

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GIANCARLO DE SOUZA DIAS

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO COM
BIOMASSA CATALÍTICA DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas/MG

2020

GIANCARLO DE SOUZA DIAS

IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO COM BIOMASSA
CATALÍTICA DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna
Coorientador: Prof. Dr. Sergio A. V. Morales

Poços de Caldas / MG

2020

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

Dias, Giancarlo de Souza.

D541i Implementação de reator de leito fixo empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de frutooligossacarídeos / Giancarlo de Souza Dias. – Poços de Caldas/MG, 2020.

95 f. –

Orientador(a): Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2020.

Bibliografia.

1. Cinética enzimática. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. Massa – Transferência. I. Perna, Rafael Firmani. II. Título.

CDD – 660.2

GIANCARLO DE SOUZA DIAS

**IMPLEMENTAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO EMPACOTADO COM BIOMASSA
CATALÍTICA DE *Aspergillus oryzae* IPT-301 PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 27 de março de 2020

Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Instituição: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP)

Prof. Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Firmani Perna, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2020, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marlus Pinheiro Rolemberg, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2020, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alfredo Eduardo Maiorano, Usuário Externo**, em 08/04/2020, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0284746** e o código CRC **764C3A96**.

*Dedico a Deus, aos meus
pais e a todos que estiveram
presentes nessa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por sempre me apoiarem de todas as formas, permitindo alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Firmani Perna, pelo profissionalismo, amizade, ensinamentos, apoio e confiança depositada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, por estar sempre presente no desenvolvimento do trabalho e dirimindo dúvidas com sabedoria.

Aos alunos de iniciação científica Érica Daniely, Lukas Romano e Giovanna Durazzo assim como à minha amiga Jaqueline Rodrigues que me acompanharam e auxiliaram nas intermináveis horas no laboratório.

Aos amigos mestrandos por toda ajuda e companheirismo ao longo desses dois anos.

Às mestras, Larissa Lemos Faria e Maria Carolina Pereira Gonçalves por todo o ensinamento ao longo da pesquisa.

Aos técnicos e funcionários da UNIFAL-MG sempre muito prestativos.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT/SP) e, em especial, aos Dr. Alfredo Eduardo Maiorano pelo apoio prestado na realização de análises laboratoriais.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigado a todos!

RESUMO

Frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares prebióticos de baixa caloria que apresentam diversos benefícios à saúde humana. São disponibilizados comercialmente mediante produção sintética, por reação de transfrutossilacção, utilizando enzimas microbianas como a frutossiltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) e sacarose como substrato. Dentre os microrganismos potencialmente produtores destas enzimas, destaca-se o *Aspergillus oryzae* IPT-301, sintetizando FTase micelial (enzima aderida a biomassa microbiana) com elevada atividade de transfrutossilacção (A_t). Atualmente, a produção de FOS é conduzida em biorreatores em batelada, um processo lento e oneroso. Portanto, torna-se necessária a implementação de sistemas de reação contínuos, em reatores de leito fixo (PBR), que aumentem o volume de produção de FOS e diminuam seus custos de produção. Para isso, o uso de biocatalisadores na forma de células íntegras (biomassa catalítica) para a produção do açúcar torna-se vantajoso por exibirem suporte natural para própria enzima. Diante deste contexto, este trabalho propôs implementar um sistema de reação contínuo em reator PBR, empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, visando obter elevada atividade de transfrutossilacção para a produção de FOS. Para isso, buscou-se, inicialmente, avaliar a influência dos parâmetros de projeto (diâmetro das esferas de biomassa e altura do leito catalítico) no tempo médio de residência, por meio da caracterização da Distribuição do Tempo de Residência (DTR). Entretanto, por se tratar de um leito poroso, foi necessário saturar a biomassa catalítica com azul de metileno (AM) para reduzir os erros associados a adsorção do corante no leito catalítico. Posteriormente, foi estudada a influência da temperatura do meio reacional (40 °C, 50 °C e 60 °C), da concentração de sacarose (173 g L⁻¹ a 573 g L⁻¹) e da vazão volumétrica de alimentação de substrato (5,0 mL min⁻¹ a 20,0 mL min⁻¹) nos perfis de atividade de transfrutossilacção. Também foram obtidos os parâmetros cinéticos mediante ajustes dos modelos de Michaelis-Menten e Hill aos dados experimentais e, por fim, realizados estudos de transferência de massa interna (TMI) e externa (TME) assim como ensaios de estabilidade operacional com e sem reciclo no reator PBR. Para a saturação da biomassa catalítica *in situ*, foram necessários dois ciclos de adsorção/purga e, como a melhor condição de projeto, obteve-se um leito catalítico de 13,0 cm de altura constituído por esferas de biomassa de 6,0 ± 0,4 mm de diâmetro. Os melhores perfis de atividade enzimática foram obtidos operando o reator PBR a 50 °C, alimentado com solução de sacarose de 473 g L⁻¹, pH 5,5, a uma vazão volumétrica de 11,5 mL min⁻¹. A cinética enzimática foi melhor ajustada ao modelo de Michaelis-Menten. Sob essas condições, permitiu-se observar que a reação não foi limitada pelos efeitos de TMI e TME. Os ensaios de estabilidade operacional mostraram, nos primeiros 420 min de reação, uma redução de 25 % na atividade enzimática, mantendo-se estável após esse período. Comparado ao processo batelada, sob as mesmas condições operacionais, verificou-se que o processo contínuo apresentou os melhores resultados para a atividade de transfrutossilacção e estabilidade operacional. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a implementação do processo contínuo, para a produção de FOS, mostrou-se promissora ao se alcançar perfis elevados de atividades enzimáticas em reator PBR recheado com biomassa catalítica microbiana.

Palavras-chave: Frutooligossacarídeos. Frutossiltransferase. Reator de leito fixo. Distribuição do tempo de residência. Michaelis-Menten. Transferência de massa.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are low-calorie prebiotic sugars that have several benefits to human health. They are commercially available through synthetic production, by transfructosylation reaction, using microbial enzymes such as fructosyltransferase (FTase, E.C.2.4.1.9) and sucrose as substrate. Among the microorganisms potentially producers of this enzymes, *Aspergillus oryzae* IPT-301 stands out, synthesizing mycelial FTase (enzyme adhered to microbial biomass) with high transfructosylation activity (A_t). Currently, the production of FOS is carried out in batch bioreactors, a slow and costly process. Therefore, it is necessary to implement continuous reaction systems, in fixed bed reactors (FBR), which increase the volume of FOS production and decrease its production costs. For this, the use of biocatalysts in the form of whole cells (catalytic biomass) for the production of sugar becomes advantageous because they exhibit natural support for the enzyme itself. In this context, this work proposed to implement a continuous reaction system in a FBR reactor, packed with catalytic biomass of *Aspergillus oryzae* IPT-301, aiming at obtaining high transfructosylation activity for the production of FOS. To this end, we initially sought to obtain the best design conditions (diameter of the biomass spheres and height of the catalytic bed) through studies and characterization of the Residence Time Distribution (RTD). However, since it is a porous bed, it was necessary to saturate the catalytic biomass with methylene blue (AM) to reduce the errors associated with the adsorption of the dye in the catalytic bed. Subsequently, the influence of operational parameters on the transfructosylation activity profiles was studied, evaluating the effect of the temperature of the reaction medium (40 °C, 50 °C and 60 °C), of the sucrose concentration (173 g L⁻¹ at 573 g L⁻¹) and the volumetric flow rate of substrate feed (5.0 mL min⁻¹ to 20.0 mL min⁻¹) in order to obtain the best reaction conditions. The kinetic parameters were also obtained by adjusting the Michaelis-Menten and Hill models to the experimental data and, finally, internal (TMI) and external (TME) mass transfer studies were carried out, as well as operational stability tests with and without recycling in the PBR reactor. For the saturation of the catalytic biomass *in situ*, two cycles of adsorption/purge were necessary and, as the best design condition, a catalytic bed of 13.0 cm in height was made up of spheres of biomass of 6.0 ± 0,4 mm in diameter. The best profiles of enzymatic activity were obtained operating the PBR reactor at 50 °C, fed with sucrose solution of 473 g L⁻¹, pH 5.5 and a volumetric flow rate of 11.5 mL min⁻¹. A kinetic enzyme was better fitted to the Michaelis-Menten model. Under these conditions, it is possible to observe that the reaction was not limited by the effects of TMI and TME. The stability tests showed, in the first 420 minutes of reaction, a 25% reduction in enzyme activity, remain stable after this period. Compared to the batch process, under the same operational conditions, it was found that the continuous process presented the best results for the activity of transfructosylation and operational stability. In view of the results obtained, it can be concluded that the implementation of the continuous process, for the production of FOS, has shown promise when reaching high profiles of enzymatic activities in a PBR reactor filled with microbial catalytic biomass.

Keywords: Fructooligosaccharides. Fructosyltransferase. Fixed-bed reactor. Residence time distribution. Michaelis-Menten. Mass transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os grupos dos frutanos e estruturas químicas dos seus principais compostos	18
Figura 2 - Grupos S, L, H e C das isotermas de adsorção	27
Figura 3 - PBR de leito único	32
Figura 4 - Curva de resposta à perturbação do tipo pulso	35
Figura 5 - Curva de resposta à perturbação do tipo degrau	36
Figura 6 - Regiões de limitação pela transferência de massa e pela própria reação.....	40
Figura 7 – Produção da biomassa catalítica e confecção das esferas de biomassa produzida .	44
Figura 8 - Esferas de biomassa catalítica de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 após a adsorção de AM, por processo batelada, para diferentes temperaturas.	46
Figura 9 - Reator enzimático e suas dimensões.....	47
Figura 10 - Aparato experimental para os processos de adsorção e reação	48
Figura 11 – Análises de MEV para amostra de biomassa livre de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 com diferentes ampliações	56
Figura 12 - Modelo cinético de adsorção de PPO do azul de metileno em biomassa microbiana ajustado aos dados experimentais para diferentes temperaturas. Condições operacionais – Concentração da solução 473 g L ⁻¹ de sacarose e 5 mg L ⁻¹ de azul de metileno.....	58
Figura 13 - Isotermas de adsorção de AM em biomassa de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C.....	59
Figura 14 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de isotermas de adsorção (Langmuir e SIPS) de corante AM (adsorvato) em biomassa microbiana (adsorvente) para as diferentes temperaturas	60
Figura 15 - Ciclos de saturação e purga de AM na biomassa microbiana em reator PBR.....	62
Figura 16 - Ciclos de saturação e purga para leito formado por esferas de vidro	63
Figura 17 - Curva do tempo médio de residência para a injeções do tipo pulso e degrau	65
Figura 18 - Tempo médio de residência, variância e assimetria para a condição operacional de 6,0 ± 0,4 mm diâmetro de partícula e altura do leito de 13,0 cm.....	67
Figura 19 - Perfis de atividade enzimática em função da temperatura do meio reacional: 40 °C, 50 °C e 60 °C. Condições operacionais – altura do leito catalítico 5,0 cm, diâmetro de partícula 3,0 ± 0,1 mm, concentração de solução reagente 473 g.L ⁻¹ , pH 5,5 e vazão de 11,5 mL min ⁻¹	68

Figura 20 - Perfis de atividade enzimática para diferentes concentrações de substrato e ajustes dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill aos dados experimentais no tempo de 35 minutos de reação. Condições operacionais – altura do leito catalítico 5,0 cm, diâmetro de partícula $3,0 \pm 0,1$ mm, temperatura da solução reagente 50°C e vazão de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$	70
Figura 21 - Perfis cinéticos da atividade de transfrutossilacção em função da vazão de sacarose à 5 mL min^{-1} , $7,5 \text{ mL min}^{-1}$, $11,5 \text{ mL min}^{-1}$, 15 mL min^{-1} e 20 mL min^{-1} . Condições operacionais: concentração de sacarose de 473 g L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C	72
Figura 22 – Regiões de limitação pela TME e pela velocidade de reação	76
Figura 23 - Estabilidade operacional com e sem reciclo para as vazões de substrato de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Condições operacionais: concentração de sacarose de 473 g L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C	79
Figura 24 - Perfil de atividade recuperada para a reação sem reciclo com vazão de solução aquosa de sacarose de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Condições operacionais: concentração 473 g L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C	80
Figura 25 - Curva analítica para a determinação das concentrações de azul de metileno.....	92
Figura 26 - Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR)	92
Figura 27 - Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G)	93
Figura 28 - Perfis de viscosidade dinâmica em função da concentração da solução aquosa de sacarose e em função da temperatura do meio reacional.....	94
Figura 29 - Reator operando com reciclo total	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição da atividade de transfrutossilção por diferentes autores.....	23
Tabela 2 - Artigos relacionados à produção contínua de FOS em PBR.....	33
Tabela 3 - Parâmetros $q_{m\acute{a}x}$, K_s e n do modelo de SIPS para diferentes temperaturas de adsorção	61
Tabela 4 - Dados experimentais dos momentos da DTR para injeções do tipo pulso e degrau no reator PBR.....	64
Tabela 5 - Valores dos momentos da DTR para diferentes diâmetros de partícula e altura de leito catalítico	66
Tabela 6 - R^2 e parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten e Hill	71
Tabela 7 - Propriedades físicas da água e da solução aquosa de sacarose 50 % (m/m) à 50 °C	74
Tabela 8 - Valores dos números adimensionais de Sherwood (Sh), Schmidt (Sc) e Reynolds de partícula (Re_p).....	75
Tabela 9 - Valores do coeficiente de difusão efetiva (D_{Ae}), concentração de sacarose na superfície do biocatalisador (C_{As}) e módulo de Thiele para a cinética de Michaelis-Menten (ϕ_m)	77
Tabela 10 - Valores do módulo de Thiele para cinética de reação de ordem zero (ϕ_0) e um (ϕ_1) e fatores de efetividade interna para as cinéticas de reação de ordem zero (η_{i0}), um (η_{i1}) e Michaelis-Menten (η_{im})	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES	17
3.2	ENZIMAS FRUTOSILTRANSFERASE E β -FRUТОFURANOSIDADE	21
3.2.1	Atividade de transfrutossilacção (At).....	22
3.3	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	24
3.3.1	Aspectos gerais.....	24
3.3.2	Modelos sem inibição	24
3.3.3	Modelos com inibição pelo substrato	25
3.3.4	Influência da concentração de substrato	26
3.4	ADSORÇÃO	26
3.4.1	Processo de adsorção e aspectos gerais das isothermas de adsorção	26
3.4.2	Modelos de isothermas de adsorção	28
3.4.2.1	Modelo de Langmuir	28
3.4.2.2	Modelo de Freundlich.....	29
3.4.2.3	Modelo de SIPS	29
3.4.3	Perfil cinético de adsorção: aspectos gerais e modelos.....	30
3.5	REATORES DE LEITO FIXO	31
3.5.1	Reatores PBR utilizados na produção de FOS	32
3.6	DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)	34
3.7	TRANSFERÊNCIA DE MASSA INTERNA E EXTERNA.....	38
3.7.1	Efeito da Transferência de massa externa (TME).....	38
3.7.2	Efeito da Transferência de massa interna (TMI)	40

4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	PRODUÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA.....	43
4.1.1	Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo.....	43
4.1.2	Fermentação submersa: meio de cultura e produção da biomassa catalítica....	43
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA BIOMASSA MICROBIANA.....	44
4.3.1	Determinação do perfil cinético de adsorção da biomassa catalítica em batelada	45
4.3.2	Obtenção das isotermas de adsorção do corante na biomassa catalítica.....	46
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO REATOR ENZIMÁTICO DE LEITO FIXO (PBR).....	47
4.4.1	Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental	47
4.4.2	Ensaio de adsorção in situ do corante em leito catalítico de reator PBR recheado com biomassa microbiana.....	48
4.4.3	Ensaio de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) no reator PBR	49
4.4.3.1	Tipos de Injeções	49
4.4.3.2	Determinação da altura do leito catalítico e do diâmetro das esferas de biomassa ...	49
4.4.4	Determinação das concentrações do corante azul de metileno.....	50
4.5	ENSAIOS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM REATOR PBR.....	50
4.5.1	Influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutoseilação	51
4.5.2	Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutoseilação e obtenção dos parâmetros cinéticos.....	51
4.5.3	Influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutoseilação	51
4.5.4	Ensaio de estabilidade operacional no reator.....	52
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	52
4.6.1	Determinação das atividades enzimáticas de transfrutoseilação da biomassa catalítica.....	52
4.6.2	Determinação da concentração de açúcares redutores (AR).....	53
4.6.3	Determinação da concentração de glicose (G)	53

4.6.4	Determinação da massa seca de biomassa catalítica	54
4.7	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA INTERNA E EXTERNA	54
4.7.1	Ensaio de viscosidade dinâmica	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	56
5.2	ADSORÇÃO DE CORANTE NA BIOMASSA CATALÍTICA	57
5.2.1	Perfil cinético de adsorção	57
5.2.2	Isotermas de Adsorção	58
5.2.3	Ensaio de adsorção de corante em reator PBR	61
5.3	DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR) NO REATOR PBR	64
5.3.1	Avaliação das perturbações tipos pulso e degrau em reator PBR	64
5.3.2	Diâmetro de partícula e altura do leito catalítico	65
5.4	AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM REATOR PBR	68
5.4.1	Efeitos da temperatura reacional sobre a atividade de transfrutoseilação.....	68
5.4.2	Efeitos da concentração de solução reagente na atividade de transfrutoseilação e obtenção dos parâmetros cinéticos	69
5.4.3	Efeitos da vazão volumétrica de alimentação na atividade de transfrutoseilação.....	72
5.5	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS COEFICIENTES DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA E INTERNA.....	74
5.5.1	Coefficiente de transferência de massa externa	74
5.5.2	Coefficiente de transferência de massa interna.....	77
5.6	ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	78
6	CONCLUSÕES	81
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são edulcorantes cujo consumo é altamente benéfico à saúde humana já que apresentam baixo nível calórico, são prebióticos, não são cariogênicos, ajudam na redução do colesterol total e podem ser consumidos, seguramente, por diabéticos (CUNHA et al., 2019; MAIORANO et al., 2008; NOBRE et al., 2018). Estes benefícios, somados à crescente demanda por uma alimentação mais saudável, têm incentivado o consumo de FOS pelo mercado de alimentos prebióticos (CASTRO et al., 2017; ZAMBELLI et al., 2016). Em 1990, o Japão - maior mercado consumidor de FOS – comercializou mais de 400 toneladas do açúcar. Em 2017, a Europa passou a ser o maior mercado comercial de FOS, sendo este avaliado em US\$ 344 milhões, com estimativa de crescimento de 13,1 % entre os anos de 2018 a 2022 (MORDOR INTELLIGENCE, 2017; YUN, 1996). No entanto, o crescimento desta demanda por este açúcar pode ser desfavorecido pelo atual modelo de produção em biorreatores batelada, condicionados à lenta cinética de reação, baixa atividade enzimática e rápida inativação dos biocatalisadores, características estas que tornam o processo lento e oneroso. Diante disso, torna-se necessário a implementação de sistemas de reação contínuos que aumentem o volume de produção de FOS e diminuam seus custos de produção. A produção contínua de FOS torna-se vantajosa em relação à produção em batelada uma vez que minimiza a formação de subprodutos que, na maioria das vezes, atuam como inibidores enzimáticos (JUNG et al., 2011).

