 4% de sua atividade de transfrutossilção quando pré-armazenadas sob pH 5,5, por 24 horas a 4 °C, enquanto a biomassa livre apresenta uma queda de 38% na A_T;
- f) No sexto ciclo de uso (50°C, pH 5,5 e 60 min de reação) a atividade enzimática retraiu apenas 4%, enquanto com a FTase micelial livre obteve-se uma redução de cerca de 50% na A_T;
- g) Ao aplicar o biocatalisador em reações sucessivas de 4 horas cada, a biomassa imobilizada reteve 70% de sua atividade inicial até o quinto ciclo, e a biomassa livre manteve apenas 41% de seu potencial reativo.

B. Com relação às condições de operação do reator contendo essas esferas:

- a) A temperatura de 50 °C, o pH de 5,5 e a concentração de sacarose de 400 g.L⁻¹ do meio reacional produzem as mais altas conversões, com o biocatalisador livre e imobilizado;
- b) O ajuste dos dados experimentais aos modelos cinéticos mostrou que o modelo de Hill ajustou-se de maneira mais satisfatória aos dados que o modelo de Michaelis-Menten, ao utilizar o biocatalisador imobilizado;
- c) Os parâmetros cinéticos obtidos revelam um aumento na afinidade da enzima pelo substrato após a imobilização, ocasionando uma melhoria na atividade de transfrutossilação e reduzindo a atividade hidrolítica.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Utilização das esferas de alginato contendo a biomassa reticulada com glutaraldeído, nas condições ótimas de imobilização estabelecidas, em um reator de leito fixo ou fluidizado, para avaliação de seu uso em processos contínuos;
- b) Otimização das condições de operação do reator de fluxo contínuo .

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, T.E. et al. Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p.1099-1104, 2004.
- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Effects of the addition of substrate and salts in both the fructosyltransferase immobilization and its catalytic properties. **Journal Food Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 520-527, 2012.
- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2011.
- ALI, S.; NAWAZ, W. Biotransformation of L-tyrosine to dopamine by a calcium alginate immobilized mutant strain of *Aspergillus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1435-1444, 2016.
- ALLEN, L. et al. Edible corn-carbohydrate food coatings: Development and physical testing of a starch-alginate coating. **Food Technology**, v.17, p.1437, 1963.
- ALMEIDA, A.C.S. et al. Sucrose hydrolysis catalyzed by autoimmobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, 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.
- AMOTZ, S. **Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent**. [s.l.]: Novo Industri A/S., 1987.
- ANDREWS, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, p. 707-723, 1968.
- ANTOSOVÁ, M. et al. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 135, n. 58, 2008.
- ANTOSOVÁ, M.; POLAKOVIC, M. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 350, 2001.
- ARIGA, K.J.I.Q.M. et al. Enzyme nanoarchitectonics: organization and device application. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437-6474, 2013.
- ASHFAQUE, M.; SOLOMON, S.; PATHAK, N. Kinetic Study of Immobilized Cellobiase Produced from Immobilized Wild-Type *Trichoderma longibrachiatum*. **Sugar Tech**, v. 18, n. 4, p. 340–346, 2015.
- ASSIS, S.A. et al. Gelatin immobilized pectin methyl esterase for production of low methoxyl pectin. **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 333–337, 2004.

- AXELSSON, A.; PERSSON, B. Determination of effective diffusion coefficients in calcium alginate gel plates with varying yeast cell content. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 18, p. 231-250, 1988.
- BALI, V. et al. Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1475-1490, 2015.
- BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, n. 4, p. 3894-3912, 2014.
- BARBOSA, O. et al. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 49-61, 2013.
- BARRANCO-FLORIDO, E. et al. Immobilization system of *Kluyeromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 513-519, 2001.
- BENNETT, T. P.; FRIEDEN, E. Modern Topics in Biochemistry. **Macmillan**, p. 43-45, 1969.
- BHATTI, H.N. et al. Chemical modification results in hyperactivation and thermostabilization of *Fusarium solani* glucoamylase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 177-185, 2007.
- BLEMUR, L. et al. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. **Biotechnol Appl Biochem.**, v. 63, n. 3, p. 344-353, 2016.
- BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BOKKHIM, H. et al. In-vitro digestion of different forms of bovine lactoferrin encapsulated in alginate micro-gel particles. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 231-242, 2015.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: Fundamentos**. v. 1, Ed. Blucher, São Paulo, p. 254, 2001.
- BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺ induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089-1096, 2001.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-50, 2009.
- BRENDA. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. **Information on E.C 2.4.1.9**. Disponível em: < <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9>>. Acesso em: 28 ago. 2016.
- BROMBERG, A.; MARX, S.; FRISHMAN, G. Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 961-996, 2008.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biotacalisadores imobilizados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 36, n. 36, p.47-57, 2006.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262-6276, 2013.
- CAO, L.; LANGEN, L.V.; SHELDON, R.A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-94, 2003.
- CARVALHO, C.M.L.; CABRAL, J.M.S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochimie**, v. 82, p. 1063-1085, 2000.

- CASTRO, C.C. et al. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82–90, 2017.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G.E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, N. 5, p. 272–283, 2006.
- CHEN, L. et al. Bifunctional Graphene/gamma-Fe₂O₃ hybrid aerogels with double nanocrystalline networks for enzyme Immobilization. **Journal of the International Adsorption Society**, v. 9, n. 13, p. 2331-2340, 2013.
- CHEN, S.C.; SHEU, D.C.; DUAN, K.J. Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, p. 1105, 2014.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153, 1996.
- CHEUNG, D.T. et al. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. **Connective Tissue Research**, v. 13, p. 109-115, 1985.
- CHIEN, C.S.; LEE, W.C.; LIN, T.J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 252, 2001.
- CHRASTIL, J. Gelation of calcium alginate: Influence of rice starch or rice flour on the gelation kinetics and on the final gel structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 874–876, 1991.
- COVIELLO, T. et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 5-24, 2007.
- COVIZZI, L.G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160. 2007.
- CRUZ, J. et al. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, n. 1, p. 7-14, 2012.
- CUERVO-FERNÁNDEZ, R. et al. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus sp.* 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 268, 2004.
- CUERVO-FERNÁNDEZ, R. et al. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 87, 2007.
- CUNHA, J.S. **Produção e caracterização da enzima Frutossiltransferase de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 visando a obtenção de Frutooligossacarídeos** 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alenas, Poços de Caldas, MG, 2017.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.D.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 623-30, 2004.
- DAMODARAN, S. Protein: denaturation. In: Hi, Y.H. Handbook of food science, technology and engineering. [s.l.]:CRC Press, 2006.
- DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627, 2010.

- DIAS, J.C.; REZENDE, R.P.; LINARDI, V.R. Biodegradation of acetronile by cells of *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 immobilized in alginate, k-carrageenan and citric pectin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 61-66, 2000.
- DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437-6474, 2013.
- DOMINGUEZ, A.L. et al. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 07, p. 324, 2014.
- DONATI, I. et al. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1031-1040, 2005.
- DORTA, C. et al. Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1003, 2006.
- DRAGET, K.I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 47-55, 1997.
- DRIDI, F. et al. Thermolysin entrapped in a gold nanoparticles/polymer composite for direct and sensitive conductometric biosensing of ochratoxin A in olive oil. **Sensors and Actuators B**, v. 221, p. 480-490, 2015.
- EDELMAN, J.; BACON, J.S.D. The action of a hydrolytic enzyme system from *Helianthus tuberosus* L. on carbohydrates present in the tubers. **Biochemistry Journal**, v. 49, n. 4, p. 446-453, 1951.
- EL-ZATAHRY, A.A. et al. Preparation and in vitro release of theophylline loaded sodium alginate microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- ERTESVÅG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.
- FANG, H. et al. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles and immobilization of laccase. **Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition**, v. 24, n. 1, p. 42-47, 2009.
- FELTRE, R. **Química**, v. 2. São Paulo: Moderna, 2005.
- FERNANDES, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.
- FERNANDEZ-ARROJO, L. et al. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 677-682, 2013.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M.Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-25, 2013.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 517-523, 1995.
- FERREIRA, L. et al. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (*Subtilisin carlsberg*). **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 21, p. 189-199, 2003.
- 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. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.
- FONSECA, L.C. et al. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006
- FORDE, J. et al. Chemical modification and immobilisation of lipase b from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 66, p. 203–209, 2010.
- FIGURA, L. O.; TEIXEIRA, A. A. **Food Physics**. Berlin: Springer, 2007.
- FORTES, R.C; MUNIZ, L.B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligossacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 20, n. 3, p. 241-252, 2009.
- GANAIÉ, M.A.; LATEEF, A.; GUPTA, U.S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2143, 2014a.
- GANAIÉ, M.A. et al. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 840-844, 2014b.
- GANAIÉ, 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, 2014.
- GANAIÉ, 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, 2013.
- GARCIA, R.L. **Imobilização da enzima Frutosiltransferase micelial de *Aspergillus Oryzae* IPT-301, caracterização e aplicação na produção de Frutooligossacarídeos.** 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2018.
- GARCIA-CRUZ, C.H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química nova**, v. 31, p. 1800-1806, 2008.
- GASPARI, J.W.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1135-1140, 1999.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401, 1995.
- GILL, J.; ORSAT, V.; KERMASHA, S. 11. Optimization of encapsulation of a microbial laccase enzymatic extract using selected matrices. **Process Biochemistry**, v. 65, p. 55-61, 2018.
- GLICKSMAN, M. Red seaweed extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 2, p. 73, 1983.
- GOMES, F.M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.
- GONÇALVES, M.C.P. et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.016>.

- GRANT, G.T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973.
- GUPTA, P. et al. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4074-4076, 2009.
- HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Decker, 1989.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-68, 2009.
- HANG, H. et al. Design and properties of an immobilization enzyme system for inulin conversion. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 453-470, 2017.
- HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas-benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6277-6289, 2013.
- HAYASHI, S. et al. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 on porous silica. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 247-50, 1992.
- HAYASHI, S. et al. Production of a fructosyltransferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 395-400, 1990.
- HAYASHI, S. et al. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 3, p. 227-228, 1994.
- HEIDTMANN, R.B. et al. Kinetics and thermodynamic characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulphate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.
- HEINZEN, C.; BERGER, A.; MARISON, I. **Fundamentals of cell immobilization biotechnology**. London: Kluwer Academic, 2004.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 1181, 1988.
- HIRAYAMA, M.; NISHIZAWA, K.; HIDAKA, H. Production and characteristics of fructooligosaccharides. In: FUCHS, A. (Ed.). **Inulin and inulin-containing crops**. Wageningen: Elsevier Science, 1993.
- HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 667-673, 1989.
- HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION. **Instruction manual for model TM3000 tabletop microscope**. Japão, 2010.
- HODGSON, R.J. et al. Protein-doped monolithic silica columns for capillary liquid chromatography prepared by the sol-gel method: Applications to frontal affinity chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 2780-2790, 2004.
- HONIKEL, M.M. et al. Direct Measurement of a Biomarker's Native Optimal Frequency with Physical Adsorption Based Immobilization. **ACS Sensors**, v. 3, n. 4, p. 823-831, 2018.
- HOU, J.W. et al. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 452, p. 229-240, 2014.
- HUANG, M.P. et al. Highly efficient synthesis of fructooligosaccharides by extracellular fructooligosaccharide-producing enzymes and immobilized cells of *Aspergillus aculeatus* M105 and purification and biochemical characterization of a fructosyltransferase from the fungus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 33, p. 6425-6432, 2016.

- HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 8582–8594, 2008.
- HWANG, E.T., GU, M.B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 49-61, 2013.
- ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 0, p. 48-57, 2012.
- JARZEBSKI, A.B. et al. Covalent immobilization of trypsin on to siliceous mesostructured cellular foams to obtain effective biocatalysts. **Catalysis**, v. 124, p. 2–10, 2007.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Journal of International Adsorption Society**, v. 20, n. 5-6, p. 801-821, 2014.
- JIA, H.H. et al. The immobilization of D-hydantoinase and characterization under classic condition and microwave irradiation. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 74-79, 2006.
- JUNG, D.; STREB, C.; HARTMANN, M. Covalent anchoring of chloroperoxidase and glucose oxidase on the mesoporous molecular sieve SBA-15. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 762–778, 2010.
- JUNG, K.H. et al. Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1621–1624, 2011.
- KHOSLA, K. et al. Biodiesel production from lipid of carbon dioxide sequestering bacterium and lipase of psychrotolerant *Pseudomonas sp.* ISTPL3 immobilized on biochar. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 743-750, 2017.
- KLOKK, T.I.; MELVIK, J.E. Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 415–424, 2002.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.
- KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 236–239, 1996.
- LA ROTTA HERNANDEZ, C.E. et al. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 6, p. 582-588, 2005.
- LATEEF, A. et al. Production of fructosyltransferase by a local isolate of *Aspergillus niger* in both submerged and solid substrate media. **Acta Alimentaria**, v. 41, n. 1, p. 100-117, 2012.
- LATEEF, A.; OLOKE, J.K.; PRAPULLA, S.G. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1067–1070, 2007.
- LEE, B.B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E.S. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. **Chemical Engineering Technology**, v. 36, n. 10, p. 1627-1642, 2013.
- LEE, J.H.; SHINOHARA, S. Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructooligosaccharides from Sucrose Using *Penicillium citrinum* Cells. **The Journal of Microbiology**, v.39, n.4, p.331–333, 2001.

- LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n.1, p. 106-126, 2012.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 6. ed., São Paulo: Sarvier, 2014.
- LI, L. et al. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with x-ray diffraction. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 464-468, 2007.
- LIEW, C.V. et al. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 25-37, 2006.
- LIM, J.S. et al. Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 457-462, 2007.
- LIU, Y.; MA, L.; GAO, C. Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 8, p. 2361-2366, 2012.
- LONG, K. et al. In-situ crosslinking of *Aspergillus flavus* lipase: Improvement of activity, stability and properties. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1169-1174, 1996.
- LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70-75, 2005.
- MABEL, M.J. et al. Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 56-66, 2008.
- MAGALHÃES, S.P. **Estudo de modelos cinéticos para a reação de transesterificação enzimática de óleos vegetais**. 2010. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.
- MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v. 28, p. 283-295, 1996.
- MANECKE, G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 3, p. 185-187, 1972.
- MARANGONI, A.G. Enzyme kinetics a modern approach. **John Wiley & Sons**, p. 146-50, 2003.
- MARESMA, B. G. et al. Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* IPT-301 to improve the production of β -fructofuranosidase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 186-195, 2010.
- MÁRQUEZ, D.B.M. 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.
- MARTINEK, R. Practical Clinical Enzymology. **The American Journal of Medical Technology**, v. 31, p. 162, 1969.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- MATHAPATI, S. et al. Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium for tissue engineering. **Materials Science Engineering**, v. 33, n. 3, p. 1561-1572, 2013.

- MATTIASSON, B.; HAHN-HAGERDAL, B. Microenvironmental effects on metabolic behaviour of immobilized cells a hypothesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 52–55, 1982.
- MENDES, A.A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-40, 2011.
- MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790–802, 2004a.
- MIGNEAULT, I. et al. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1367-1378, 2004b.
- MILETIĆ, N. et al. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 196-201, 2009.
- 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.
- MØRCH, Ý. et al. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1471-1480, 2006.
- MORRIS, E.R. et al. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. **Carbohydrate Research**, v. 66, p. 145-154, 1978.
- MÜLLER, J.M.; SANTOS, R.L.; BRIGIDO, R.V. Produção de alginatos por microrganismos. **Polímeros**, v. 21, p. 305-310, 2011.
- MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A. β -fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 923–928, 2009.
- MUTANDA, T. et al. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recente advances and current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p.893–906, 2014.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V.H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for alpha-galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1903-1907, 2006.
- NEVES, P.A.A.A. **Estudo microcalorimétrico da inibição da acetilcolinesterase pelo agrotóxico carbaryl**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2015.
- OLIVEIRA, E.A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.
- ONDERKOVÁ, Z.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M. Properties of fructosyltransferase from Immobilized on an acrylic carrier. **Chemical Papers**, v. 61, n. 5, p. 359-363, 2007.
- OTTONI, C.A. et al. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 49, 2012.