Os FOS estão naturalmente presentes em diversas espécies vegetais; porém, devido a sua quantidade limitada e das condições sazonais, a produção industrial destes açúcares torna-se técnica e economicamente inviável (YUN, 1996). Logo, a sua produção em larga escala pode ser realizada mediante reação de transfrutossilacção das moléculas de sacarose, catalisada por enzimas de origem microbiana como a frutossiltransferase (FTase; EC 2.4.1.9), sintetizada especialmente pelos fungos *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus aculeatus* (AGUIAR-OLIVEIRA; MAUGERI, 2010; CHEN; LIU, 1996; CUNHA, 2017; GHAZI et al., 2005; L'HOCINE et al., 2000; NOBRE et al., 2018). Estes biocatalisadores têm sido amplamente estudados em biorreatores bateladas, mediante testes de atividade enzimática de FTases microbianas livres (solúveis), imobilizadas ou na forma de célula íntegra (biomassa catalítica, isto é, complexo enzima-microrganismo), em função de diferentes condições reacionais como temperatura, pH e concentração de substrato (CASTRO et al., 2017; CUNHA et al., 2019; PERNA et al., 2018).

As células íntegras têm se destacado na produção dos FOS por exibirem alta atividade de transfrutossilação e por apresentarem sítios ativos (enzimas) e suporte natural (microrganismo) para própria enzima, o qual evita a etapa de extração do biocatalisador ao final do processo e o uso de suportes externos. Estudos reportados na literatura têm destacado o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 como fonte potencialmente produtora de biomassa catalítica contendo FTase com elevada atividade de transfrutossilação (CUNHA et al., 2019; CUERVO et al., 2007; OTTONI et al., 2012; PERNA et al., 2018).

Portanto, células íntegras, especificamente deste microrganismo, podem ser utilizadas para a implementação de um sistema de produção contínuo de FOS, principalmente em biorreatores de leito fixo (PBR), os quais proporcionam maior contato efetivo entre o substrato e o biocatalisador, assim como um sistema de escoamento mais facilmente controlável, em comparação a biorreatores de leito fluidizado (FBR) (FOGLER, 2012). Embora a produção contínua de FOS possa ser conduzida por um reator FBR, o uso do PBR torna-se preferível, visto que, mesmo havendo a possibilidade de formação de caminhos preferenciais, entupimento e compactação do leito catalítico, um FBR pode proporcionar elevadas tensões de cisalhamento na enzima, diminuindo sua estabilidade operacional – fator este essencial à produção em larga escala (LORENZONI et al., 2015). Entretanto, o biorreator PBR deve ser projetado e operado de modo a diminuir as limitações de transferência de massa e a presença de caminhos preferenciais ou volumes mortos, para assim maximizar a produção dos FOS. Estes fenômenos, associados ao perfil de escoamento e às características do leito catalítico, afetam a conversão do substrato, produzindo desvios consideráveis da conversão e rendimento esperados no processo (FOGLER, 2012). Ao reduzir as limitações difusionais no leito catalítico, garante-se que o acesso das moléculas de sacarose até as FTases miceliais, presente na biomassa microbiana, seja rápido e eficiente, maximizando a atividade enzimática de transfrutossilação. Também, ao eliminar caminhos preferenciais ou volumes mortos, evitam-se desperdícios do volume útil do PBR causados pelo escoamento não ideal, no qual os volumes de fluido alimentados permaneçam durante diferentes tempos de residência no biorreator (DORAN, 1995; FOGLER, 2012).

Poucos são os estudos reportados na literatura voltados à produção contínua dos FOS utilizando reatores de leito fixo, sendo que os mesmos utilizam vazões volumétricas consideravelmente baixas, da ordem de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, resultando em tempos de residência comparáveis aos processos em batelada, possivelmente devido à baixa atividade dos biocatalisadores utilizados e a reatores recheados somente com enzimas imobilizadas. Embora

a imobilização de enzimas tenha suas vantagens, esta etapa pode elevar os custos do processo de produção de FOS e limitar a transferência de massa (HOMAEI et al., 2013).

Diante disso, tendo como principal justificativa a necessidade em se desenvolver a produção contínua destes açúcares visando atender à crescente demanda comercial, este trabalho propôs implementar um sistema de reação contínuo em reator PBR, empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301, visando obter elevada atividade de transfrutossilção para a produção de FOS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi implementar um sistema reacional contínuo em reator de leito fixo (PBR) empacotado com biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando obter elevada atividade de transfrutossilagem para a produção de FOS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para se alcançar o objetivo geral, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- a) Produzir a biomassa catalítica (biocatalisador), rica em FTase, por fermentação submersa, utilizando meio de cultura sintético;
- b) Caracterizar a biomassa catalítica (biocatalisador) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de área superficial específica (BET);
- c) Obter o perfil cinético e as isotermas de adsorção do azul de metileno na biomassa catalítica para estudos e caracterização da distribuição do tempo de residência (DTR);
- d) Determinar, por meio de estudos de DTR, a influência do diâmetro de partícula do biocatalisador e da altura do leito catalítico no tempo médio de residência e no desenvolvimento de caminhos preferenciais e/ou volumes mortos no reator PBR;
- e) Avaliar a influência dos parâmetros operacionais (i) concentração do substrato (sacarose), (ii) temperatura reacional e (iii) vazão volumétrica de alimentação nas atividades de transfrutossilagem para o processo contínuo;
- f) Obter os parâmetros cinéticos da enzima por meio de ajustes de dados experimentais aos modelos cinéticos enzimáticos reportados na literatura;
- g) Obter os parâmetros de transferência de massa interna e externa do sistema reacional contínuo;
- h) Avaliar a estabilidade operacional do sistema reacional contínuo, com e sem reciclo, por meio do monitoramento da atividade de transfrutossilagem;

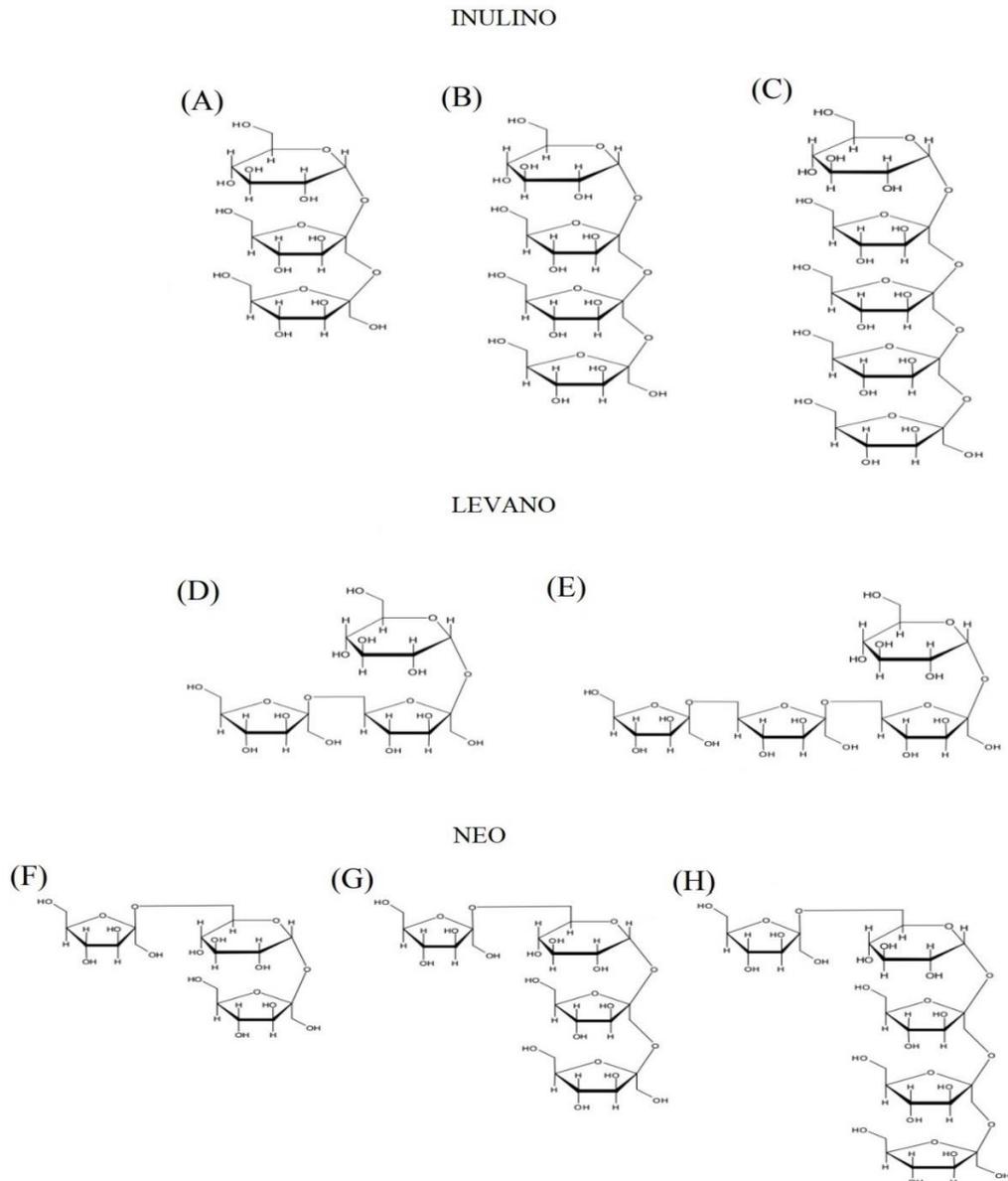
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

O grupo dos frutanos representa os polímeros de frutose, que são formados por uma unidade de glicose (G) ligada a múltiplas unidades de frutose (F) (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001). Para alguns autores, oligossacarídeos são carboidratos de cadeia curta com 2 a 10 monossacarídeos conectados por ligações glicosídicas; porém, para outros, possuem até 20 monossacarídeos (EGGLESTON; CÔTE, 2003). Dessa forma, o grupo dos frutanos inclui tanto oligômeros quanto polímeros de frutose com mais de 10000 resíduos (KORIR; LARIVE, 2007).

Os frutanos, com base nos isômeros gerados pelas ligações glicosídicas entre as moléculas de frutose, são divididos em três grupos, representados pela Figura 1. Nesta figura, o primeiro grupo, classificado como inulinos, compõe-se de estruturas moleculares lineares e não redutoras com ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1). O grupo dos levanos também é composto por estruturas moleculares lineares, entretanto as ligações entre as moléculas de frutose são do tipo β -(2 \rightarrow 6). Por fim, no terceiro grupo, denominado neos, as moléculas de frutose conectam-se aos carbonos 1 e 6 da molécula de glicose por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1) e β -(2 \rightarrow 6), resultando em longas cadeias lineares e não redutoras com resíduo D-glicose em seu interior (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; EGGLESTON; CÔTE, 2003).

Figura 1 - Os grupos dos frutanos e estruturas químicas dos seus principais compostos



Fonte: Adaptado de Cunha (2017).

Legenda: (A) 1-kestose.

(B) 1-nistose.

(C) 1-frutofuranosilnistose.

(D) 6-kestose.

(E) 6,6-nistose.

(F) Neokestose.

(G) Neonistose.

(H) Neofrutofuranosilnistose.

Yun (1996) afirma que o termo frutooligossacarídeo é utilizado por alguns trabalhos para se referir somente ao grupo dos inulinos (FIGURA 1) de estrutura genérica GF_n ($n = 2 \sim 10$); excluindo desta definição, portanto, os frutanos pertencentes aos grupos dos levanos e neos. Para exemplificar, segue a definição de FOS de alguns trabalhos da literatura:

- I. FOS são uma mistura de 1-kestose (GF₂), 1-nystose (GF₃) e 1^F-β-frutofuranosilnístose (GF₄) (HIDAKA et al., 1986).
- II. Os FOS, que possuem de 1 ~ 4 unidades de frutose conectadas à sacarose pela ligação β-(2→1), são formados principalmente por 1-kestose (GF₂), 1-nystose (GF₃) e 1-frutofuranosilnístose (GF₄) (YUN et al., 1990).
- III. Os FOS possuem de 1 a 3 unidades de frutose conectadas pela ligação β-(2→1) à sacarose e constituem-se, principalmente, por 1-kestose (GF₂), 1-nystose (GF₃) e 1-frutofuranosilnístose (GF₄) (CHEN; LIU, 1996).
- IV. FOS são oligômeros de frutose de estrutura genérica GF_n (n = 2 ~ 4) compostos principalmente de 1-kestose (GF₂), 1-nystose (GF₃) e 1-frutofuranosilnístose (GF₄) com ligações β-(2→1) entre as unidades de frutose e sacarose (L'HOCINE, 2000).
- V. FOS são cadeias curtas de oligômeros de monossacarídeos contendo 1-kestose (GF₂), 1-nystose (GF₃) e 1-β-frutofuranosilnístose (GF₄) com ligações β-(2→1) entre as unidades de frutose e sacarose (GANAIE et al., 2014).

O grupo dos inulinos divide-se, ainda, em dois grupos: a inulina e seus subconjuntos (oligofrutose e FOS). Todos esses componentes são quimicamente similares, diferindo-se apenas quanto ao grau de polimerização, já que as unidades de frutose das inulinas variam entre 2 a 70 e, de seus subconjuntos, no máximo entre 2 a 10 unidades. Os termos oligofrutose e FOS são sinônimos, sendo que o primeiro é comumente usado para se referir às inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise enzimática parcial da inulina da chicória e; o segundo, para descrever a mistura de frutanos de cadeia curta sintetizados a partir da sacarose (CARABIM; FLAMM, 1999).

Devido a sua configuração β, os FOS resistem à hidrólise das α-glicosidades, maltases, isomaltases e sacarase (enzimas presentes no sistema digestivo humano), não sendo digeridos no trato gastrointestinal superior (CARABIM; FLAMM, 1999). Dessa forma, ao atingir o intestino grosso, servem como substrato para o crescimento seletivo das bifidobactérias presentes no cólon, inibindo, assim, o crescimento de microrganismos patogênicos. Tais características os classificam como alimentos prebióticos (CUERVO-FERNANDEZ, 2004; SAAD, 2006).

De acordo com Figueroa-González (2019) e Fortes e Muniz (2009), prebióticos são suplementos alimentares não digeríveis que fornecem carboidratos seletivamente fermentáveis pelas bactérias presentes no cólon, melhorando a saúde e o bem-estar do hospedeiro. Para um

alimento ser considerado prebiótico, alguns critérios devem ser satisfeitos: ter resistência à acidez gástrica, à absorção gastrointestinal e à hidrólise por enzimas de mamíferos, além de estimular o crescimento seletivo de bactérias benéficas à saúde humana (ROBERFRIOD, 2007).

Além do efeito prebiótico dos FOS, a diminuição do colesterol, dos fosfolipídios e dos triglicérides, o alívio da constipação, a absorção de íons de cálcio, magnésio e ferro e a não cariogenicidade também são exemplos de efeitos fisiológicos provocados na saúde humana devido a sua ingestão (GANAIÉ; GUPTA; KANGO, 2013). Segundo Cummings e Macfarlane (2002), os frutanos e os galactanos são os principais prebióticos analisados em humanos e, consoante Eggleston e Côte (2003), os FOS são os prebióticos mais conhecidos.

Para Carabim e Flamm (1999), os FOS, depois dos amidos, são os carboidratos não estruturais mais abundantes na natureza. Eles estão naturalmente presentes em plantas, frutas e em outros alimentos como cebola, aspargo, chicória, alcachofra de Jerusalém, beterraba, trigo e centeio. Entretanto, sinteticamente, microrganismos também podem produzi-los pela síntese enzimática da sacarose – principalmente por fungos, sendo as espécies *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.* e *Fusarium sp.* as mais utilizadas, por possuírem elevada atividade enzimática (ANTŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; CHEN; LIU, 1996; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; MUTANDA et al., 2014; YUN et al., 1990).

Os FOS são higroscópicos e possuem elevada estabilidade térmica. Além disso, a doçura dos FOS é cerca de 40 % a 60% à da sacarose e sua viscosidade é maior quando são comparadas à mesma concentração. Essas propriedades os tornam um potencial adoçante alternativo para o mercado alimentício (ANTŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; GANAE et al., 2014; ZENG et al., 2016). Para atender a demanda do mercado, usar plantas visando a produção de FOS em larga escala não é viável, pois a maioria somente contém traços desses frutanos, além de dependerem de condições sazonais. Por isso, emprega-se a via sintética, fazendo uso de fungos com elevada atividade enzimática (CHEN; LIU, 1996; ZAMBELLI et al., 2016; YUN, 1996). Segundo Zambelli et al. (2016), as reações em batelada por enzimas solúveis e em reatores de leito fixo (PBR) por enzimas imobilizadas são as formas frequentemente utilizadas para a produção em escala industrial.

A empresa japonesa Meija Seika Kaisha Limited foi a primeira que, em 1984, obteve sucesso na produção comercial de FOS e, desde então, os comercializam sob os nomes comerciais de Neosugar®, Meioligo®, Profeed® e Nutraflora®. Posteriormente, outros países como França (Actlight®), EUA (Nutraflora®), Bélgica (Raftlose®), Brasil (F.O.S®) e Coréia começaram a produzir e comercializar os FOS. No Brasil, os FOS são comercializados pela

Nutramed Produtos Funcionais Ltda (FORTES; MUNIZ, 2009; GANAIE et al., 2014; HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOUTS, 1997; YUN, 1996).

Mutanda et al. (2014), reporta que os FOS são produzidos por dois mecanismos enzimáticos distintos: a transfrutossilacção e a hidrólise da inulina. Sabe-se que diversas enzimas agem simultaneamente em algumas plantas e microrganismos, ao mesmo tempo em que, em alguns microrganismos, há acção de apenas uma enzima. Portanto, o mecanismo de reacção depende da fonte enzimática; mas, independentemente do mecanismo de formação, a produção de FOS gera, como subprodutos, glicose e frutose (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; MICHEL et al., 2016).

3.2 ENZIMAS FRUTOSILTRANSFERASE E β -FRUTOFURANOSIDADE

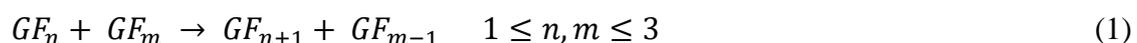
A síntese de FOS, pelo mecanismo da hidrólise, é realizada, principalmente, pela endoinulinase (EC 3.2.1.7), que, basicamente, hidrolisa a inulina, formando FOS de diversos graus de polimerização (GANAIE et al., 2014; SINGH; SINGH; KENNEDY, 2016). Pelo mecanismo da transfrutossilacção, as enzimas frequentemente utilizadas são a frutossiltransferase (FTase; EC 2.4.1.9) e a β -frutofuranosidase (FFase; EC 3.2.1.26), com elevada atividade de transfrutossilacção (CUERVO-FERNANDEZ, 2007; GANAIE et al., 2014; MAIORANO et al., 2008). As duas enzimas apresentam tanto atividade de transfrutossilacção (A_t) quanto hidrolítica (A_h). Contudo, em alguns trabalhos, a atividade de transfrutossilacção da FFase foi significativa apenas em elevadas concentrações de sacarose, enquanto a FTase apresentou valores significativos de transfrutossilacção mesmo em soluções diluídas. Isso ocorre, segundo Antošová e Polakovič (2001) e Huang et al. (2016), porque a FTase possui pouca afinidade com a água como acceptor, resultando em baixa atividade hidrolítica (GANAIE et al., 2014; GHAZI et al., 2006). Na literatura, há divergência da nomenclatura dessas enzimas uma vez que, em algumas pesquisas, a FFase, também conhecida como invertase, é usada para se referir a FTase. Yun (1996) relata que isso provavelmente ocorre porque há atividade de transfrutossilacção pela invertase quando a reacção é conduzida sob alta concentração de sacarose. Entretanto, L'Hocine et al. (2000), após a separação e purificação das duas enzimas produzidas por *Aspergillus niger*, definiu que a nomenclatura da enzima que realiza atividade de transfrutossilacção é FTase, pois a FTase conduziu a reacção exclusivamente por transferência dos grupos frutossil, enquanto a FFase não apresentou qualquer atividade de transferência.