- OUWERX, C. et al. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Polymer Gels Networks**, v. 6, n. 5, p. 393–408, 1998.
- PASSOS, L.M.N.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.
- PATEL, S.K.S. et al. Large-scale aerosol-assisted synthesis of biofriendly Fe₂O₃ yolk-shell particles: a promising support for enzyme immobilization. **Nanoscale**, v. 8, n. 12, p. 6728-6738, 2016.
- PETERSON, M.E. et al. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. **Biochemistry Journal**, v. 402, n. 2, p. 331–337, 2007.
- PLATKOVÁ, Z. et al. Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aerobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 6, p. 469–472, 2006.
- POHANKA, M. et al. Voltammetric biosensor based on acetylcholinesterase and different immobilization protocols: A simple tool for toxic organophosphate assay. **Analytical Letters**, v. 44, n. 7, p. 1254-1264, 2011.
- POLAKOVIC, M. et al. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 5, p. 667-683, 2017.
- PONCELET, D. et al. Theory of electrostatic dispersion of polymer solution in the production of microgel beds containing biocatalyst. **Advances Colloid Interface Science**, v. 79, n. 2, p. 213–228, 1999.
- RAWAT, H.K. et al. Continuous generation of fructose from *Taraxacum officinale* tap root extract and inulin by immobilized inulinase in a packed-bed reactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 134-140, 2017.
- RAZMI, H.; MOHAMMAD-REZAEI, R. Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase: Application to sensitive glucose determination. **Biosensors Bioelectronics**, v. 41, p. 498-504, 2013.
- ROBERFROID, M.; DELZENNE, N. Dietary fructans. In: **Annual Review of Nutrition**, v. 18, p. 117-143, 1998.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. [s.l.]: AMIC, 2009.
- ROIG, M.G.; RASHID, D.H.; KENNDY, J.F. High-alkaline protease from *Bacillus* PB92 entrapped in calcium alginate gel: physicochemical and microscopic studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 95-121, 1995.
- ROMANO, N. et al. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructooligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 202, p. 467, 2016.
- ROY, J.J.; ABRAHAM, T.E. Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 1, p. 31-36, 2006.
- SADANA, A. Enzyme deactivation. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. 349-446, 1998.
- SALAS-VALERO, L.M.; KIECKBUSCH, T.G.; MENEGALLI, F.C. Efeito da reticulação com íons Ba²⁺ nas propriedades físico-química e mecânica de filmes de alginato. In: **AGROBIOENVASES. JORNADAS INTERNACIONAIS SOBRE AVANÇO NA TECNOLOGIA DE FILMES E COBERTURAS FUNCIONAIS EM ALIMENTOS**, 3., 2011. **Anais...**Campinas: Unicamp, 2011. v.1, p. 144-147.

- SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Influence of media components and reaction parameters on the production of fructosyltransferase and fructooligosaccharides. **Sciences des Aliments**, v. 22, p. 277–287, 2002.
- SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *A. oryzae* CFF 202 and *A. pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 753–758, 2004a.
- SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Production of fructosyltransferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 530–537, 2004b.
- SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1085–1088, 2005.
- SANTOS, J.C. et al. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008.
- SANTOS-MORIANO, P. et al. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 18-25, 2015.
- SAQIB, A.A.N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489–511, 2012.
- SEIFERT, D.B.; PHILIPS, J.A. Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 562-568, 1997.
- SHEU, D.C. et al. Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia heimii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1745-1751, 2013.
- SHULER, M.L. **Bioprocess Engineering**: basic concepts. 2^a. Ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.
- SIDDIQUI, K.S. et al. Thermostabilization of carboxymethyl-cellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 325–329, 1997.
- SIMPSON, N.E. et al. The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated TC3 cells. **Biomaterials**, v. 25, p. 2603-2610, 2004.
- SINGH, A.K.; ROYCHOUDHURY, A.; JHA, S.K. Reusable glucose sensor based on enzyme immobilized egg-shell membrane. **Analytical Sciences**, v. 32, n. 10, p. 1077-1082, 2016a.
- SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 174, 2016b.
- SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. **Faraday Discussions Chemical Society**, v. 57, p. 263-274, 1974.
- SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71-77, 1990.

- SOLA-RABADA, A. et al. Biogenic porous silica and silicon sourced from Mexican Giant Horsetail (*Equisetum myriochaetum*) and their application as supports for enzyme immobilization. **Colloids and Surfaces B - Biointerfaces**, v. 166, p. 195-202, 2018.
- SOON-SHIONG, P. et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. **Lancet**, v. 343, n. 8903, p. 950-951, 1994.
- SOUZA, L.T.A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia aplicada à agro&Indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2016. 1069 p.
- 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.
- SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R.A. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p.72-80, 2006a.
- SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R.A. Development of polysaccharide gel-coated pellets for oral administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 139–147, 2006b.
- SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R.A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 205-213, 2008.
- STRAATHOF, A.J.J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-56, 2002.
- STRAND, B.L.; MORCH, Y.A.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Minerva Biotechnologies**, v. 12, n. 4, p. 223-233, 2000.
- TAKENAKA, M. et al. Acetyl-CoA production by encapsulated pyruvate ferredoxin oxidoreductase in alginate hydrogels. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 279-285, 2017.
- TALMAN, E.A.; BOUGHNER, D.R. Glutaraldehyde fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 60, n. 2, p. 369-373, 1995.
- TANAKA H.; MATSUMURA M.; VELIKY, I.A. Diffusion characteristics of substrates in Calcium alginate gel beads. **Biotechnology Bioengineering**, v. 26, n. 1, p. 53-58, 1983.
- TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. A novel method for the immobilization of beta-galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 27-30, 2002.
- THU, T.T.M.; KRASAEKOOPT, W. Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginoseus* using alginate and different copolymer types. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, p. 155-161, 2016.
- TURNER, J.S.; SEFTON, M.V. Immobilization of a lysine-terminated heparin to polyvinyl-alcohol. **Journal of Biomaterials Science - Polymer**, v. 5, n. 4, p. 353-369, 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.
- VAZ, J.M. **Preparação e caracterização de biofilmes ativos à base de alginato de diferentes estruturas poliméricas reticuladas com cálcio**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2012.