Para Antořová e Polakovič (2001), a atividade enzimática predominante da FFase é a hidrolítica, mas, dependendo de sua fonte, pode conter atividade de transfrutossilacão e, por isso, conclui que os resultados das pesquisas variam de um microrganismo para outro, dificultando uma conclusão precisa a respeito da enzima responsável pela sintetização dos FOS.

O gênero *Aspergillus* tem sido citado como fonte potencialmente produtora de enzimas, sendo os microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* frequentemente empregados para tal finalidade (MAIORANO et al., 2008). O trabalho de Cuervo-Fernandez (2007), por exemplo, mostrou que o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 é um potencial produtor de enzimas FTase miceliais, visto que sua razão A_t foi inferior apenas ao do *Aspergillus niger* ATCC 20611, quando comparada com outras 16 cepas de fungos de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullullans*.

3.2.1 Atividade de transfrutossilacão (A_t)

O mecanismo de transfrutossilacão, conforme visto no Tópico 3.2, depende da fonte enzimática. Entretanto, o mecanismo aceito consiste em uma reação de desproporção; a qual, após romper as ligações $\beta(2 \rightarrow 1)$ da molécula de sacarose, transfere o grupo frutossil para uma molécula aceptora, que pode ser tanto a sacarose quanto o FOS. Dessa forma, a reação (representada pela Equação 1) produz moléculas de FOS com até 4 unidades de frutose e, como subproduto, glicose (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; GANAIE et al., 2014; MAIORANO et al., 2008; YUN, 1996).



sendo n e m o número de unidades frutossil ligados à unidade glicosil que, ao assumirem valor um, representam a molécula de sacarose nos reagentes e, nos produtos, a molécula de 1-kestose juntamente com a glicose. Ao assumirem os demais valores, representam as moléculas de 1-nistose e 1-frutofuranosilnistose, cujas fórmulas estruturais foram dispostas na Figura 1.

A definição da A_t diverge de um autor para outro e, tais definições, estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1 - Definição da atividade de transfrutossilacão por diferentes autores

Autores	Definição
(CHEN; LIU, 1996), (DORTA et al., 2006), (HAYASHI et al., 1990), (KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996), e (VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).	Quantidade de enzima que transfere 1 μmol de frutose por minuto
(PARK; OH; YUN, 2001) e (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005)	Quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto
(L'HOCINE et al. 2000) e (VANDÁKOVÁ et al., 2004).	Quantidade de enzima que produz 1 μmol de 1-kestose por minuto
(OTTONI et al., 2012).	Quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol da mistura de FOS por minuto, sendo esta composta por 1-kestose, 1- nistose e 1-frutofuranosilnístose

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Neste trabalho, por questões técnicas de mensuração, adotou-se a definição de Dorta et al. (2006). Dessa forma, por meio de um balanço de massa, a concentração de frutose transfrutossilada pode ser obtida, indiretamente, pelas Equações (2), (3) e (4).

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

$$[F] = [AR] - [G] \quad (3)$$

$$[Ft] = [G] - [F] = 2[G] - [AR] \quad (4)$$

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

A atividade de transfrutossilacão (A_t) da FTase micelial pode ser calculada pela Equação (5).

$$A_t = \frac{[Ft].v}{m_s} \quad (5)$$

sendo v a vazão volumétrica (L.s^{-1}) e m_s a massa de biomassa seca (g).

3.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

3.3.1 Aspectos gerais

Quando se tem o objetivo de projetar biorreatores e obter produtos com características desejáveis, é de suma importância conhecer a cinética enzimática das reações biotecnológicas. A cinética enzimática de bioprocessos, a partir de modelos cinéticos – geralmente não lineares, descreve como a velocidade específica de reação de crescimento celular é influenciada pelas variações de concentração e temperatura do substrato. Dois grupos de modelos cinéticos são citados na literatura: os que consideram a inibição enzimática e os que não a consideram. (JUNIOR; CRUZ, 2012; KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009).

3.3.2 Modelos sem inibição

De acordo com Oliveira (2007), a cinética de diversas enzimas pode ser descrita pelo modelo de Michaelis-Menten. Tal modelo considera a etapa de formação de produtos como irreversível, consideração que é cabível na etapa inicial da reação, quando há pouco ou nenhum produto formado. Além disso, também se assume que a velocidade de formação e dissociação do complexo enzima-substrato ([ES]) são equivalentes, de forma que o processo enzimático seja tratado como estado estacionário (CHAPLIN; BUCKE, 1990). Dessa forma, sob as considerações citadas anteriormente, o modelo de Michaelis-Menten caracteriza a velocidade da reação enzimática (V_{el}) (medida a partir da adição do substrato) como função da concentração de substrato (C_A) e está representado pela Equação (6) (CHOI; REMPALA; KIM, 2017).

$$V_{el} = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot C_A}{K_m + C_A} \quad (6)$$

sendo C_A a concentração de substrato ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), $V_{m\acute{a}x}$ a velocidade máxima de reação ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$), que é dependente da temperatura e ocorre quando a enzima está saturada de substrato e o parâmetro K_m ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), denominado constante de Michaelis-Menten, a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima (CHOI; REMPALA; KIM, 2017).

Existem enzimas cuja cinética enzimática, por apresentar uma resposta sigmoideal, não se ajusta ao modelo de Michaelis-Menten, sendo necessário realizar ajustes a este modelo a fim

de superar tais desvios. Na literatura, o modelo de Hill é comumente utilizado para superar tais desvios, uma vez que este modelo considera a presença de cooperatividade entre a enzima e o substrato. As enzimas, que exibem comportamento mencionado, são frequentemente denominadas de alostéricas, embora tais termos não sejam sinônimos (CHOI; REMPALA; KIM, 2017; WEISS, 1997). O modelo de Hill está descrito pela Equação (7).

$$V_{el} = \frac{V_{m\acute{a}x}C_A^n}{C_A^n + (K_{0,5})^n} \quad (7)$$

sendo $K_{0,5}$ (g.L^{-1}) a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima. Quanto menor seu valor, maior a afinidade entre o substrato e o sítio ativo da enzima e n o coeficiente de Hill.

A interpretação fenomenológica do parâmetro n (EQUAÇÃO 7) diz respeito à cooperatividade existente entre a ligação da enzima com o substrato. Se a cooperatividade é positiva ($n > 1$), o modelo sugere que, por a enzima possuir dois ou mais sítios ativos, a ligação de um substrato favorece a ligação de outro substrato; em outras palavras, quando há cooperação positiva, a velocidade de reação varia significativamente para pequenas variações de concentração de substrato. Por outro lado, a cooperatividade negativa ($n < 1$) torna a velocidade enzimática pouco sensível à variação da concentração de substrato. Quando n assume o valor de um, o modelo de Hill se resume ao modelo de Michaelis-Menten. Dessa forma, conclui-se que o modelo de Michaelis-Menten é um caso particular do modelo de Hill (CHOI; REMPALA; KIM, 2017; WEISS, 1997).

3.3.3 Modelos com inibição pelo substrato

As concentrações de substrato, de produto ou de células presentes no meio reacional agem, dependendo de suas concentrações, como inibidores e, conseqüentemente, diminuem a velocidade da reação enzimática, quando esta é comparada aos modelos sem inibição. Dessa forma, os modelos matemáticos com inibição descrevem como a velocidade de reação é influenciada pelas concentrações de substrato, produto e células (JUNIOR; CRUZ, 2012).

O modelo cinético de Andrews, segundo Junior e Cruz (2012), é o modelo que melhor descreve a inibição pelo substrato, mostrado na Equação (8).

$$V_{el} = \frac{V_{m\acute{a}x}C_A}{K_S + C_A + \frac{C_A^2}{K_I}} \quad (8)$$

sendo K_S (g.L^{-1}) a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da velocidade máxima, K_I (g.L^{-1}) a constante de inibição, que representa a concentração de substrato necessária para inibir 50% da velocidade máxima. Quando não há inibição pelo substrato, K_I assume valores elevados, já que a parcela C_A^2/K_I , da Equação (8), torna-se desprezível e o modelo de Andrews se resume ao modelo de Michaelis-Menten (EQUAÇÃO 7) (KIM et al., 2005; REGINATTO et al., 2008).

3.3.4 Influência da concentração de substrato

A influência da concentração do substrato na cinética enzimática é explicada pela teoria da saturação. Segundo essa teoria, uma quantidade de enzima só pode agir sobre uma quantidade específica de substrato. Dessa forma, a atividade enzimática se eleva com o aumento da concentração de substrato, mas, ao atingir tal quantidade, qualquer acréscimo na concentração do substrato não surtirá efeito na atividade enzimática (NORTHROP, 1920).

Segundo Faria (2018), para realizar os experimentos de influência da variação da concentração de substrato na atividade enzimática, deve-se analisar essa variação mantendo as demais condições fixas.

3.4 ADSORÇÃO

3.4.1 Processo de adsorção e aspectos gerais das isotermas de adsorção

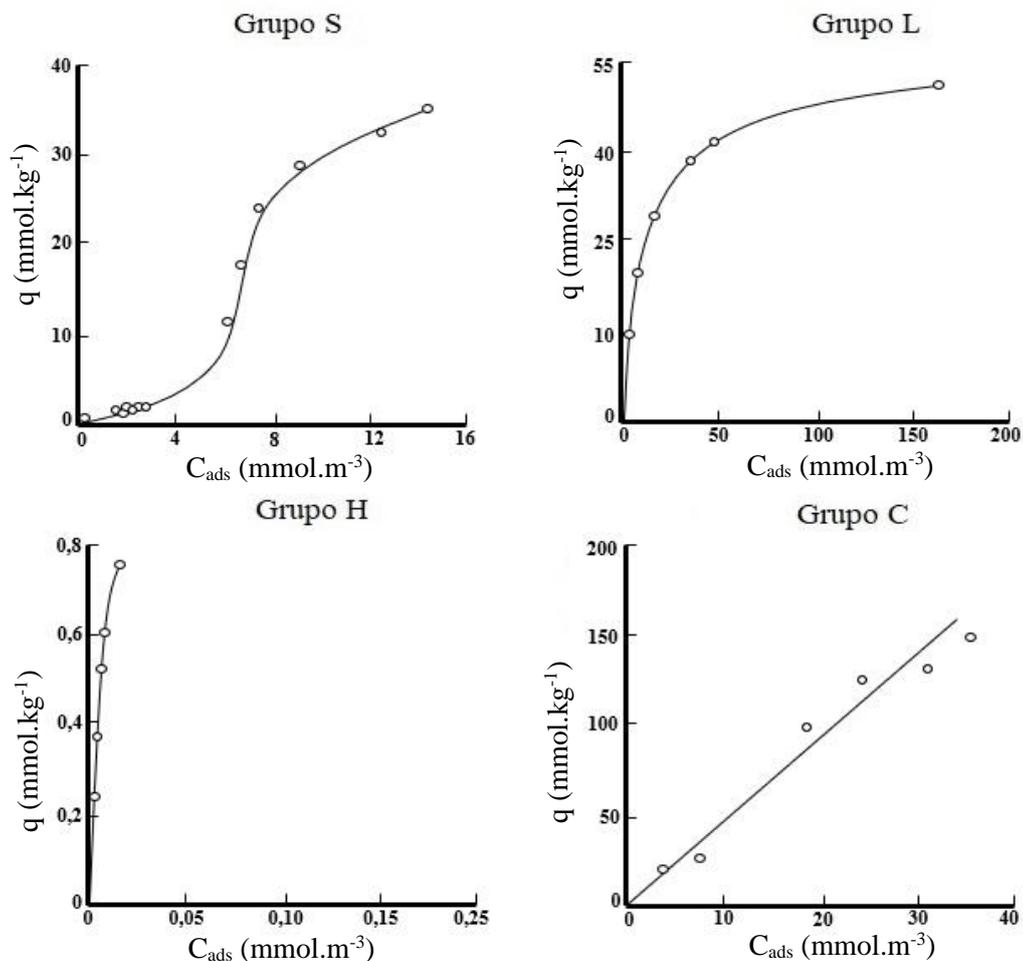
O contato entre um fluido e uma superfície sólida pode fazer com que moléculas deste fluido (adsorvato) se acumulem na superfície sólida (adsorvente). Esse fenômeno físico-químico é definido como adsorção. (BRUCH; COLE; ZAREMBA, 1997; MASEL, 1996).

O potencial químico entre o seio do fluido e o adsorvente é a força motriz para que haja a transferência de massa do adsorvato. Isso ocorre, portanto, até que o equilíbrio seja atingido e, como o adsorvato concentra-se na superfície do adsorvente, quanto maior for esta superfície, maior será a eficiência de adsorção (BRUCH; COLE; ZAREMBA, 1997; MASEL, 1996).

A relação de equilíbrio, à temperatura constante, entre a quantidade de adsorvato por massa de superfície sólida (q) e sua concentração no seio do fluido (C_e) é descrita pelas isotermas de adsorção, que são divididas em quatro grupos: S, L, H, e C, representados pela Figura 2 (SPARKS, 2013).

Na Figura 2, ao analisar o grupo S, percebe-se que a inclinação da isoterma aumenta conforme o acréscimo da concentração de adsorvato; mas, eventualmente, ela diminui até se tornar igual a zero, momento no qual passa a independe da concentração de adsorvato, pois todos os sítios do adsorvente já estão preenchidos. Este tipo de isoterma indica a afinidade entre o adsorvente e o adsorvato a baixas e elevadas concentrações. A forma L mostra que o aumento da concentração de adsorvente resulta no decréscimo da inclinação da isoterma até que esta seja igual a zero devido ao preenchimento dos sítios vagos do adsorvente. Porém, diferentemente do grupo S, esse tipo de isoterma sugere que a afinidade entre o adsorvente e o adsorvato é alta mesmo sob baixas concentrações de adsorvato. O tipo H é caracterizado por fortes interações entre o adsorvato e o adsorvente. Por fim, o tipo C indica um mecanismo de partição cujas moléculas de adsorvato são particionadas entre a fase interfacial e o seio do fluido sem qualquer tipo de interação entre o adsorvente e o adsorvato (SPARKS, 2013).

Figura 2 - Grupos S, L, H e C das isotermas de adsorção



Fonte: Adaptado de Sparks (2013).

As técnicas de Monte Carlo e de dinâmica molecular foram utilizadas com o intuito de estabelecer dados teóricos a respeito do equilíbrio de adsorção. Outra forma de se estudar um novo sistema de adsorção é por meio de métodos experimentais (MEDEIROS, 2001). Segundo Sparks (2013), os experimentos de adsorção devem ser mantidos sob vigorosa agitação e pelo tempo necessário para que o sistema atinja o estado estacionário. Conhecendo o volume e a composição da solução de adsorção assim como a quantidade de adsorvente, pode-se determinar, à temperatura constante, o equilíbrio de adsorção pela Equação (9).

$$q = \frac{(C_0 - C_f) \cdot V_s}{m}, \quad (9)$$

em que q representa a relação de equilíbrio de adsorção ($m g_{adsorvato} \cdot g_{adsorvente}^{-1}$), C_0 e C_f , respectivamente, a concentração inicial e final da solução de adsorção, expressas em $g \cdot L^{-1}$, V_s o volume de solução em L e m a massa úmida de adsorvente.

Os ajustes dos modelos teóricos de adsorção, que descrevem a relação de equilíbrio (q), permitem compreender qual o mecanismo de adsorção ocorre no sistema em estudo. Sendo assim, três principais modelos teóricos serão apresentados a seguir: Langmuir, Freundlich e Sips.

3.4.2 Modelos de isotermas de adsorção

3.4.2.1 Modelo de Langmuir

O modelo de Langmuir (EQUAÇÃO 10) é um modelo de monocamada, pois considera que sítios homogêneos, os quais compõem a superfície do adsorvente, são capazes de adsorver apenas uma molécula de adsorvato. A condição de homogeneidade confere à energia de adsorção a independência da ocupação do sítio de adsorção. Além disso, as considerações de adsorção reversível, não movimentação e interação entre as moléculas de adsorvato também estão presentes neste modelo (SPARKS, 2013).

As isotermas que seguem este modelo caracterizam sólidos microporosos com superfície externa relativamente pequena (MEDEIROS, 2001).

$$q = \frac{q_{m\acute{a}x} C_e K_L}{1 + K_L C_e}, \quad (10)$$

sendo $q_{m\acute{a}x}$ a quantidade máxima de adsorção ($mg_{adsorvato} \cdot g_{adsorvente}^{-1}$), que caracteriza a formação da monocamada, C_e a concentração de adsorvato na solução de equilíbrio ($g \cdot L^{-1}$) e K_L a constante de Langmuir em $L \cdot g^{-1}$.

A constante de Langmuir, segundo Sparks (2013), simboliza a energia de ligação entre as moléculas de adsorvato e a superfície sólida. Para Ayawei, Ebelegi e Wankasi (2017), a constante simboliza a capacidade de adsorção, sendo esta relacionada à área superficial disponível e  porosidade do adsorvente, de forma que, caso este apresente elevadas área superficial e porosidade, a capacidade de adsorção será elevada (baixos valores de K_L).

3.4.2.2 Modelo de Freundlich

O modelo empírico de Freundlich (EQUAÇÃO 11) supõe que a adsorção  multicamada e ocorre em superfície heterogênea, ou seja, a energia de adsorção varia conforme a ocupação dos sítios. Dessa forma, esse modelo é muito utilizado para representar superfícies heterogêneas, embora tenha a desvantagem de não prever a quantidade máxima de adsorção (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; SPARKS, 2013).

$$q = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (11)$$

em que K_F é a capacidade de adsorção ($mg_{adsorvato} \cdot g_{adsorvente}^{-1}$) e $1/n$ a intensidade de adsorção que, segundo Ayawei, Ebelegi e Wankasi (2017), indica a heterogeneidade dos sítios e suas distribuições relativas de energia.

3.4.2.3 Modelo de SIPS

A isoterma de SIPS pode ser derivada da combinação das isotermas de Langmuir e Freundlich ou por aproximações termodinâmicas. Seu objetivo é prever a heterogeneidade do adsorvente, ao mesmo tempo em que inclui o parâmetro de adsorção máxima - um dos fatores limitantes da isoterma de Freundlich. A Equação (12) representa este modelo (NETHAJI; SIVASAMY; MANDAL, 2012).

$$q = \frac{q_{m\acute{a}x}(K_S C_e)^n}{1 + (K_S C_e)^n} \quad (12)$$

em que K_s ($L \cdot g^{-1}$) é uma constante de afinidade e n representa a heterogeneidade da superfície. Quando n assume o valor 1, a superfície é homogênea já que a isoterma de SIPS se resume à de Langmuir. Em contrapartida, valores de n , diferentes da unidade, indicam o aumento da heterogeneidade.

Nota-se que, diferentemente dos modelos de dois parâmetros (Langmuir e Freudlich), o modelo de SIPS possui três parâmetros ajustáveis ($q_{m\acute{a}x}$, K_s e n), sendo estes dependentes da pressão, temperatura e concentração do substrato (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; SPARKS, 2013). De acordo com Tzabar e Brake (2016), o modelo de SIPS se ajusta em sistemas de adsorção monocamada.

3.4.3 Perfil cinético de adsorção: aspectos gerais e modelos

O estudo do perfil cinético de adsorção permite determinar o tempo de contato necessário entre o adsorvente e o adsorvato para que se atinja a concentração de equilíbrio. Para prever tal parâmetro, utilizam-se os modelos cinéticos de adsorção, que também proporcionam a análise do mecanismo controlador do processo de adsorção: reação química, difusão e transferência de massa (NASCIMENTO et al., 2014).

Segundo Nascimento et al. (2014), os modelos cinéticos de adsorção comumente empregados são os de pseudoprimeira ordem (PPO) e pseudossegunda ordem (PSO). O modelo cinético de pseudoprimeira ordem considera que o processo de adsorção é controlado por difusão externa e independente da concentração de adsorvato. Por outro lado, o modelo de pseudossegunda ordem avalia se a taxa de adsorção é dependente da quantidade de adsorvato na superfície do sólido e das condições de equilíbrio (SILVA et al., 2018).

Os modelos de PPO e PSO estão representados pelas Equações (13) e (14), respectivamente (SILVA et al., 2018).

$$q = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (13)$$

$$q = \frac{k_2 \cdot q_e^2 \cdot t}{1 + k_2 \cdot q_e \cdot t} \quad (14)$$

sendo que q_e representa, no equilíbrio, a quantidade de adsorvato por unidade de adsorvente ($mg_{adsorvato} \cdot g_{adsorvente}^{-1}$), t o tempo de adsorção (min) e k_1 (min^{-1}) e k_2 ($g_{adsorvente} \cdot mg_{adsorvato}^{-1} \cdot min^{-1}$) as constantes de taxa de adsorção dos modelos de pseudoprimeira ordem e pseudossegunda ordem, respectivamente.

3.5 REATORES DE LEITO FIXO

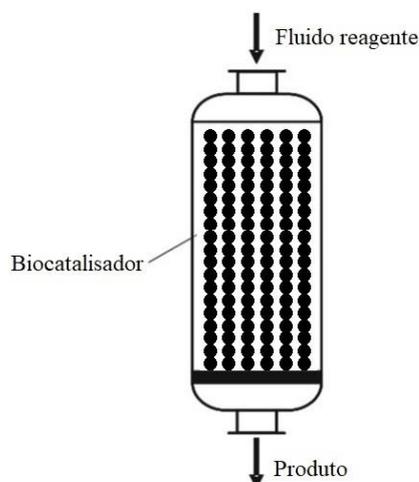
Devido a sua tecnologia simples e a facilidade de operação, o uso do PBR é preferível quando comparado a outros reatores catalíticos heterogêneos, além das demais vantagens já mencionadas. O reator de leito fixo consiste de uma pilha compacta e imóvel de biocatalisador, que se comporta como meio poroso, situada no interior de uma coluna geralmente vertical, pela qual o fluido escoar, reagindo com a superfície interna e externa do biocatalisador (JAKOBSEN, 2014).

A queda de pressão ao longo do reator, a desativação do biocatalisador e um ineficiente controle de temperatura, principalmente quando a reação é exotérmica são problemas comumente encontrados na operação de um PBR. Dessa forma, a escolha do modelo ideal de PBR é essencial para otimizar sua performance. Três modelos de PBR são mais utilizados: coluna com leito único, coluna com múltiplos leitos e coluna com múltiplos tubos (JAKOBSEN, 2014).

O PBR de leito único deve ser empregado para reações adiabáticas, não sendo recomendado para reações exotérmicas e endotérmicas; pois, o aumento da temperatura do meio nas reações exotérmicas, pode desfavorecer a conversão de equilíbrio, a seletividade do produto e a estabilidade do catalisador. Já nas reações endotérmicas, a reação pode ser interrompida antes do desejado, devido a mudança de temperatura. No caso de reações endotérmicas, recomenda-se o uso do modelo de leitos múltiplos e, para reações exotérmicas, o modelo de múltiplos tubos. O modelo de leito único está representado na Figura 3 (JAKOBSEN, 2014).

Ao observar a Figura 3, nota-se que o fluido reagente é alimentado na parte superior do reator e flui para a parte inferior, caracterizando o fluxo descendente. Entretanto, há casos em que o fluido é alimentado na parte inferior do reator e flui para a parte superior, caracterizando o fluxo ascendente (WU et al., 1996). Ao longo dos anos, muitos estudos em relação a hidrodinâmica e a transferência de massa em reator PBR de fluxo ascendente e descendente já foram realizados. Esses estudos mostraram que o PBR de fluxo ascendente possui maior queda de pressão e retenção de líquido além de um menor coeficiente de transferência de massa líquida quando comparado ao PBR de fluxo descendente, tornando, assim, o último, preferível (YANG; WILD; EUZEN, 1992).

Figura 3 - PBR de leito único



Fonte: Adaptado de Jakobsen (2014).

3.5.1 Reatores PBR utilizados na produção de FOS

A produção de FOS pode ocorrer tanto em reatores em batelada quanto em reatores contínuos, sejam de leito fixo (PBR) ou de leito fluidizado (FBR) (LORENZONI et al., 2015; ZAMBELLI et al., 2016). Entretanto, a produção de FOS em reatores contínuos é preferível; pois, segundo Jung et al. (2011), este tipo de reator reduz a inibição enzimática por não permitir o acúmulo de glicose no meio, um subproduto da reação de transfrutossilacção. Além disso, para Santana et al. (2018), o uso do reator contínuo de leito fixo (PBR) proporciona outras vantagens em relação à batelada: facilidade de separação entre o biocatalisador e o substrato, possibilidade de operar em longos períodos e bom controle dos parâmetros de reação. O trabalho de Zambelli et al. (2016) compara a produção contínua de FOS em PBR com a produção em batelada e mostra que, sob as mesmas condições, a produtividade de FOS no PBR foi 1,7 vezes maior que a batelada.

Assim, conforme visto, a produção contínua de FOS pode ser realizada tanto por PBR quanto por FBR, também denominados reatores catalíticos heterogêneos. Basicamente, o reator de leito fixo constitui-se por partículas imóveis no interior de uma coluna, na qual o fluido é bombeado, enquanto que o FBR se constitui por partículas em movimento devido ao escoamento do fluido pela coluna (HILL; ROOT, 2014; LORENZONI et al., 2015).

Para Hill e Root (2014), os PBR são os mais empregados na indústria por possuírem muitas vantagens quando comparado aos demais reatores catalíticos heterogêneos. Levenspiel (2011) relata uma relevante vantagem desse tipo de reator em relação ao FBR. Para ele, o escoamento no interior do PBR se aproxima do escoamento pistonado, reduzindo os desvios de

escoamento e proporcionando, conseqüentemente, maior contato entre o fluido e o catalisador. Dessa forma, maiores conversões são atingidas no PBR. Além disso, o FBR pode proporcionar elevadas tensões de cisalhamento na enzima, diminuindo sua estabilidade operacional – fator essencial para a produção em larga escala (LORENZONI et al., 2015).

O trabalho de Lorenzoni et al. (2015) comparou a produção de FOS em PBR e FBR. Seus resultados mostraram que, sob as mesmas condições operacionais, a produção de FOS no PBR foi 1,1 vezes maior que no FBR e concluiu que, pelo PBR transferir maiores quantidades de unidades de frutossil quando comparado ao FBR, este modelo é mais eficiente para a produção contínua de FOS e possui potencial para ampliação de escala.

Na literatura, há poucos trabalhos que relatam a produção contínua de FOS em PBR por meio da enzima FTase, principalmente em escala laboratorial. Além do mais, os artigos publicados utilizam somente enzimas imobilizadas, que, conquanto tenha suas vantagens, pode reduzir a atividade catalítica da enzima por meio de limitações à transferência de massa - além de ser mais uma etapa para o processo de produção de FOS, elevando seu custo (HOMAEI et al., 2013; LORENZONI et al., 2015). A Tabela 2 apresenta os artigos publicados relativos à produção contínua de FOS em PBR assim como suas características operacionais.

Tabela 2 - Artigos relacionados à produção contínua de FOS em PBR

Autor	Microrganismo	Enzima	Imobilização
Lorenzoni et al. (2015)	<i>Aspergillus aculeatus</i>	FFase	Quitosana
	<i>Cladosporium</i>		
Zambelli et al. (2016)	<i>cladosporioides MUT 5506</i>	FFase	Alginato de sódio
	<i>Aureobasidium</i>		
Vaňková et al. (2008)	<i>Aspergillus pullulans</i>	FTase	Resina DOWEX MARATHON MSA
	<i>Aureobasidium</i>		
Jung et al. (2011)	<i>pullulans KFCC 10245</i>	FTase	Alginato de cálcio
	<i>Aureobasidium</i>		
Yun et al. (1992)	<i>pullulans KFCC 10245</i>	FTase	Alginato de sódio

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Os artigos de Jung et al. (2011) e Vaňková et al. (2008) conduziram a reação pela FTase visando a produção em escala industrial com reatores de 4 m³ e 1,6 m³, respectivamente. Em escala laboratorial, somente o trabalho de Yun et al. (1992) fez o uso da FTase. Além do mais, é possível notar que todos os trabalhos foram realizados com a enzima imobilizada.

Dessa forma, em um primeiro momento, é relevante o estudo, em escala laboratorial, da produção contínua de FOS em PBR utilizando a FTase em biomassa livre para, posteriormente, avaliar sua capacidade de ampliação de escala.

3.6 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)

Na maioria das vezes, o comportamento dos reatores reais difere dos modelos de reatores ideais. Para Hill e Root (2014), há casos em que a conversão de um reator real é bem próxima da conversão prevista por um modelo de reator ideal. Contudo, em algumas situações, estas podem divergir-se significativamente. A formação de caminhos preferenciais, de regiões de estagnação do fluido e de *by-pass* são exemplos de fatores que podem diminuir a conversão do substrato em produto, principalmente em reatores de leito fixo (LEVENSPIEL, 2011; HILL; ROOT, 2014).

Posto isso, para se trabalhar com reatores reais, é fundamental diagnosticar a presença desses fatores e, se possível, mitigá-los (LEVENSPIEL, 2011). Segundo Fogler (2012), quando se tem a intenção de caracterizar e diagnosticar problemas no reator em operação, aplica-se a medida da DTR.

Os modelos idealizados de reatores consideram que todas as moléculas do material que saem do reator possuem o mesmo tempo de residência, ou seja, permaneceram o mesmo tempo no interior do reator. Entretanto, devido aos desvios citados anteriormente, é evidente que moléculas de fluido não seguem esse comportamento, apresentando diferentes tempos de residência. A medida da DTR é justamente a forma de quantificar essa distribuição de tempos de residência (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2011).

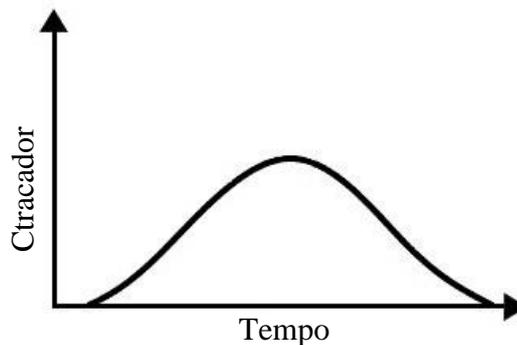
As curvas da DTR podem ser construídas pela técnica de estímulo e resposta, injetando, no interior do reator, um traçador e medindo sua concentração de saída em função do tempo. Para isso, os traçadores coloridos são os comumente escolhidos e, além disso, devem conter algumas propriedades imprescindíveis: similaridade física ao reagente, solubilidade completa na mistura, fácil detecção, não-reagente e não devem adsorver na parede do reator. A técnica de

estímulo e resposta utiliza, principalmente, a injeção do tipo pulso e do tipo degrau positivo (BORGES et al., 2009; FOGLER, 2012).

Independentemente do tipo de injeção, a medida de DTR visa obter o perfil da função de distribuição de tempo de residência, $E(t)$; que descreve, quantitativamente, o tempo no qual diferentes moléculas permaneceram no reator (FOGLER, 2012). A equação da função $E(t)$ para as injeções do tipo pulso e degrau será apresentada antes de aprofundarmos na sua interpretação.

A perturbação do tipo pulso é realizada, experimentalmente, por meio da injeção, na corrente de alimentação do reator e no menor tempo possível, de uma quantidade conhecida de traçador, medindo, em função do tempo, sua concentração de saída ($C_{\text{traçador}}$). Com estes dados, pode-se construir a curva de resposta ao estímulo, representada pela Figura 4 (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2011).

Figura 4 - Curva de resposta à perturbação do tipo pulso



Fonte: Adaptado de Fogler (2012).

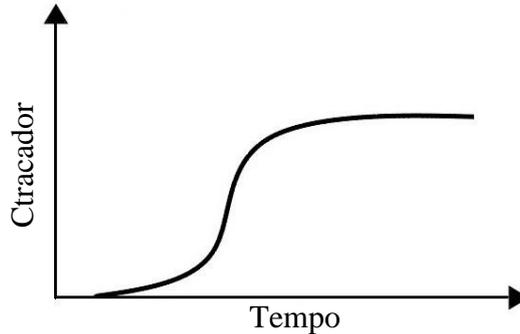
Para a perturbação do tipo pulso, os valores da função $E(t)$, para cada ponto experimental, podem ser obtidos pela Equação (15) a seguir:

$$E(t) = \frac{C_{\text{traçador}}}{\int_0^{\infty} C_{\text{traçador}} \cdot dt} \quad (15)$$

sendo que seu denominador representa a área sob a curva de resposta ao pulso (FIGURA 4) e; seu numerador, cada medição realizada no efluente do reator (FOGLER, 2012).

Diferentemente da perturbação do tipo pulso, a perturbação degrau consiste na adição constante de traçador na corrente de alimentação. A partir daí, mede-se a concentração de traçador no efluente em função do tempo até que suas concentrações, no efluente e na alimentação, sejam iguais, momento no qual o experimento pode ser interrompido. A Figura 5 apresenta o perfil de resposta a este estímulo (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2011).

Figura 5 - Curva de resposta à perturbação do tipo degrau



Fonte: Adaptado de Fogler (2012).

Os valores da função $E(t)$ para o tipo degrau podem ser calculados pela Equação (16) (FOGLER, 2012).

$$E(t) = \frac{d}{dt} \left[\frac{C_{tracador}}{C_i} \right] \quad (16)$$

em que C_i (g.L^{-1}) representa a concentração do traçador na corrente de alimentação do reator. Para o uso da Equação (16), deve-se conhecer a função que representa o perfil de resposta da Figura 5.

A injeção do tipo pulso, por exigir pequenas quantidades de traçador, é vantajosa em relação ao degrau quando o custo do traçador é elevado. Entretanto, quanto esse fato não se verifica, a aplicação da perturbação degrau é preferível por ser de fácil execução e não precisar conhecer a quantidade total de traçador empregada. Matematicamente, a injeção do tipo pulso não exige a diferenciação, diminuindo a probabilidade de erros; tornando-a, nesse aspecto, mais vantajosa. Por outro lado, o perfil de concentração do tipo pulso pode apresentar longas caudas, sujeitando-o, também, a grandes imprecisões (FOGLER, 2012).

Para aprofundar a interpretação da função $E(t)$, sua forma integral será analisada. A forma integral de $E(t)$ representa a fração de traçador na saída do reator que nele permaneceu por um intervalo definido de tempo (EQUAÇÃO 17).

$$\int_0^{\infty} E(t) dt = 1 \quad (17)$$

O lado esquerdo da Equação (17), dentro dos seus limites de integração, equivale à totalidade da área sob a curva de $E(t)$ e Levenspiel (2011) a define como sendo igual à unidade; uma vez que, no intervalo de tempo entre 0 e ∞ , todo o traçador já deixou o reator. Assim, ao alterar os limites de integração, é possível quantificar a fração de traçador que deixou do reator neste intervalo de tempo.

Quando se tem o intuito de comparar a DTR sob diferentes condições de operação, é viável comparar seus momentos a suas distribuições inteiras. Três momentos da DTR bastam para sua caracterização: tempo médio de residência (t_m), variância (σ^2) e assimetria (s^3) (FOGLER, 2012).

O primeiro momento da DTR, t_m , indica a média do tempo que o traçador gastou para percorrer todo o volume do reator à uma dada vazão e pode ser determinado, para um reator real, usando a função $E(t)$. Para isso, as considerações de densidade do fluido constante e de que não há retorno de produto para o sistema se fazem necessárias. Sendo assim, o tempo médio de residência é obtido pela Equação (18) (COKER, 2001).

$$t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt \quad (18)$$

sendo t_m tempo médio de residência (min) e t o tempo (min).

Fogler (2012) mostra que o t_m é igual ao tempo espacial (τ), independentemente da idealidade ou não do reator, se não ocorrer dispersão e a vazão do sistema for constante.

O τ representa o tempo que um volume de fluido de alimentação, correspondente ao volume do reator, demora para percorrê-lo. Para determinar seu valor, faz-se o uso da Equação (19) (LEVENSPIEL, 2011; RICO, 2015).

$$\tau = \frac{V}{v} \quad (19)$$

sendo τ o tempo espacial (min), V o volume do reator (L) e v a vazão volumétrica ($L \cdot \text{min}^{-1}$).

O segundo momento da DTR (σ^2), também denominado quadrado do desvio padrão, representa a dispersão da distribuição, de forma que elevados valores indicam maiores desvios da distribuição. Esse parâmetro pode ser calculado pela Equação (20) (FOGLER, 2012).

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - t_m)^2 E(t) dt \quad (20)$$

sendo σ^2 a variância em min^2 .

O terceiro momento da DTR (s^3) indica a assimetria, em relação à média, da distribuição em ambas as direções, sendo determinada pela Equação (21) (FOGLER, 2012).

$$s^3 = \frac{1}{\sigma^2} \int_0^{\infty} (t - t_m)^3 E(t) dt \quad (21)$$

sendo s^3 a assimetria em min^{-3} .

3.7 TRANSFERÊNCIA DE MASSA INTERNA E EXTERNA

Quando uma partícula de biocatalisador está sujeito ao escoamento de um fluido reagente (reação heterogênea), há a formação de um filme estagnado em seu redor. Dessa forma, para que haja reação na superfície do biocatalisador, a molécula de substrato deve ser transportada, por convecção, do seio do fluido até o filme estagnado e, posteriormente, por difusão, do interior do filme até a superfície do biocatalisador (transferência de massa externa). Logo após, tratando-se de uma biomassa porosa, as moléculas de substrato difundem-se, através dos poros, da superfície externa do biocatalisador para seu interior, ocorrendo a reação na superfície catalítica dos poros (transferência de massa interna) (DORAN, 1995; FOGLER 2012).

Se a reação química for lenta, mesmo com a quantidade adequada de substrato, a transferência de massa será capaz de suprir a quantidade necessária para a reação. Dessa forma, a velocidade de reação será limitada pela reação. Por outro lado, se a reação química for rápida, a transferência de massa não conseguirá fornecer substrato suficiente para todos os sítios ativos, fazendo com que o processo seja limitado por ela (DORAN, 1995).

Nas reações heterogêneas, busca-se eliminar as limitações de transferência de massa e, para isso, o PBR deve ser operado com velocidades suficientemente elevadas ou com partículas de pequeno diâmetro. Entretanto, deve-se atentar que o decréscimo do diâmetro da partícula de biocatalisador aumenta a queda de pressão no reator (DORAN, 1995; FOGLER, 2012).

3.7.1 Efeito da Transferência de massa externa (TME)

A TME é modelada considerando um filme estagnado de espessura constante ao redor da partícula de biocatalisador. A presença desse filme cria um desequilíbrio de potencial químico entre o substrato contido no fluido e na superfície do biocatalisador, permitindo o seu fluxo através dele. O Fluxo de substrato através do filme estagnado, para soluções diluídas, pode ser calculado de acordo com a Equação (22) (FOGLER, 2012).

$$W_A = k_c \cdot [C_{Ab} - C_{As}] \quad (22)$$

sendo W_A o fluxo unidirecional do substrato ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), k_c o coeficiente de transferência de massa externa ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) e C_{Ab} e C_{As} , respectivamente, as concentrações de substrato no fluido e na superfície da partícula de biocatalisador, expressas em $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$.