- VAZQUEZ-ORTEGA, P.G. et al. Stabilization of dimeric beta-glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 110, p. 38-45, 2018.
- VELINGS, N.M.; MESTDAGH, M.M. Physico-chemical properties of alginate gel beads. **Polymer Gels Networks**, v. 3, n. 3, p. 311–330, 1995.
- VESCOVI, V. et al. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055–2066, 2016.
- VOO, W.P. et al. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behavior. **European Polymer Journal**, v. 75, p. 343–353, 2016.
- XIE, Y. et al. Single-shot characterization of enzymatic reaction constants K_m and k_{cat} by an acoustic-driven, bubble-based fast micromixer. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 7495–7501, 2012.
- 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.
- WALT D.R.; AGAYN, V.I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, p. 425-430, 1994.
- WANG, T. Synthesis of neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v. 5, p. 1-6, 2015.
- WANG, Y. et al. Characteristics and trends of research on waste-to-energy incineration: a bibliometric analysis, 1999– 2015. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 95–104, 2017.
- WANG, Z.G. et al. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 189–195, 2009.
- WHITE, S.F. et al. Lactate, Glutamate and glutamine biosensors based on rhodinised carbon electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 295, n. 3, p. 243-251, 1994.
- WINE, Y. et al. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. **Biotechnology Bioengineering**, v. 98, n. 3, p. 711-718, 2007.
- 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.
- WONG, S.S.; WONG, L.J.C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 14, n. 11, p. 866-874, 1992.
- WU, J.C. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by cross-linking with glutaraldehyde followed by entrapment in alginate beads. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 5, p. 352-357, 2006.
- WU, J.C. et al. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase by entrapping in alginate-silica hybrid gel beads with simultaneous cross-linking with glutaraldehyde. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 6, p. 459-463, 2007.
- YUN, J.W. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.

- YUN, J.W.; SONG, S.K. Continuous production of fructooligosaccharides using fructofuranosidase immobilized on ion exchange resin. **Biotechnology Bioprocess Engineering**, v. 1, p. 18–21, 1996.
- ZENG, X.A. et al. Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as catalyst for bio-transformation. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 1072, 2016.
- ZHAI, R. et al. Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 214, p. 304-309, 2013.
- ZHANG, Z. et al. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 308-315, 2016.
- ZUCCA, P., SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139-14194, 2014.

APÊNDICE A

ESPECTROS DE ABSORÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E AÇÚCARES REDUTORES

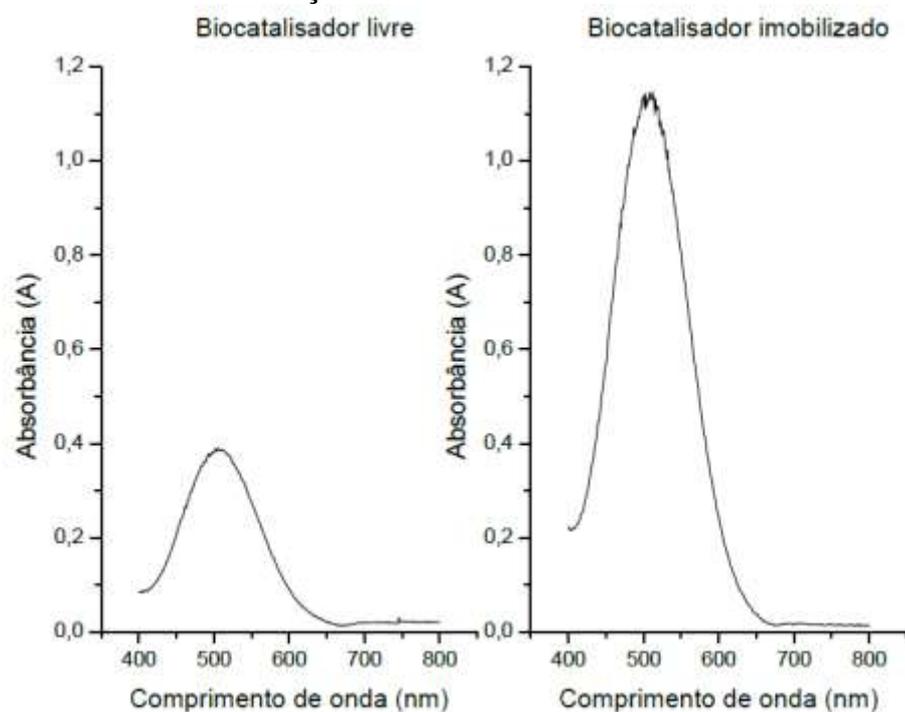


Figura A.1 - Espectro de absorção para a quantificação de glicose (GOD-PAP) após a reação enzimática de obtenção de FOS utilizando o biocatalisador livre e imobilizado.

Fonte: Autora.