Devido à dificuldade em se obter, experimentalmente, o valor de C_{As} , a Equação (22) é comumente utilizada para determiná-lo. Experimentalmente, pode-se, facilmente, obter o valor de C_{Ab} e de W_A ; pois, no estado estacionário, W_A se torna igual a taxa de consumo de substrato (DORAN, 1995). Por sua vez, o coeficiente de TME (k_c) pode ser calculado por meio dos números adimensionais de Sherwood (Sh), Schmidt (Sc) e Reynolds de partícula (Re_p), consoante as Equações (23), (24), (25) e (26), respectivamente (FOGLER, 2012).

$$k_c = \frac{Sh \cdot D_{AB}}{d_p} \quad (23)$$

$$Sh = 2 + 0,6 \cdot Re_p^{0,5} \cdot Sc^{\frac{1}{3}} \quad (24)$$

$$Sc = \frac{\nu}{D_{AB}} \quad (25)$$

$$Re_p = \frac{U \cdot d_p}{\nu} \quad (26)$$

sendo d_p o diâmetro da partícula de biocatalisador (m), ν a viscosidade cinemática ($m^2 \cdot s^{-1}$), U a velocidade de escoamento do fluido reagente ($m \cdot s^{-1}$) e D_{AB} o coeficiente de difusão do substrato (A) no fluido (B), expresso em $m^2 \cdot s^{-1}$.

O coeficiente de difusão (D_{AB}) pode ser obtido pela Correlação de Darken (EQUAÇÃO 27), que considera a diluição infinita do substrato no fluido (CREMASCO, 2012).

$$D_{AB} = X_A D_{0BA} + X_B D_{0AB} \quad (27)$$

sendo X_A e X_B , respectivamente, a fração molar do substrato e do solvente na solução e D_{0BA} e D_{0AB} o coeficiente de difusão em condição de diluição infinita do solvente no soluto (substrato) e do soluto no solvente, respectivamente.

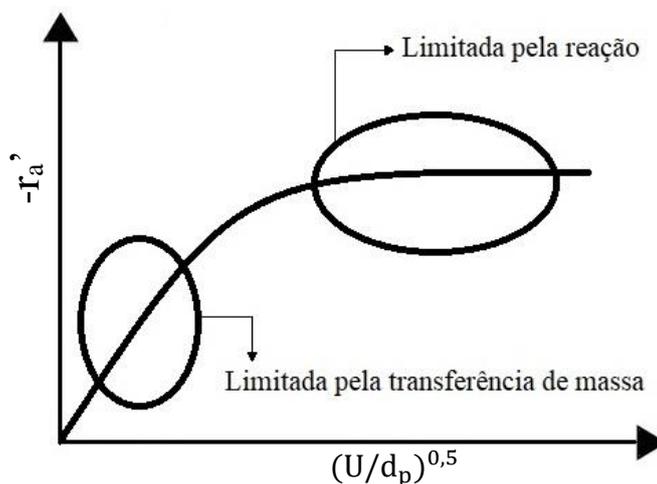
Existem algumas correlações para prever o coeficiente de difusão em condição de diluição infinita e, quando o soluto se trata de açúcares e proteínas, a mais indicada é a correlação de Geankoplis, representada pela Equação (28) (CREMASCO, 2012).

$$D_{0AB} = \frac{9,40 \cdot 10^{-11} \cdot T}{MM_A^{\frac{1}{3}} \cdot \mu_B} \quad (28)$$

sendo T a temperatura da solução (K), μ a viscosidade dinâmica da solução (cP) e MM a massa molar. Para obter o D_{0BA} , basta alterar os índices A e B da Equação (28).

A Figura 6, que relaciona a velocidade de reação ($-r'_a$) com a razão $U \cdot d_p^{-1}$, pode ser utilizada para verificar se as condições de escoamento e o diâmetro de partícula favorecem a limitação pela TME ou pela reação química.

Figura 6 - Regiões de limitação pela transferência de massa e pela própria reação



Fonte: Adaptado de Fogler (2012).

De acordo com a Figura 6, alguns fatores (diâmetro de partícula do biocatalisador e velocidade de escoamento do fluido) podem fazer com que as reações heterogêneas se tornem dependentes ou independentes da TME à partícula. Sendo assim, com o objetivo de eliminar a limitação pela TME, deve-se aumentar a velocidade de escoamento do substrato ou reduzir o diâmetro da partícula de biocatalisador. Essas duas situações favorecem a transferência de massa, tornando, como etapa limitante, a reação química (DORAN, 1995; FOLGER, 2012).

3.7.2 Efeito da Transferência de massa interna (TMI)

Toda a modelagem da TMI considerou apenas o formato esférico da partícula de biocatalisador. A limitação à TMI é avaliada pelo módulo de Thiele (ϕ_n), que representa uma medida da razão entre a velocidade de reação na superfície do biocatalisador pela velocidade de difusão do substrato através do biocatalisador (FOGLER, 2012). Dessa forma, quando ϕ_n é pequeno, a reação é limitada pela reação na superfície do biocatalisador. Por outro lado, quando ϕ_n assume valores elevados (~ 30), a reação é limitada pela TMI. (FOGLER, 2012).

O índice n do módulo de Thiele indica a ordem da reação a que ele se refere e, quando a reação segue a cinética de Michaelis-Menten, o módulo de Thiele possui a forma representada pela Equação (29) (DORAN, 1995).

$$\phi_m = \frac{R}{3\sqrt{2}} \sqrt{\frac{v_{max}}{D_{Ae}C_{As}}} \left(\frac{1}{1+\beta}\right) \left[1 + \beta \ln\left(\frac{\beta}{1+\beta}\right)\right]^{-0,5} \quad (29)$$

sendo ϕ_m o módulo de Thiele para a cinética de Michaelis-Menten, R o raio da partícula de biocatalisador (m), D_{Ae} a difusividade efetiva do substrato no biocatalisador ($m^2.s^{-1}$) e β um parâmetro adimensional que pode ser calculado pela Equação (30) (DORAN, 1995).

$$\beta = \frac{K_m}{C_{As}} \quad (30)$$

Conforme visto, a Equação (29) é dependente da difusividade efetiva do substrato na partícula de biocatalisador (D_{Ae}); que, por sua vez, depende da geometria do poro da partícula de biocatalisador (BECKER et al., 2011). Schmieder et al. (2019) estudou a influência da porosidade (\emptyset) da partícula de biocatalisador e da tortuosidade do poro na difusividade efetiva de esferas de biomassa de *Aspergillus niger* MF22.4 e, com um intervalo de confiança de 95 %, propôs um modelo de difusividade efetiva para biomassa de fungos filamentosos, expresso pela Equação (31).

$$D_{Ae} = D_{AB} \cdot \emptyset^2 \quad (31)$$

Com o intuito de avaliar a importância relativa das limitações de difusão interna e da reação, analisa-se o fator de efetividade interna (η), que representa a razão entre a velocidade observada de reação ($r_{A,obs}$) com a velocidade que a reação teria caso toda a superfície interna do biocatalisador fosse exposta às condições da superfície externa da partícula (r_{As}^*) (FOGLER, 2012). Sendo assim, se TMI não for significativa, a concentração do substrato no interior da partícula será constante e igual a concentração de substrato na superfície do biocatalisador (C_{As}), fazendo com que a $r_{A,obs}$ se aproxime da r_{As}^* e η se aproxime da unidade. Por outro lado, quando a TMI limita o processo de reação, a concentração no interior da partícula será menor que C_{As} , reduzindo a $r_{A,obs}$ e, conseqüentemente, aproximando η de zero (DORAN, 1995).

Analiticamente, não é possível obter uma expressão para o fator de efetividade interna de uma reação que siga a cinética de Michaelis-Menten (η_{im}). Entretanto, ela pode ser determinada em função dos fatores de efetividade interna para uma reação de primeira ordem (η_{i1}) e ordem zero (η_{i0}), conforme Equação (32) (DORAN, 1995).

$$\eta_{im} = \frac{\eta_{i0} + \beta\eta_{i1}}{1 + \beta} \quad (32)$$

η_{i1} e η_{i0} podem ser calculados pelas Equações (33) e (34), respectivamente (DORAN, 1995);

$$\eta_{i1} = \frac{1}{3\phi_1^2} (3\phi_1 \cdot \coth 3\phi_1 - 1) \quad (33)$$

$$\eta_{i0} = 1 \quad \text{para } 0 < \phi_0 \leq 0,577 \quad (34)$$

sendo ϕ_1 e ϕ_0 , respectivamente, o módulo de Thiele para uma reação de primeira ordem e ordem zero. Tais módulos podem ser obtidos, respectivamente, pelas Equações (35) e (36) (DORAN, 1995).

$$\phi_1 = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k_1}{D_{Ae}}} \quad (35)$$

$$\phi_0 = \frac{R}{3\sqrt{2}} \sqrt{\frac{k_0}{D_{Ae}C_{As}}} \quad (36)$$

sendo $k_0 = v_{max}$ e $k_1 = v_{max} \cdot k_m^{-1}$.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DA BIOMASSA CATALÍTICA

4.1.1 Microrganismo, condições de cultivo e preparo do inóculo

Para a produção da biomassa catalítica, contendo a enzima FTase micelial, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). Os esporos liofilizados do microrganismo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 μ L foram inoculadas em meio sólido, preparado em placa de Petri, contendo (em %, m v⁻¹): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isofar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados, por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski, em 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m v⁻¹) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % (v v⁻¹). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isolar®) 20,0 % (m v⁻¹), cujo volume foi variável, de modo a ajustar a concentração de esporos para, aproximadamente, 1×10^7 esporos mL⁻¹, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a -6 °C (CUNHA et al., 2019; CUNHA, 2017; FARIA, 2019; GARCIA, 2018).

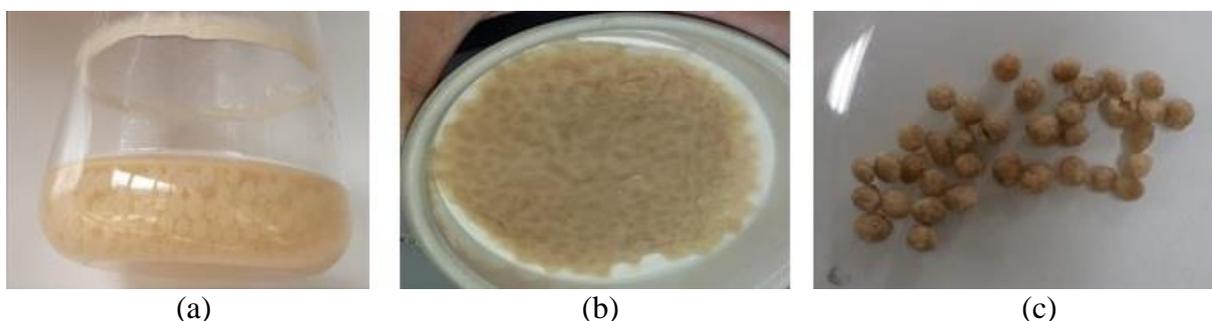
4.1.2 Fermentação submersa: meio de cultura e produção da biomassa catalítica

O meio de cultura sintético, utilizado para a fermentação e produção da biomassa catalítica, foi constituído por (em %, m v⁻¹): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, NaNO₃ (Dinâmica®) 0,5, KH₂PO₄ (Synth®) 0,2, MgSO₄.7H₂O (Dinâmica®) 0,05, MnCl₂.4H₂O (Synth®) 0,03 e FeSO₄.7H₂O (Synth®) 0,001. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH (Synth®) 0,01 mol L⁻¹. Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e, em seguida, autoclavados a 120 °C e 1 atm durante 20 minutos (CUNHA et al., 2019; CUNHA, 2017; FARIA, 2019; GARCIA, 2018; OTTONI et al., 2012).

A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo *Shaker* (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm ao longo de 64 h de processo (FIGURA 7 (a)), inoculando-se 0,5 mL de suspensão de esporos com concentração de 1×10^7 esporos mL^{-1} em meio de cultura estéril.

O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado à vácuo com o auxílio de uma bomba TE-058 (Tecnal®), utilizando papel filtro Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm (FIGURA 7 (b)). A biomassa catalítica, retida no papel, foi pesada e, para todos os ensaios realizados neste trabalho, foram preparadas, manualmente, esferas da biomassa, cujos diâmetros foram medidos com o auxílio de um paquímetro (FIGURA 7 (c)). Os ensaios foram realizados imediatamente após a confecção das esferas de biomassa.

Figura 7 – Produção da biomassa catalítica e confecção das esferas de biomassa produzida



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Biomassa após o processo de fermentação submersa.

(b) Processo de filtração à vácuo.

(c) Esferas de biomassa.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA BIOMASSA MICROBIANA

A biomassa catalítica foi caracterizada mediante as técnicas MEV, BET para determinação da morfologia da amostra e da sua área superficial, respectivamente. Para isso, primeiramente a biomassa catalítica, oriunda da fermentação, sofreu um processo de desidratação hidroalcoólica, conforme método descrito por Burleigh et al. (2014). Inicialmente, a biomassa foi imersa em 50 mL de solução aquosa de etanol 25 % ($v v^{-1}$) e mantida em repouso, sob refrigeração, por 12 horas. Em seguida, a biomassa foi removida do meio por filtração à vácuo e introduzida em uma nova solução hidroalcoólica por mais 12 horas. O procedimento repetiu-se reintroduzindo a mesma amostra em solução hidroalcoólica com aumento gradual das proporções de etanol (50 %, 75 %, 95 % e 100 %, $v v^{-1}$) até a obtenção da biomassa seca. Ao término desta etapa, a amostra foi armazenada em dessecador por mais 12 horas.

Para a análise de MEV, as amostras de biomassa seca, foram depositadas sobre segmentos de fita de cobre do tipo dupla face e aplicadas sobre suporte metálico. Anteriormente às análises de MEV, as amostras receberam recobrimento de uma fina película de liga de ouro-paládio através de processo de *sputtering*, empregando um mini *Sputter Coater* modelo POLARON EMITECH SC7620. O procedimento de *sputtering* foi realizado empregando uma tensão de aproximadamente 800 V (corrente contínua). A pressão de argônio utilizada na câmara foi ajustada para a obtenção de uma corrente de 18 mA. O procedimento de recobrimento teve duração de 2 minutos com uma velocidade de deposição nominal de 3 \AA s^{-1} . As análises de MEV foram realizadas empregando um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV-FEG), modelo FEI QUANTA 3D FEG. A aquisição de imagens foi feita com o equipamento operando no modo de detecção de elétrons secundários (“*secondary electron imaging*” - SEI) e em condição de alto vácuo. A geração de imagens deu-se mediante aplicação de uma tensão de aceleração dos elétrons igual a 20 kV e as imagens foram obtidas empregando magnitudes de ampliação com aumentos variando entre 150 e 5.000 vezes.

As análises de BET e porosidade foram realizadas pelo Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP) com metodologia adaptada por este instituto.

4.3 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE CORANTE NA BIOMASSA CATALÍTICA

Para a realização dos ensaios de distribuição do tempo de residência (DTR) no reator PBR, foi necessário, primeiramente, determinar o perfil cinético e as isotermas de adsorção das moléculas do corante azul de metileno (adsorvato) na biomassa catalítica (adsorvente). Os estudos de adsorção foram necessários devido às características morfológicas peculiares do adsorvente orgânico produzido pela fermentação.

4.3.1 Determinação do perfil cinético de adsorção da biomassa catalítica em batelada

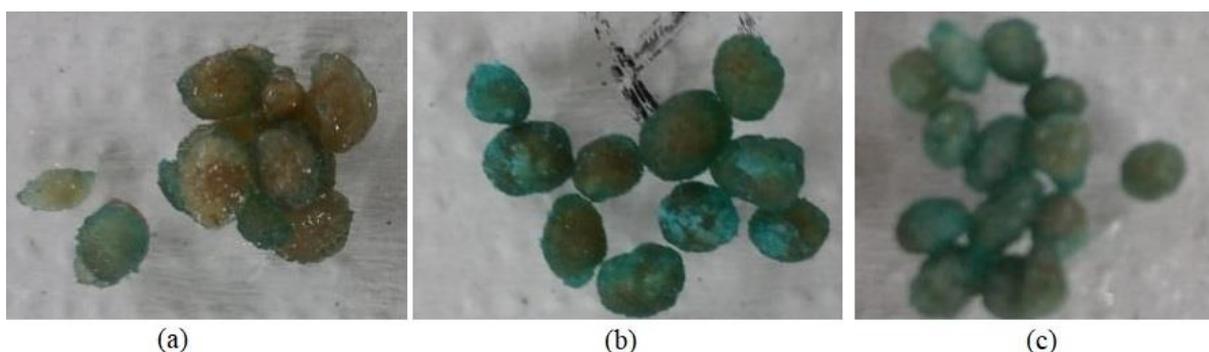
Para os ensaios de adsorção, selecionou-se o corante azul de metileno (AM) Inforlab® devido a sua disponibilidade e não degradação perante as temperaturas avaliadas no presente trabalho. Para isso, adicionou-se 0,13 g de esferas de biomassa microbiana úmida, oriunda da fermentação, em tubo do tipo Falcon®, seguido da adição de 1,5 mL de solução constituída por

sacarose comercial 473 g L⁻¹ (União®) e corante 5 mg L⁻¹. As condições adotadas foram obtidas após uma série de estudos preliminares.

Os ensaios foram conduzidos, em triplicata, em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) com velocidade de agitação constante de 210 rpm e temperatura controlada de 40 °C, 50 °C e 60 °C. Em intervalos de tempo predefinidos ($0 \text{ min} \leq t \leq 240 \text{ min}$, com $\Delta = 60 \text{ min}$), alíquotas do sobrenadante foram coletadas e monitoradas até se atingirem valores constantes de concentração do corante no sobrenadante e as concentrações do corante adsorvido na biomassa foram calculadas pela Equação (9) e, aos perfis obtidos, ajustaram-se os modelos representados pelas Equações (13) e (14).

As esferas da biomassa microbiana, após o processo de adsorção realizado para as diferentes temperaturas, estão ilustradas na Figura 8.

Figura 8 - Esferas de biomassa catalítica de *Aspergillus oryzae* IPT-301 após a adsorção de AM, por processo batelada, para diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) 40 °C.

(b) 50 °C.

(c) 60 °C.