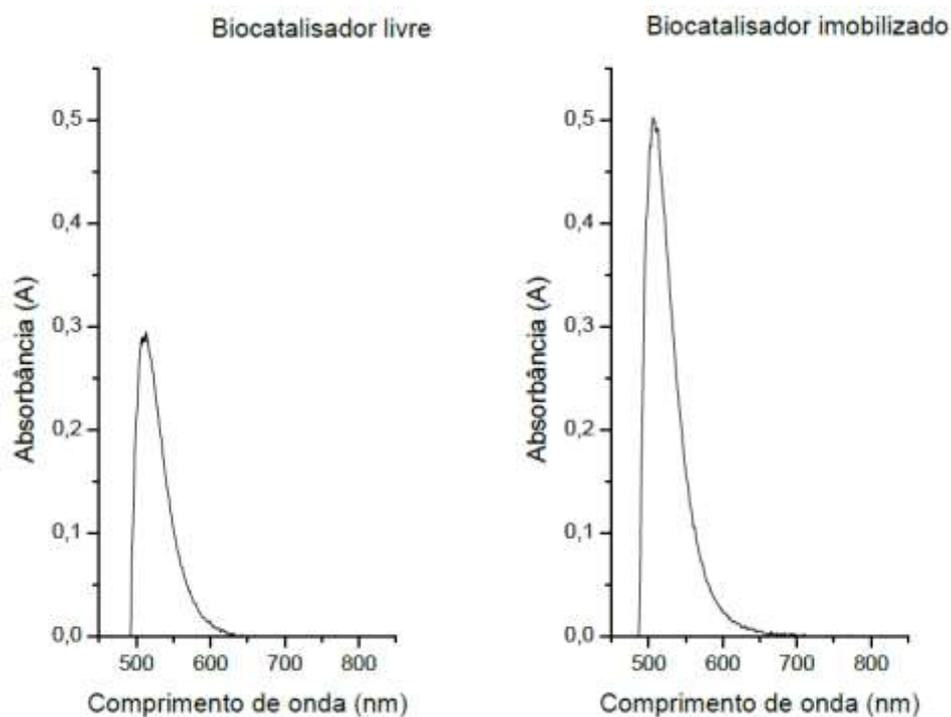


Figura A.2 - Espectro de absorção para a quantificação de açúcares redutores (DNS) após a reação enzimática de obtenção de FOS utilizando o biocatalisador livre e imobilizado.

Fonte: Autora.

APÊNDICE B

ATIVIDADES ENZIMÁTICAS OBTIDAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO

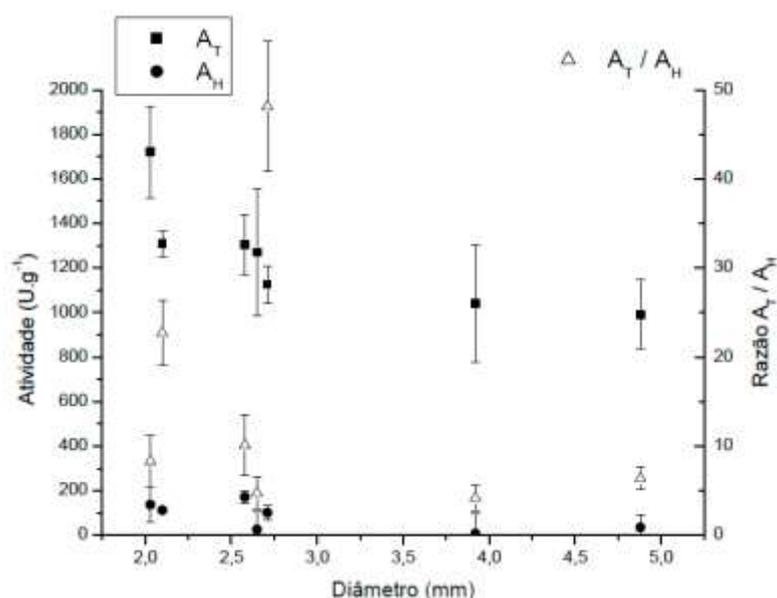


Figura B.1 - Atividades enzimáticas de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e razões A_T/A_H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64 \text{ U.g}^{-1}$).

Fonte: Autora.

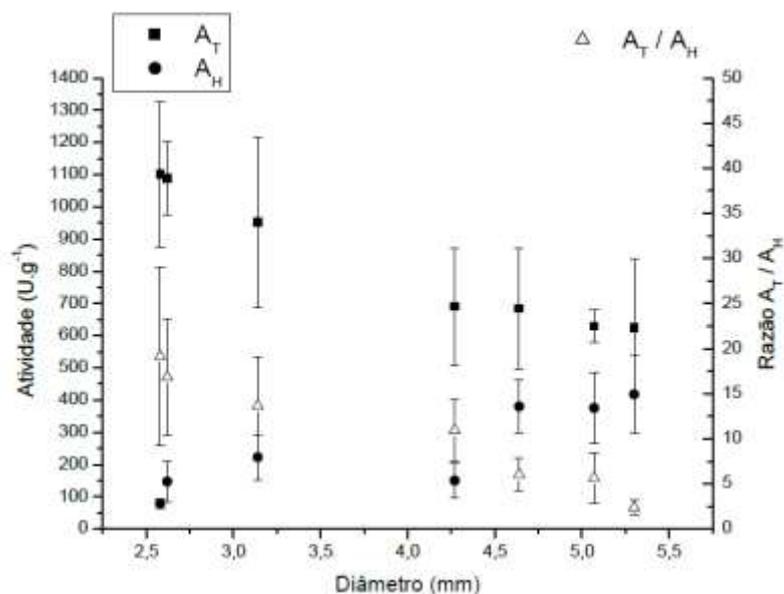


Figura B.2 - Atividades enzimáticas de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e razões A_T/A_H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. B.V. (4,0% m/m) reticulada por imersão em solução de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), em função dos diâmetros das esferas (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64 \text{ U.g}^{-1}$).

Fonte: Autora.