4.3.2 Obtenção das isotermas de adsorção do corante na biomassa catalítica

Para a determinação das isotermas de adsorção, foram preparadas, em tubos de ensaio, soluções de sacarose comercial 473 g L⁻¹ (União®) constituídas por diferentes concentrações de corante AM (5,0 mg L⁻¹, 50,0 mg L⁻¹, 0,2 g L⁻¹, 0,5 g L⁻¹, 1,0 g L⁻¹, 1,5 g L⁻¹, 2,0 g L⁻¹ e 3,0 g L⁻¹). Os tubos, contendo 1,5 mL da solução, foram inicialmente mantidos incubados em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C até atingir o equilíbrio térmico. Os ensaios de adsorção iniciaram-se com a adição de 0,13 g de esferas de biomassa úmida, sob agitação constante de 210 rpm, até se obter um intervalo de tempo necessário para se alcançar a condição de equilíbrio (120 min). A concentração de corante AM

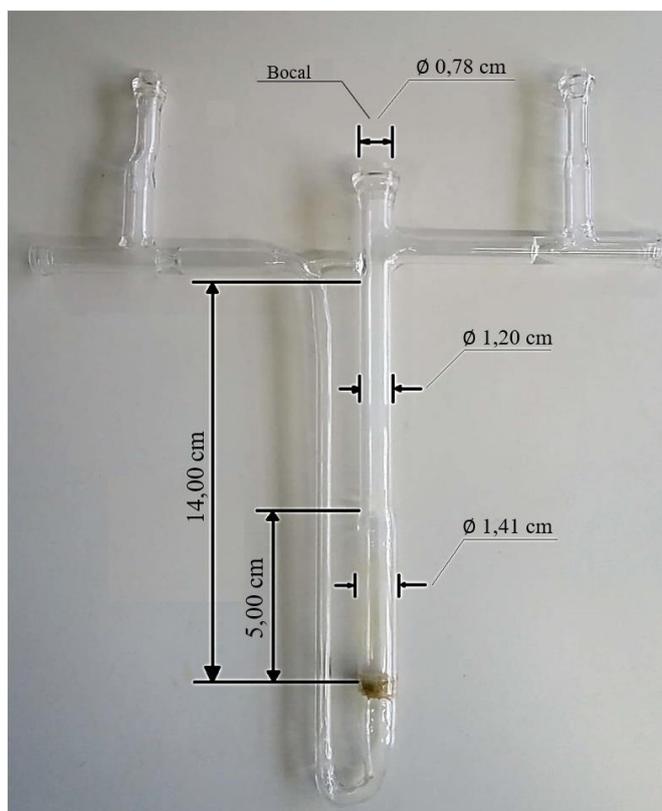
adsorvido na biomassa foi calculada pela Equação (9) e, aos perfis obtidos, ajustaram-se os modelos descritos pelas Equações (10), (11) e (12).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO REATOR ENZIMÁTICO DE LEITO FIXO (PBR)

4.4.1 Especificação do reator PBR e montagem do aparato experimental

O reator enzimático e suas dimensões estão representados na Figura 9. Na montagem do aparato experimental, o reator foi imerso em uma jaqueta térmica com temperatura controlada de 50 °C por meio da recirculação de água oriunda de um banho termostatizado (Tecnal®, modelo TE-2000) (FIGURA 10 (a)). A bomba peristáltica (MS Tecnopon, modelo LDP-201-3/DMC 100) foi responsável pelo escoamento da solução reagente (substrato - solução de sacarose) a 11,5 mL min⁻¹, inicialmente imersa à 50 °C em banho maria digital com circulação interna de água (Novatecnica®). A conexão entre a bomba e o reator, constituída por uma tubulação com 0,6 cm de diâmetro, proporcionou o fluxo descendente da solução reagente. O aparato experimental descrito está disposto na FIGURA 10 (b).

Figura 9 - Reator enzimático e suas dimensões



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Figura 10 - Aparato experimental para os processos de adsorção e reação



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Reator imerso na jaqueta térmica.

(b) Montagem do aparato experimental.

4.4.2 Ensaio de adsorção *in situ* do corante em leito catalítico de reator PBR recheado com biomassa microbiana

Com o intuito de se obter o perfil cinético de adsorção *in situ* do corante AM em leito catalítico, o reator PBR foi recheado com esferas de biomassa úmida (diâmetro de $4,2 \pm 0,1$ mm) até a altura de $2,1 \times 10^{-2}$ m. Posteriormente, foram preparadas duas soluções: (i) solução (A), constituída por sacarose comercial (União®) 473 g L^{-1} e (ii) solução (B), constituída por solução de sacarose comercial (União®) 473 g L^{-1} e corante AM 10 mg L^{-1} .

As soluções (A) e (B) foram previamente aquecidas à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho maria com recirculação interna de água (Novatecnica®). A solução (A) foi bombeada até preencher o reator e, em seguida, bombeou-se a solução (B). As amostras da solução (B) foram coletadas na saída do reator, operado a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, até que a concentração do corante AM na saída do equipamento fosse igual a sua concentração inicial de alimentação. Após este período, a solução (A) foi bombeada e coletada na saída do reator até que esse estivesse completamente isento de corante. As amostras das soluções (A) e (B) foram coletadas por um período de 15 segundos, tempo necessário para se obter um volume suficiente de amostra para posterior quantificação por espectrofotometria. Procedimento experimental análogo foi aplicado, no mesmo leito catalítico, até se atingir a saturação da biomassa pelo corante AM, visando evitar a adsorção de

moléculas de traçador e, conseqüentemente, erros de caracterização nos estudos posteriores de DTR (TÓPICO 4.4.3)

Realizou-se, também, os mesmos experimentos de adsorção *in situ* utilizando-se esferas de vidro (diâmetro de $4,3 \pm 0,2$ mm) como sendo o leito do reator (altura de $2,1 \times 10^{-2}$ m) até a sua saturação. O leito, constituído por esferas de vidro, foi usado para comparar os momentos de DTR deste ao constituído por biomassa e, assim, identificar a formação de eventuais caminhos preferenciais e regiões de estagnação de fluido devido ao problema de empacotamento do leito com a biomassa, o qual não ocorre com o constituído por esferas de vidro.

4.4.3 Ensaios de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) no reator PBR

4.4.3.1 Tipos de Injeções

As injeções do tipo pulso e degrau foram selecionadas para aplicação no reator PBR avaliado (FIGURA 9). O leito do reator foi recheado com esferas de biomassa úmida (diâmetro de $4,2 \pm 0,3$ mm) até a altura de $2,1 \times 10^{-2}$ m e a biomassa catalítica (recheio do PBR) foi saturada conforme procedimento descrito no Tópico 4.4.2. Para a perturbação do tipo pulso, fez-se a injeção de 2 mL da solução (B) pelo bocal do reator com o auxílio de uma seringa e uma mangueira, de forma que a injeção fosse aplicada o mais próximo possível do leito e; para a perturbação do tipo degrau, bombeou-se $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ de solução (B) até que sua concentração na saída do reator fosse igual à sua concentração na entrada. Imediatamente após as perturbações, em ambos os casos, as amostras foram coletadas na saída do reator por 15 segundos. Procedimento análogo foi realizado com esferas de vidro (diâmetro de $4,3 \pm 0,2$ mm) como recheio; porém, aplicando-se somente a injeção do tipo degrau.

Ao término dos ensaios, foi possível caracterizar a DTR mediante o cálculo dos seus momentos (tempo médio de residência, variância e assimetria), descrito pelas Equações (18), (20) e (21), respectivamente.

4.4.3.2 Determinação da altura do leito catalítico e do diâmetro das esferas de biomassa

Para os ensaios em reator PBR visando obter os melhores valores para diâmetro de biocatalisador (biomassa) e altura de leito catalítico, foram selecionados esferas de biomassa

com diâmetros de $3,0 \pm 0,1 \text{ mm}$, $4,2 \pm 0,2 \text{ mm}$ e $6,0 \pm 0,2 \text{ mm}$ e alturas de leito catalítico de $2,1 \times 10^{-2} \text{ m}$, $5,0 \times 10^{-2} \text{ m}$, $9,5 \times 10^{-2} \text{ m}$ e $13,0 \times 10^{-2} \text{ m}$. Tais valores foram escolhidos com base nas dimensões do reator, especificadas pela Figura 9. Esferas com diâmetros abaixo de 3,0 mm atravessam as aberturas da grade de sustentação do leito catalítico. Por outro lado, esferas com diâmetro superior à 6,0 mm não penetram facilmente o bocal do reator.

Os experimentos foram realizados da seguinte forma: montou-se o aparato experimental (TÓPICO 4.4.1) e o leito do reator foi recheado com uma das condições de diâmetro de partícula e altura do leito catalítico mencionadas acima. Logo após, aplicou-se o procedimento descrito no Tópico 4.4.2 para saturação, *in situ*, do recheio catalítico. Com a biomassa saturada, fez-se a execução da perturbação do tipo degrau, conforme Tópico 4.4.3.1. Após a perturbação do tipo degrau, removeram-se as esferas de biomassa do reator e um novo leito (com altura do leito ou diâmetro de partícula diferente), foi inserido. A partir desse momento, fez-se um novo processo de saturação *in situ* e uma nova aplicação da perturbação do tipo degrau. Por fim, o cálculo dos momentos da DTR foi feito por meio das Equações (18), (20) e (21).

4.4.4 Determinação das concentrações do corante azul de metileno

As amostras coletadas nos ensaios descritos pelos Tópicos 4.3 e 4.4 foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Bel Photonics®, modelo V-M5) a 665 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, as concentrações de AM, por meio da curva analítica disposta na Figura 25 do Apêndice A.

4.5 ENSAIOS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM REATOR PBR

Todos os procedimentos descritos neste tópico foram realizados utilizando, como leito catalítico, a condição de 5,0 cm de altura de leito e $3,0 \pm 0,2 \text{ mm}$ de diâmetro de esferas de biomassa. Além disso, ressalta-se que todos os procedimentos foram realizados em triplicata, com substituição do leito catalítico ao final de cada etapa da triplicata. Por fim, os ensaios de atividades enzimáticas de transfrutossilacção foram realizados conforme o procedimento descrito pelo Tópico 4.6 e calculadas pela Equação (5).

4.5.1 Influência da temperatura do meio reacional na atividade de transfrutossilacção

Para avaliar a influência da temperatura do meio reacional na atividade enzimática do processo contínuo, foi preparada uma solução reagente constituída por sacarose comercial (União ®) 473 g L⁻¹ e tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A reacção foi conduzida por 45 minutos nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C no reator PBR, conforme aparato experimental descrito no Tópico 4.4.1. O tempo de reacção (45 minutos) foi necessário para garantir o estado estacionário do processo.

4.5.2 Influência da concentração de substrato nas atividades de transfrutossilacção e obtenção dos parâmetros cinéticos

Para avaliar a influência da concentração de substrato nas atividades enzimáticas do processo contínuo, foram preparadas soluções reagentes constituída por tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5 e sacarose comercial (União ®) nas concentrações de 173 g L⁻¹, 273 g L⁻¹, 373 g L⁻¹, 473 g L⁻¹ e 573 g L⁻¹. A reacção foi conduzida por 45 minutos à 50 °C no reator PBR, conforme aparato experimental descrito no Tópico 4.4.1. Após a obtenção das atividades de transfrutossilacção, os parâmetros cinéticos foram estimados, em regime estacionário, por meio de ajustes dos modelos cinéticos (Equações 6, 7 e 8) aos dados experimentais, mediante auxílio de software gráfico.

4.5.3 Influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilacção

Para se avaliar a influência da vazão volumétrica na atividade de transfrutossilacção, alimentou-se o reator PBR a diferentes vazões (5 mL min⁻¹, 7,5 mL min⁻¹, 11,5 mL min⁻¹, 15 mL min⁻¹ e 20 mL min⁻¹) com solução reagente constituída por sacarose comercial (União ®) 473 g.L⁻¹ e tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 5,5. A alimentação foi realizada por bombas peristálticas (Masterflex, modelo 77120-70 e MS Tecnopon, modelo LDP-201-3/DMC 100) e a reacção enzimática foi conduzida a 50 °C por 45 minutos.

4.5.4 Ensaios de estabilidade operacional no reator

Os estudos de estabilidade operacional foram realizados em sistema reacional com e sem reciclo. Para isso, o reator PBR foi recheado com a biomassa catalítica e a reação foi conduzida a 50 °C, alimentando a solução reagente com vazões volumétricas de 5,0 mL min⁻¹ e 11,5 mL min⁻¹ por meio de bombas peristálticas Masterflex, modelo 77120-70 e MS Tecnopon, modelo LDP-201-3/DMC, respectivamente. A solução reagente foi constituída por sacarose comercial (União ®) 473 g L⁻¹ e tampão tris-acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 5,5. Para realizar o reciclo, a montagem do aparato experimental foi configurada de modo que toda a corrente do efluente do reator fosse reintroduzida como corrente de alimentação, caracterizando um reciclo total (FIGURA 29, APÊNDICE C).

As amostras foram coletadas por 15 segundos (tempo necessário para obter amostra suficiente para análise) e os ensaios de estabilidade foram conduzidos por um período de 12 horas.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Determinação das atividades enzimáticas de transfrutoseilação da biomassa catalítica

Ao se coletar amostras na saída do reator PBR em intervalos de tempo predefinidos, as mesmas foram imersas em banho de água fervente durante 10 minutos, seguido por banho de água e gelo por 5 minutos para interrupção da reação enzimática (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2007; CUNHA et al., 2019; OTTONI et al., 2012). Posteriormente, as amostras foram utilizadas para a quantificação das concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose pelos métodos colorimétricos do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959, VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013) (TÓPICO 4.6.2) e GOD-PAP® (CUNHA, 2017; GANAIE et al., 2014; OLIVEIRA, 2007; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011), (TÓPICO 4.6.3), respectivamente. Por fim, utilizando as concentrações obtidas de frutose transfrutoseilada (EQUAÇÃO 4), determinou-se a atividade enzimática de transfrutoseilação (EQUAÇÃO 5). Uma unidade (1U) de atividade enzimática de transfrutoseilação foi definida como a quantidade de enzima que transfere um micromol (1 µmol) de frutose por minuto sob as condições experimentais realizadas (CHEN; LIU, 1996; CUNHA et al., 2019; DORTA et al., 2006;

HAYASHI et al., 1990; KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

4.6.2 Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

A concentração dos AR, presentes no meio reacional, foi determinada pelo método DNS, adaptado de Miller (1959), conforme descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013).

A solução DNS foi preparada pela dissolução de 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$) (Dinâmica®) em 200,0 mL de solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®) (Reagente A). Paralelamente, sob aquecimento e agitação, foi preparada 500 mL de uma solução aquosa (Reagente B) constituída por 600 g.L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) (Dinâmica®). Após a dissolução, ambos os reagentes (A e B) foram misturados e o volume final da mistura aferido para 1,0 L em balão volumétrico.

A quantificação dos AR foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 0,5 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 0,5 mL da solução preparada. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 10 minutos e interrompida por resfriamento em banho de água e gelo por 5 minutos, seguido pela adição de 4,0 mL de água destilada.

Posteriormente, triplicatas de alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Bel Photonics ®, modelo UV-M51) a 540 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos AR mediante auxílio da curva analítica obtida para o método DNS (FIGURA 26, APÊNDICE A).

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

4.6.3 Determinação da concentração de glicose (G)

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP®, conforme utilizado nos trabalhos de Cunha (2017), Cunha et al. (2019), Ganaie et al. (2014), Oliveira (2007) e Vega e Zúniga-Hansen (2011). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato.

A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração

rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG; WONG; CHEN, 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®.

A quantificação, em triplicata, da glicose no meio reacional foi realizada pela adição, em tubo de ensaio, de 35 µL da amostra, oriunda da reação enzimática, em 3,5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 minutos. A coloração final foi analisada com auxílio de espectrofotômetro (Bel Photonics ®, modelo UV-M51) a 505 nm, visando obter as absorvâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações de glicose, por meio da curva analítica obtida para o método GOD-PAP (FIGURA 27, APÊNDICE A).

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

4.6.4 Determinação da massa seca de biomassa catalítica

Ao término dos ensaios de reação enzimática, a biomassa microbiana úmida (leito catalítico) foi removida do interior do reator PBR e lavada abundantemente com água destilada a fim de remover todo resíduo de sacarose aderido a ela e, em seguida, filtrada à vácuo, utilizando a bomba de vácuo TE-058 (Tecnal®), em papel do tipo Whatman nº1 com diâmetro de 90 mm. A biomassa, retida no papel, foi mantida em estufa de secagem (ProLab®) à 60 °C até a obtenção de massa seca constante. O valor da m_s obtido para cada reação, foi aplicado na Equação (5), para a determinação das atividades enzimáticas de transfrutossilação.

4.7 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA INTERNA E EXTERNA

O coeficiente de transferência de massa externo foi obtido por meio da Equação (23). Para isso, determinaram-se os valores dos números adimensionais de Reynolds de partícula, Schmidt e Sherwood, utilizando, respectivamente, as Equações (26), (25) e (24). A velocidade de escoamento do fluido foi obtida considerando a vazão que resultou na maior atividade de transfrutossilação e as dimensões do reator, representadas na Figura 9. Para o cálculo coeficiente de difusão mássica (D_{AB}), as correlações de Darken (EQUAÇÃO 27) e Geankoplis (EQUAÇÃO 28) foram utilizadas.

O *módulo de Thiele* e o *fator de efetividade interna* foram calculados por meio das Equações (29) e (32), respectivamente. Para isso, foi necessário utilizar a Equação (30) e as Equações (33) a (36), determinar o coeficiente de difusão efetivo de massa (D_{Ae}) e a concentração de sacarose na superfície do biocatalisador (C_{As}). O coeficiente de difusão efetivo de massa, por se tratar de um fungo filamentosos, foi calculado pela Equação (31). O valor de C_{As} foi determinado pela Equação (22).

4.7.1 Ensaios de viscosidade dinâmica

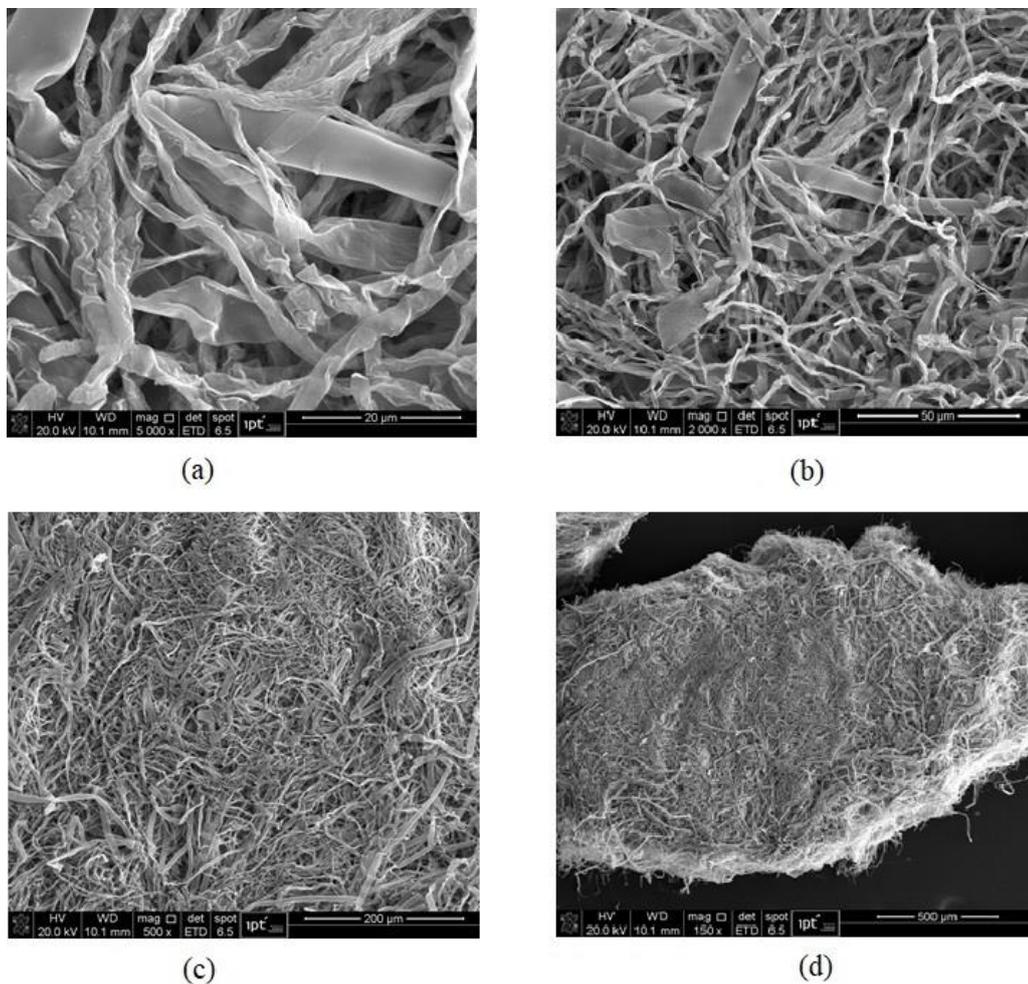
Foram determinados os perfis de viscosidade para as diferentes concentrações de solução reagente constituída por sacarose comercial (173 g L^{-1} , 273 g L^{-1} , 373 g L^{-1} , 473 g L^{-1} e 573 g L^{-1}) para diferentes temperaturas do meio reacional ($20 \text{ }^\circ\text{C}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$) visando obter valores desse parâmetro sob as mesmas condições operacionais para aplicá-los no estudo de transferência de massa interna e externa. As viscosidades foram obtidas mediante auxílio do viscosímetro *Brookfield*, modelo DV-I Prime com *spindle* 61 e agitação de 100 rpm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa obtida por meio da fermentação submersa (TÓPICO 4.1.2) foi submetida às análises de MEV, BET e porosidade. As Figuras 11 (a), (b), (c) e (d) mostram, respectivamente, as imagens obtidas pelo MEV com aumento de 5000x, 2000x, 500x e 150x.

Figura 11 – Análises de MEV para amostra de biomassa livre de *Aspergillus oryzae* IPT-301 com diferentes ampliações



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) 5000x.

(b) 2000x.

(c) 500x.

(d) 150x.

Elizei et al. (2014) e Soares et al. (2010) classificam o gênero *Aspergillus sp* como um fungo filamentosos. Além do mais, segundo Nielsen (1992), as hifas estão presentes nos fungos

filamentosos e seu crescimento ocorre em quatro principais etapas: germinação do esporo, crescimento da hifa, ramificação e diferenciação fúngica. Ao observar as Figuras 11 (a), (b), (c) e (d), que mostram as imagens do MEV no último estágio de formação do fungo, fica evidente a presença de hifas não septadas, sem presença de corpos de frutificação, sem presença de esporos e um micélio homogêneo, característico de crescimento micelial de um fungo filamentoso do gênero *Aspergillus sp.* A característica apresentada pode estar relacionada com as condições de crescimento utilizadas como, por exemplo, meio de cultura, tempo de crescimento e outros parâmetros inerentes ao processo utilizado.

As análises de BET e porosidade resultaram, respectivamente, nos valores de $2,79 \pm 0,04 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ e 1,1 %.

5.2 ADSORÇÃO DE CORANTE NA BIOMASSA CATALÍTICA

Para se obter as melhores condições de projeto do reator PBR enzimático (diâmetro das esferas de biomassa e altura do leito catalítico) a fim de reduzir a formação de caminhos preferenciais e de regiões de estagnação do fluido, realizou-se o diagnóstico do sistema reacional mediante aplicação da DTR. Entretanto, por se tratar de um leito poroso, a biomassa catalítica deve estar saturada de azul de metileno (AM) para sua efetiva aplicação, de forma que, quando o corante fosse injetado, sua adsorção no leito catalítico fosse o mínimo possível. Posto isso, o presente tópico apresenta os resultados obtidos dos estudos de adsorção de AM na biomassa catalítica.

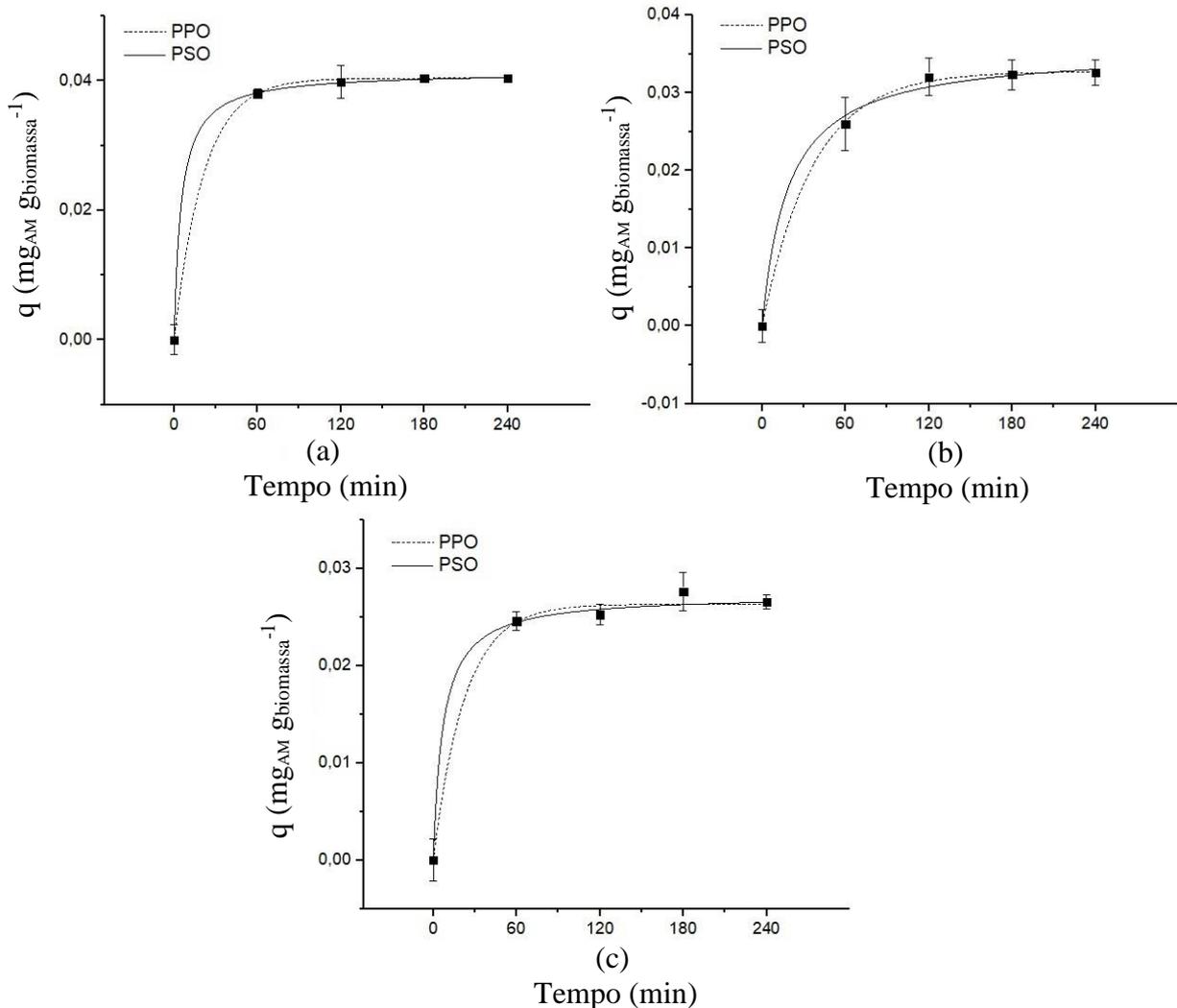
5.2.1 Perfil cinético de adsorção

Com o intuito de se determinar o tempo de equilíbrio de adsorção para, posteriormente, obter as isotermas de adsorção do AM na biomassa, foi realizado o estudo do perfil cinético de adsorção em batelada. As Figuras 12 (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, os perfis cinéticos de adsorção já com os modelos de PPO e PSO ajustados, por regressão não linear, aos dados experimentais.

O ajuste do modelo de PPO resultou em um coeficiente de determinação (R^2) superior ao obtido pelo ajuste do modelo de PSO e, por isso, foi escolhido para representar os dados experimentais. Seu melhor ajuste sugere que o processo de adsorção é controlado por difusão externa e independe da concentração de adsorvato na solução (SILVA et al. 2018). Ao analisar

a Figura 12, observa-se que, independentemente da temperatura, o tempo necessário para o equilíbrio foi de 120 minutos.

Figura 12 - Modelo cinético de adsorção de PPO do azul de metileno em biomassa microbiana ajustado aos dados experimentais para diferentes temperaturas. Condições operacionais – Concentração da solução 473 g L⁻¹ de sacarose e 5 mg L⁻¹ de azul de metileno



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) 40 °C.

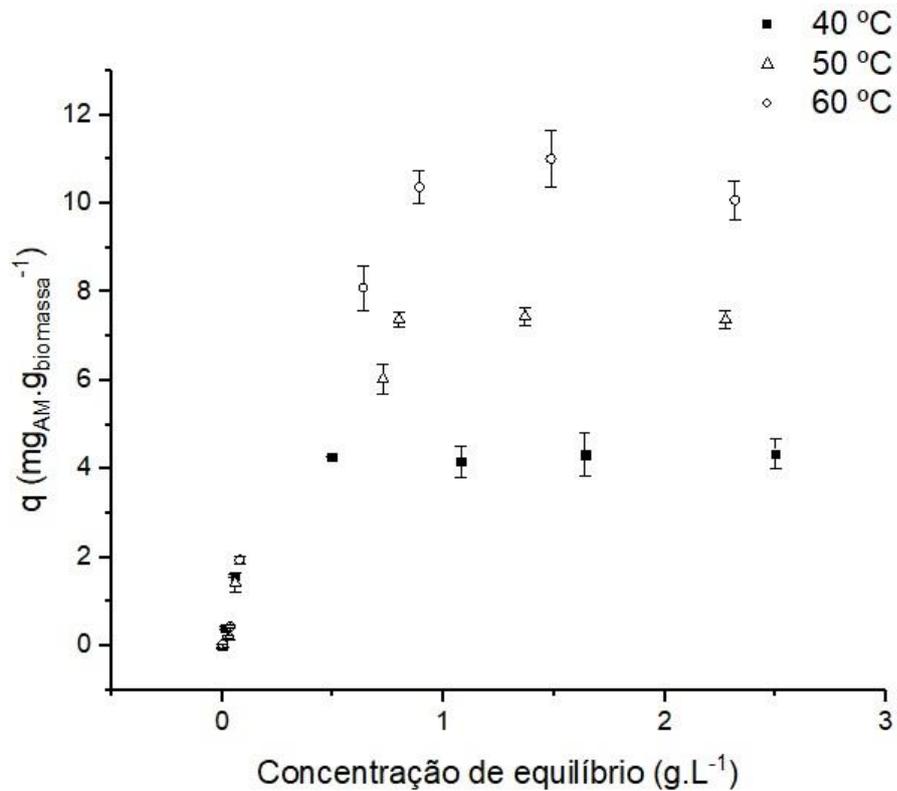
(b) 50 °C.

(c) 60 °C.

5.2.2 Isotermas de Adsorção

Uma vez obtido o tempo de equilíbrio (120 minutos) para saturação da biomassa, foram obtidas as isotermas de adsorção para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C (FIGURA 13) para o sistema biomassa (adsorvente) e azul de metileno (adsorvato).

Figura 13 - Isotermas de adsorção de AM em biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C

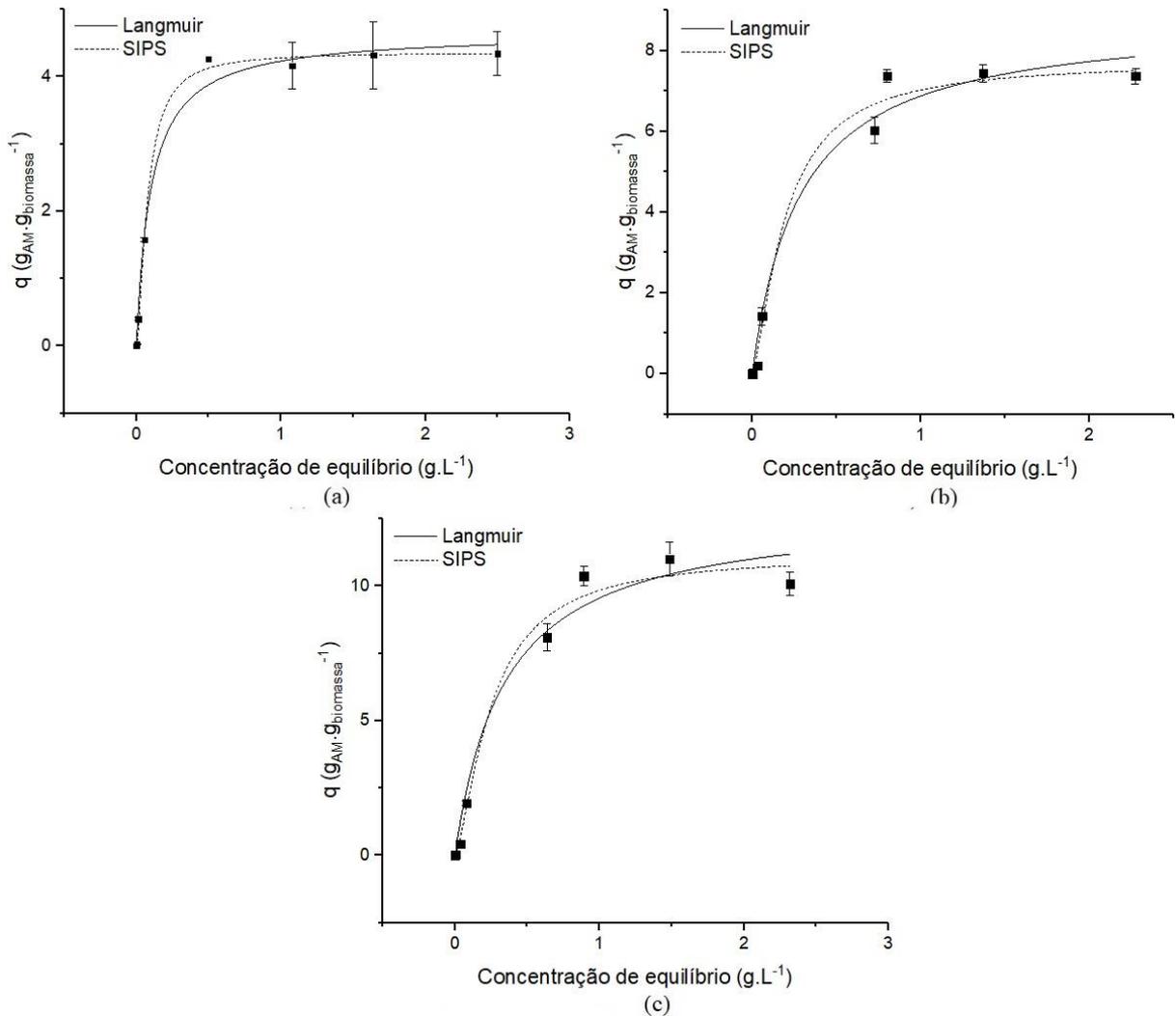


Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Pela Figura 13, observou-se que a quantidade máxima de corante adsorvida aumentou com o aumento da temperatura. Tal fato era o esperado, pois o aumento da temperatura eleva a energia cinética das moléculas, aumentando a taxa de difusão em toda a camada limite externa e interna nos poros da partícula adsorvente. Além disso, o aumento da temperatura modifica o estado de equilíbrio da adsorção (DOGAN; ALKAN; DEMIRBAS, 2006; JIMENEZ; BOSCO; CARVALHO, 2004). Ao comparar o perfil das isotermas da Figura 13 com os perfis descritos pela Figura 2, constata-se que estas seguem o modelo do grupo (L). Sendo assim, supõe-se que a biomassa possui elevada afinidade pelo adsorvato, mesmo quando esses estão presentes a baixas concentrações.

Os dados experimentais (FIGURA 13) foram ajustados a diferentes modelos de isotermas de adsorção disponíveis na literatura (Langmuir, Freundlich e SIPS), para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C (FIGURA 14).

Figura 14 - Ajustes dos dados experimentais aos modelos de isotermas de adsorção (Langmuir e SIPS) de corante AM (adsorvato) em biomassa microbiana (adsorvente) para as diferentes temperaturas



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) 40 °C.

(b) 50 °C.

(c) 60 °C.

O modelo de Freundlich não se ajustou aos dados experimentais para qualquer temperatura avaliada. As Figuras 14 (a), (b) e (c) mostraram bons ajustes aos modelos de Langmuir e SIPS. Entretanto, dentre os modelos ajustados, o de SIPS apresentou maiores valores para os coeficientes de determinação (R^2), entre 0,99 a 1,00. Sendo assim, o modelo de SIPS foi escolhido para representar os dados experimentais e seus parâmetros, para as diferentes temperaturas investigadas, estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros $q_{m\acute{a}x}$, K_s e n do modelo de SIPS para diferentes temperaturas de adsorção

<i>Temperatura (° C)</i>	<i>Parâmetros</i>		
	$q_{m\acute{a}x}$ ($g_{adsorvente} \cdot g_{biomassa}^{-1}$)	K_s ($L \cdot g_{adsorvente}^{-1}$)	n
40	$4,36 \pm 0,07$	13 ± 1	$(15 \pm 2) \cdot 10^{-1}$
50	$7,7 \pm 0,6$	5 ± 2	$(14 \pm 3) \cdot 10^{-1}$
60	$11,2 \pm 0,9$	4 ± 1	$(15 \pm 3) \cdot 10^{-1}$

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Uma vez que os valores do parâmetro n diferem-se da unidade (TABELA 3), infere-se que a superfície do adsorvente é heterogênea (NETHAJI; SIVASAMY; MANDAL, 2012). Tal fato é coerente com as imagens obtidas por meio do MEV (FIGURA 11), que mostram a heterogeneidade da superfície da biomassa. Além disso, segundo Tzabar e Brake (2016), verifica-se que a adsorção ocorre em monocamadas, uma vez que o melhor ajuste foi pelo modelo de SIPS. O valor da constante K_s , que representa a afinidade entre o adsorvato e o adsorvente, diminuiu com o aumento da temperatura. Isso era o esperado, pois, conforme visto no Tópico 5.2.1, as moléculas de AM adsorvem fisicamente ao adsorvente e o aumento de temperatura favorece sua dessorção, conseqüentemente, diminuindo a afinidade entre o adsorvente (biomassa) e o adsorvato (AM).

O modelo de SIPS mostrou que uma variação de 10 °C na temperatura da solução de sacarose e corante AM resultou numa variação de, aproximadamente, 3 mg de AM adsorvidos na biomassa.

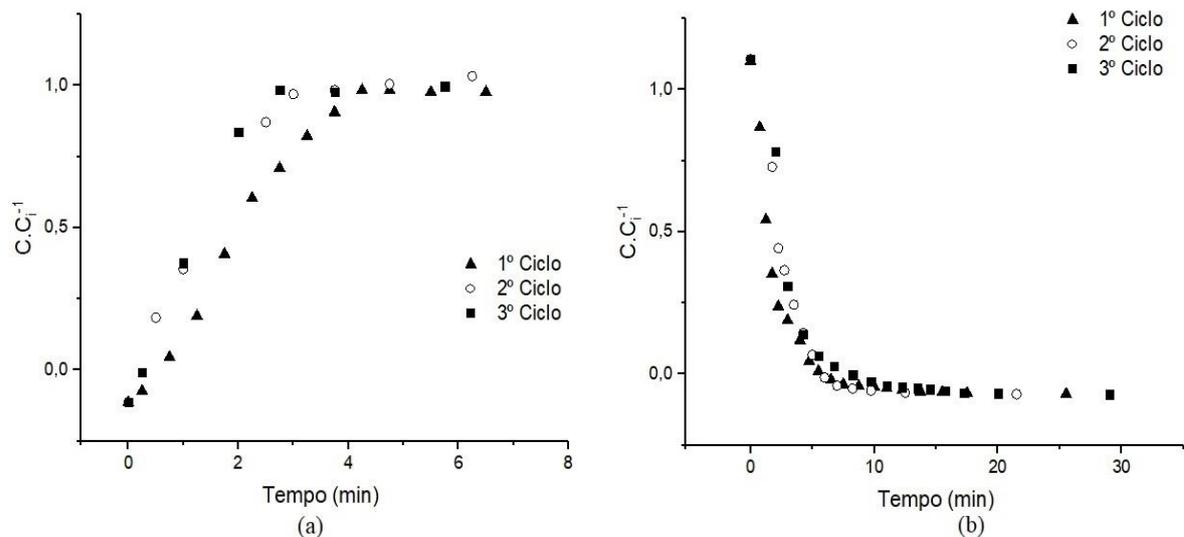
5.2.3 Ensaio de adsorção de corante em reator PBR

O processo de adsorção em batelada (TÓPICO 4.3.1) para posterior preenchimento do leito do reator PBR, embora o caracterize apropriadamente, não é viável do ponto de vista operacional e financeiro, pois, ao término do processo, há problemas na separação da biomassa do sobrenadante devido ao reduzido tamanho das partículas adsorventes, havendo perda de massa. Quando se trabalha com processos contínuos, para evitar os problemas mencionados, costuma-se realizar o processo de adsorção diretamente no reator: a biomassa empacotada no leito catalítico recebe o fluxo de efluente contendo AM para saturá-la e, em seguida, o fluxo do efluente, sem corante, para retirar o AM presente nos interstícios do leito catalítico (purga).