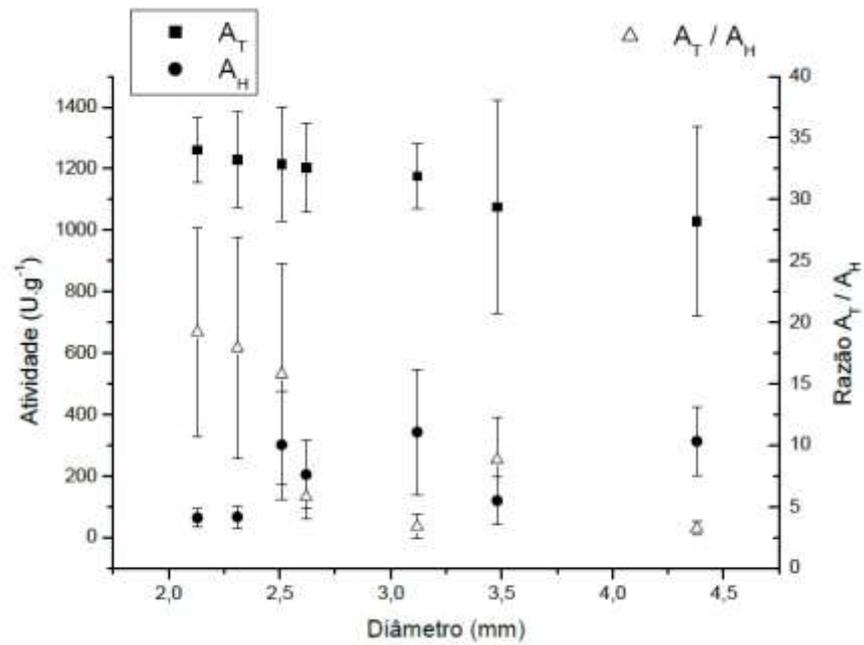
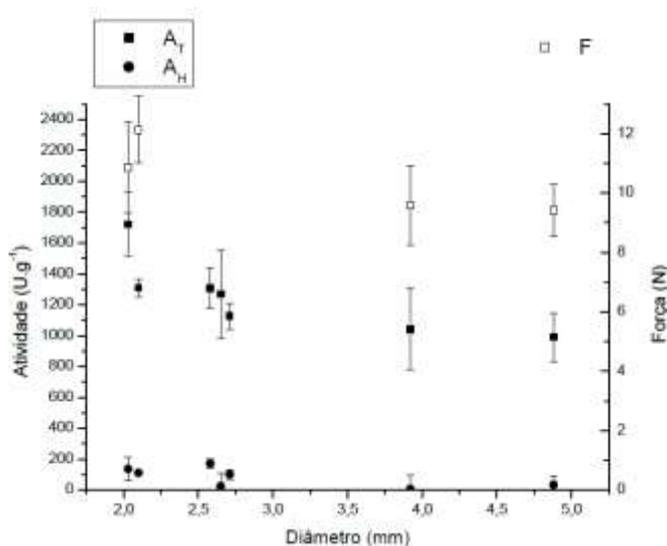


Figura B.3 - Atividades enzimáticas de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e razões A_T/A_H obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 mol.L⁻¹), em função dos diâmetros das esferas (A_T biomassa livre não dispersada: $504,89 \pm 81,64$ U.g⁻¹).

Fonte: Autora.

APÊNDICE C

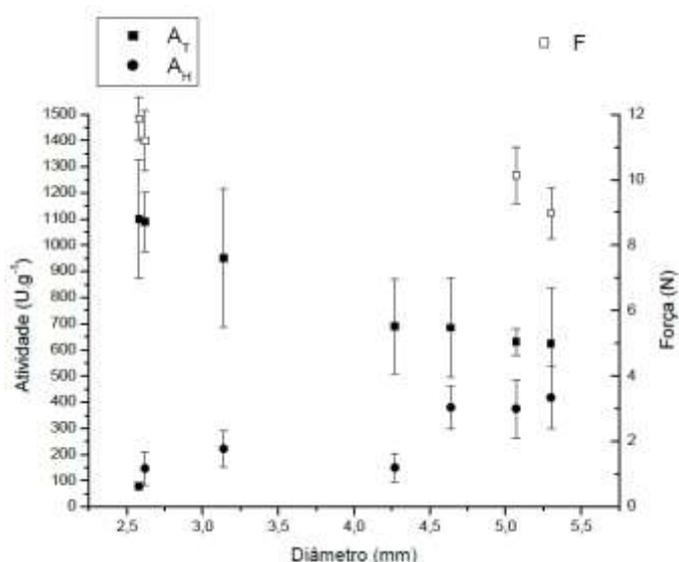
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E FORÇAS DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO MECÂNICA OBTIDAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO



F: força de resistência à compressão mecânica.

Figura C.1 - Atividades enzimáticas de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e forças de resistência à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de CaCl₂.2H₂O (0,5 mol.L⁻¹), em função dos diâmetros das esferas.

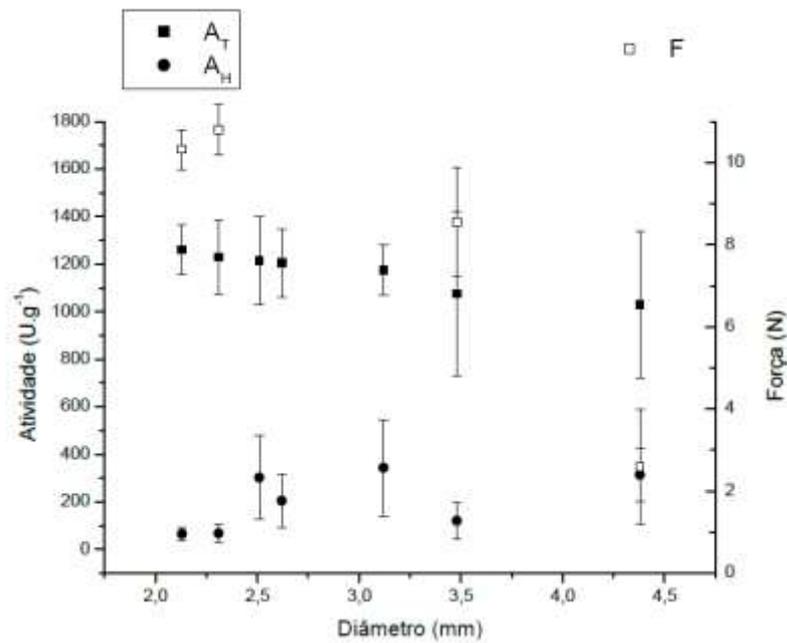
Fonte: Autora.



F: força de resistência à compressão mecânica.

Figura C.2 - Atividades enzimáticas de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e forças de resistência à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. B.V. (4,0% m/m) reticulada por imersão em solução de BaCl₂.2H₂O (0,01 mol.L⁻¹), em função dos diâmetros das esferas.

Fonte: Autora.



F: força de resistência à compressão mecânica.

Figura C.3 - Atividades enzimáticas de transfrutoseilação (A_T) e hidrolítica (A_H) e forças de resistência à compressão mecânica obtidas com a biomassa reticulada com glutaraldeído e aprisionada com alg. M.V. (1,2% m/m) reticulada por imersão em solução de BaCl₂.2H₂O (0,05 mol.L⁻¹), em função dos diâmetros das esferas.

Fonte: Autora.

APÊNDICE D

CONCENTRAÇÕES DE FOS AO LONGO DO TEMPO DE CONDUÇÃO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

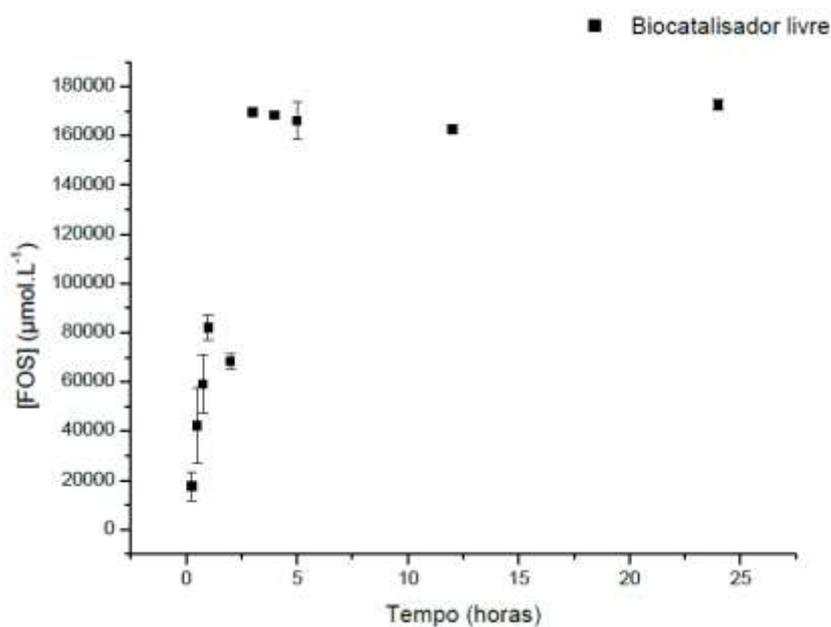


Figura D.1 – Concentrações de FOS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ao longo do tempo de condução da reação enzimática, em horas, obtidas com o biocatalisador livre.

Fonte: Autora.

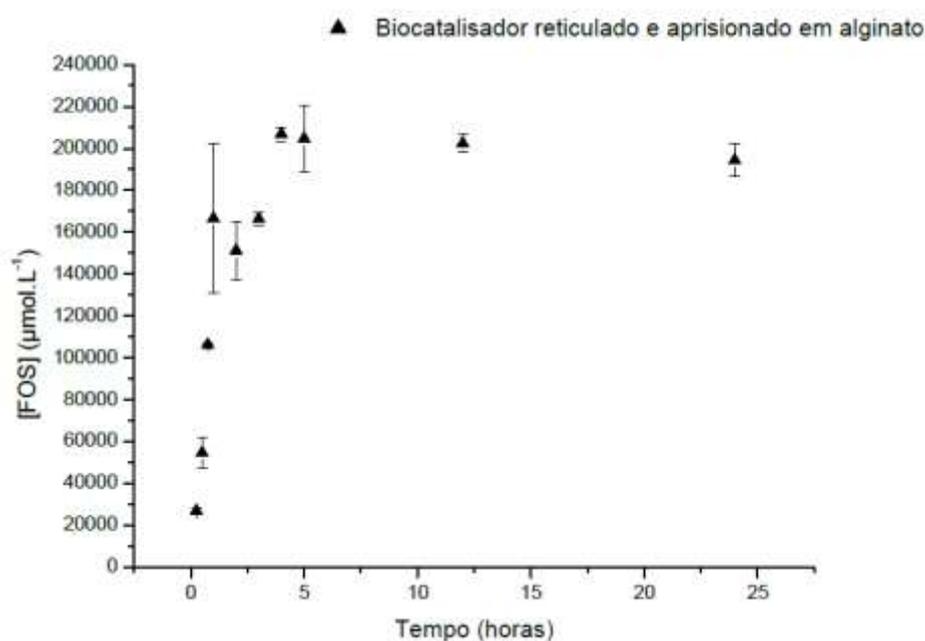


Figura D.2 – Concentrações de FOS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ao longo do tempo de condução da reação enzimática, em horas, obtidas com o biocatalisador reticulado com glutaraldeído e aprisionado em alg. B.V. (4,0% m/m) reticulado por imersão em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizando o bico de gotejamento de 0,7 mm na obtenção das esferas.

Fonte: Autora.