Esse processo é realizado em ciclos que permitem verificar se, ao fim, houve a saturação da biomassa (ALFREDO et al., 2015).

Conforme descrito pelo Tópico 4.4.2, realizaram-se três ciclos de saturação/purga para o leito composto por esferas de biomassa, os dados obtidos estão dispostos nas Figuras 15 (a) e (b). O eixo das ordenadas representa a razão entre a concentração de AM na saída do reator (C) e a concentração inicial de AM (C_i). A saturação é atingida quando a razão se torna igual a 1.

Figura 15 - Ciclos de saturação e purga de AM na biomassa microbiana em reator PBR



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Ciclos de saturação.

(b) Ciclos de purga.

A análise da Figura 15 (a) permitiu verificar que, ao final do primeiro ciclo, ainda não houve a saturação da biomassa. Porém, a partir do segundo ciclo, a biomassa saturou. Isso pode ser verificado pela sobreposição das curvas referentes ao segundo e terceiro ciclos.

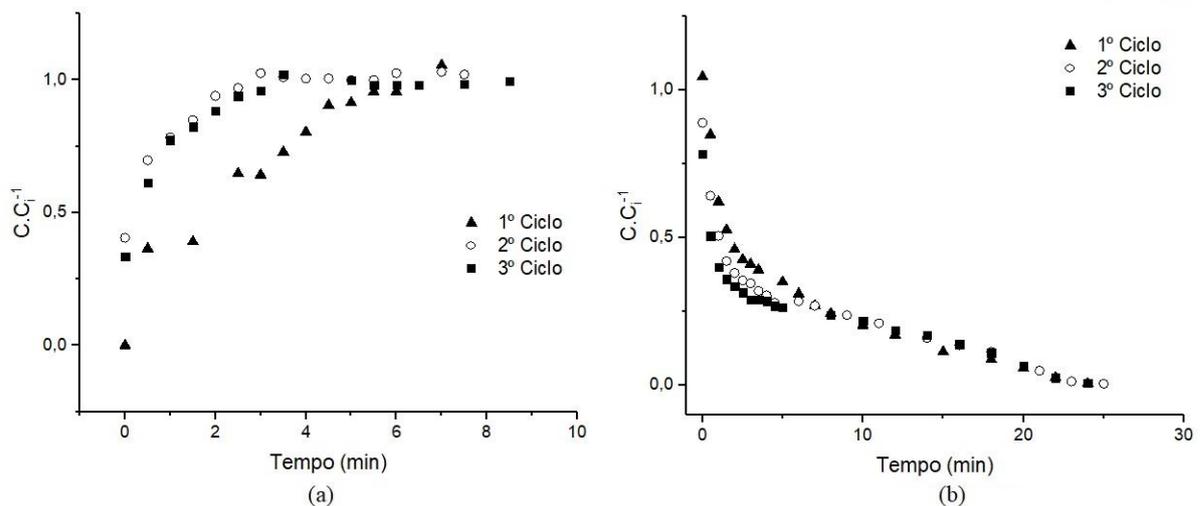
Tavares (2007) estudou, em reator de leito fixo, o processo de adsorção do sistema benzeno, tolueno e xileno em casca de coco e provou que o tempo de retenção do efluente no interior da coluna de adsorção foi o fator mais significativo para o processo. O mesmo foi verificado por Lima (2010), que estudou a adsorção, em reator de leito fixo, de contaminantes orgânicos aquosos em bagaço de cana-de-açúcar. Em seu estudo, o maior tempo de residência resultou na maior zona de adsorção. Logo, pelo tempo de retenção do fluido no reator ser um parâmetro determinante no processo de saturação *in situ*, propõe-se que, ao final do primeiro ciclo, a biomassa ainda não saturou porque o tempo de contato entre o adsorvente e o adsorvato não foi suficiente para tal. Isso pode ser verificado pela sobreposição do perfil de saturação do terceiro ciclo ao perfil do segundo ciclo, mostrando que, a partir do segundo ciclo de adsorção,

a biomassa saturou e o aumento do tempo de contato provocado pelo terceiro ciclo não influenciou no processo de adsorção. Além disso, a sobreposição exclui a hipótese de que a saturação não ocorreu no primeiro ciclo devido ao processo de purga, que além de ter removido o AM presente no interstício das esferas de biomassa, também poderia ter removido o AM adsorvido na biomassa; já que, pela Figura 15 (b), nota-se que, ao final de cada ciclo, todo o AM presente no interstício do leito catalítico foi removido do reator pela solução de sacarose e, caso houvesse a dessorção do AM da biomassa, os perfis cinéticos do terceiro e segundo ciclo não se deveriam sobrepor.

Realizou-se, também, ensaios de saturação/purga em reator PBR utilizando, todavia, esferas de vidro como leito catalítico, para verificar a quantidade de ciclos necessários para adsorção deste leito e, seguramente, aplicar a medida de DTR, comparando seus momentos aos momentos obtidos para o leito composto por biomassa.

Os ciclos de saturação e purga para o leito de esferas de vidro são apresentados pelas Figuras 16 (a) e (b), respectivamente. De acordo com os perfis obtidos, nota-se que o comportamento do leito composto por esferas de vidro se assemelha ao comportamento do leito composto pela biomassa. Portanto, a análise da Figura 16 coincide com a análise feita para os perfis da Figura 15.

Figura 16 - Ciclos de saturação e purga para leito formado por esferas de vidro



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Ciclos de saturação.

(b) Ciclos de purga.

Conforme esperado, o fluxo descendente de substrato não compactou o leito formado por esferas de vidro e, assim, a comparação entre seus momentos de DTR com os momentos de

DTR do leito composto por biomassa pôde ser realizada a fim de verificar a formação ou não de caminhos preferenciais e regiões de estagnação de fluido no leito constituído por biomassa.

Dessa forma, o processo de adsorção *in situ*, devido as vantagens operacionais já mencionadas e por garantir a saturação da biomassa, foi o escolhido para ser realizado previamente às medidas de DTR, sendo executado, em todos os casos, dois ciclos de saturação/purga visando a saturação do leito catalítico.

5.3 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR) NO REATOR PBR

5.3.1 Avaliação das perturbações tipos pulso e degrau em reator PBR

Ao realizar o procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.4.3.1, foi possível, pela análise dos três momentos da DTR, determinar o melhor tipo de injeção (perturbação do tipo pulso e degrau) a ser aplicado ao reator PBR em estudo. A Tabela 4 mostra os momentos da DTR obtidos para os dois tipos de injeção.

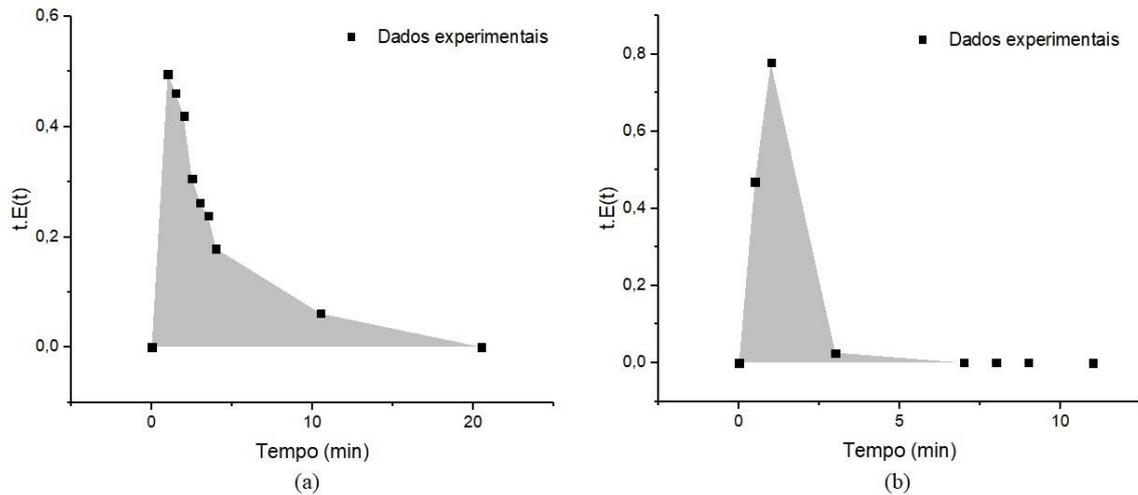
Tabela 4 - Dados experimentais dos momentos da DTR para injeções do tipo pulso e degrau no reator PBR

<i>Tipo de Injeção</i>	t_m (min)	σ^2 (min ²)	s^3 (min ³)
<i>Pulso</i>	2,34 ± 2,58	6,64	35,75
<i>Degrau</i>	1,3 ± 0,7	0,47	0,02

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Os dados da Tabela 4 mostraram elevados valores de variância e assimetria para a injeção do tipo pulso. Isso indica que houve grande dispersão e assimetria da distribuição em relação ao tempo médio de residência. O mesmo não ocorreu para a injeção do tipo degrau. Esses fatos podem ser verificados pela análise da cauda formada nos gráficos de $[t.E(t)]$ versus $[t]$ para as injeções do tipo pulso e degrau, representados pelas Figuras 17 (a) e (b), respectivamente.

Figura 17 - Curva do tempo médio de residência para a injeções do tipo pulso e degrau



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Injeção do tipo pulso.

(b) Injeção do tipo degrau.

De acordo com Fogler (2012), quando há formação de cauda alongada no gráfico do tempo médio de residência, a análise da DTR possui grandes imprecisões. Foi evidente, pela comparação das Figuras 17 (a) e (b), o maior alongamento da cauda para a injeção do tipo pulso, corroborando os elevados valores para os momentos da DTR. Tal alongamento (FIGURA 17 (a)), pode estar relacionado ao acúmulo de AM que ocorreu sobre o leito catalítico, imediatamente após a injeção, fazendo com que a quantidade total de AM demorasse a percorrer todo o leito do reator. Portanto, devido aos problemas apresentados, os estudos da DTR, no presente trabalho, foram realizados pela aplicação da perturbação do tipo degrau visando a obtenção dos melhores valores para o diâmetro de partícula (esferas de biomassa) e altura do leito catalítico.

5.3.2 Diâmetro de partícula e altura do leito catalítico

Após a execução do procedimento experimental descrito no Tópico 4.4.3.2, calcularam-se os três momentos da DTR para as diferentes alturas de leito catalítico e diâmetro de partícula (esferas de biomassa). Tais valores estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores dos momentos da DTR para diferentes diâmetros de partícula e altura de leito catalítico

<i>Altura do leito (cm)</i>	<i>Diâmetro de partícula (mm)</i>								
	<i>3,0 ± 0,2</i>			<i>4,2 ± 0,2</i>			<i>6,0 ± 0,4</i>		
	<i>t_m</i>	<i>σ²</i>	<i>s³</i>	<i>t_m</i>	<i>σ²</i>	<i>s³</i>	<i>t_m</i>	<i>σ²</i>	<i>s³</i>
	(min)	(min ²)	(min ³)	(min)	(min ²)	(min ³)	(min)	(min ²)	(min ³)
<i>2,1</i>	1,21	2,99	-	1,07	0,74	24,9	1,93	10,5	-
<i>5,0</i>	1,27	1,00	12,6	1,21	1,25	36,1	0,89	0,45	3,37
<i>9,5</i>	2,01	7,18	-	0,90	2,00	-	1,31	1,00	11,4
<i>13,0</i>	1,87	4,16	-	0,86	1,23	-	1,05	1,00	12,8

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Alguns valores de assimetria (s^3) apresentaram ordem de grandeza muito elevada e, por isso, não foram apresentados na Tabela 5. Para avaliação da melhor condição de diâmetro de partícula e altura de leito, deve-se comparar o tempo médio de residência (t_m) ao tempo espacial (τ), de modo que quanto mais próximos, menores os problemas de dispersão, aproximando, da idealidade, o reator (FOGLER, 2012). Assim, o τ , calculado por meio da Equação (19), para as alturas de 2,1 cm, 5,0 cm, 9,5 cm e 13,0 cm de leito catalítico foi de 0,14 min, 0,33 min, 0,52 min e 0,67 min, respectivamente. De acordo com os dados dispostos na Tabela 5, a condição de 13,0 cm de altura e $6,0 \pm 0,4$ mm de diâmetro de partícula foi a que apresentou t_m mais próximo do seu respectivo τ , com menores valores de variância e assimetria - mostrando-se, portanto, a melhor condição de leito catalítico.

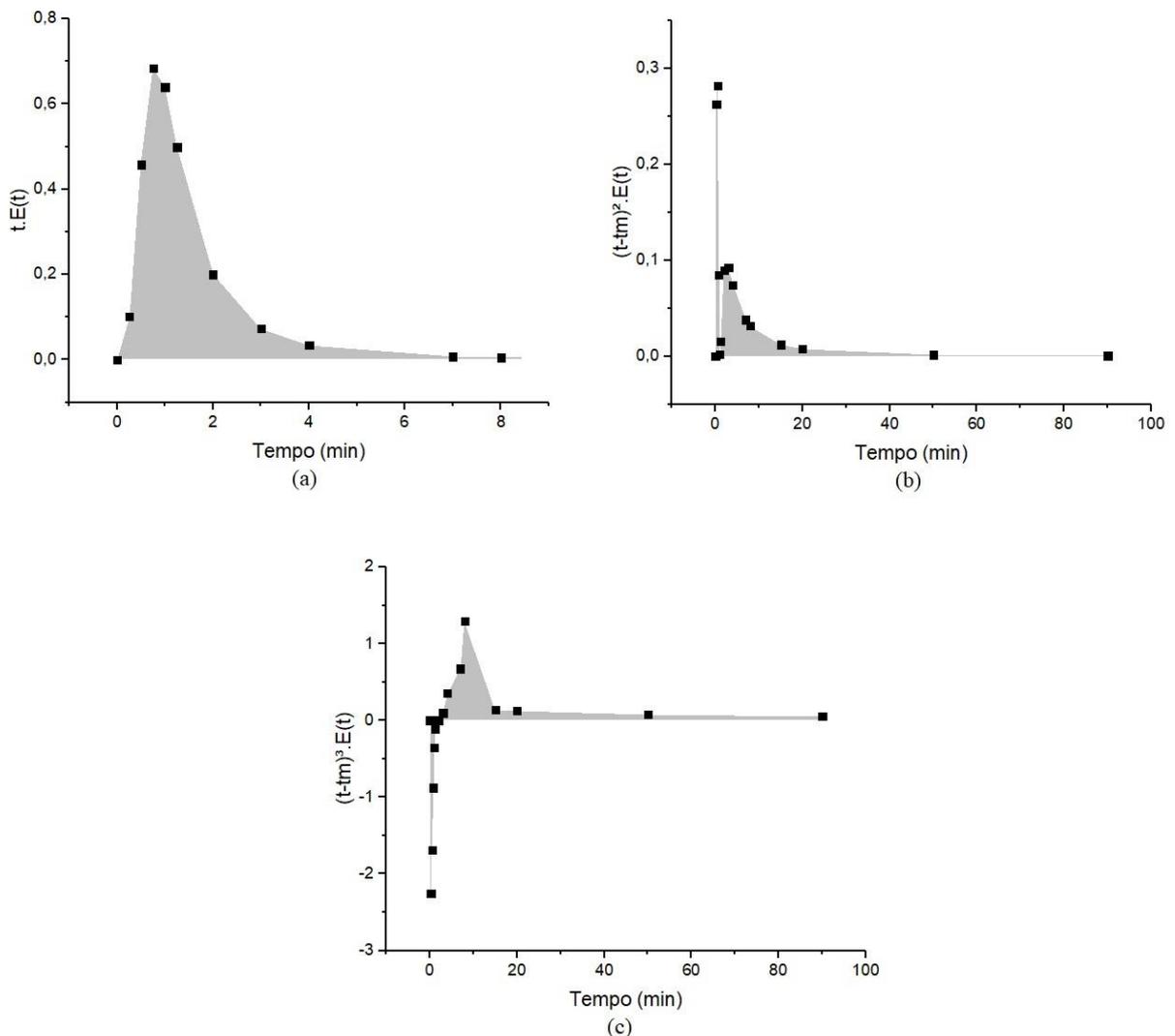
Batista (2019) estudou a DTR em reator de leito fixo com leito formado por pó de sabugo de milho utilizando, como traçador, corante rosa lipossolúvel. Em seu trabalho, o tempo espacial foi inferior ao tempo médio de residência, sendo este fato atribuído aos problemas de resistência ao escoamento do fluido causado pelo leito catalítico e de interações entre o corante e o pó de sabugo de milho. Logo, pelo t_m superior ao τ , entende-se que houve regiões de estagnação do fluido no leito formado por biomassa.

O leito formado por biomassa, quando submetido ao fluxo descendente da solução, conforma-se, podendo formar caminhos preferenciais. Posto isso, comparou-se o tempo espacial para a altura de 5,0 cm (0,33 min) com o tempo médio de residência obtido para o leito composto por esferas de vidro (Tópico 4.4.3.1), visto que este não se conforma quando submetido ao fluxo descendente da solução, conforme verificado no Tópico 5.2.3. O tempo médio de residência calculado para o leito de esferas de vidro foi de 2,4 min, valor superior ao t_m obtido para a mesma condição de leito catalítico (1,21 min). Dessa forma, a análise dos dados

expostos sugere que a conformação observada no leito catalítico provocou a formação de caminhos preferenciais, fazendo com que o fluido percorra o reator em um menor tempo do que deveria (FOGLER, 2012). A instalação de um dispersor de fluxo acima do leito catalítico permite a uniformização do fluxo de reagente, podendo ser uma forma de amenizar o problema mencionado (STANISLAUS; MARAFI; RANA, 2010).

Para uma análise mais aprofundada dessa melhor condição operacional, os gráficos dos momentos da DTR foram apresentados pelas Figuras 18 (a), (b) e (c).

Figura 18 - Tempo médio de residência, variância e assimetria para a condição operacional de $6,0 \pm 0,4$ mm diâmetro de partícula e altura do leito de 13,0 cm



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Tempo médio de residência.

(b) Variância.

(c) Assimetria

A Figura 18 (a), assemelhou-se a Figura 17 (b), mostrando que não houve formação de cauda alongada e que as condições operacionais não apresentaram grandes imprecisões. Os picos agudos da Figura 18 (b) e o valor positivo da assimetria assim como do seu pico achatado, para o lado direito (FIGURA 18 (c)), indicam que a DTR apresentou, respectivamente, pequena variância e deslocamento da dispersão para o lado direito (positivo) (LEVENSPIEL, 2011; SFREDO, 2006).

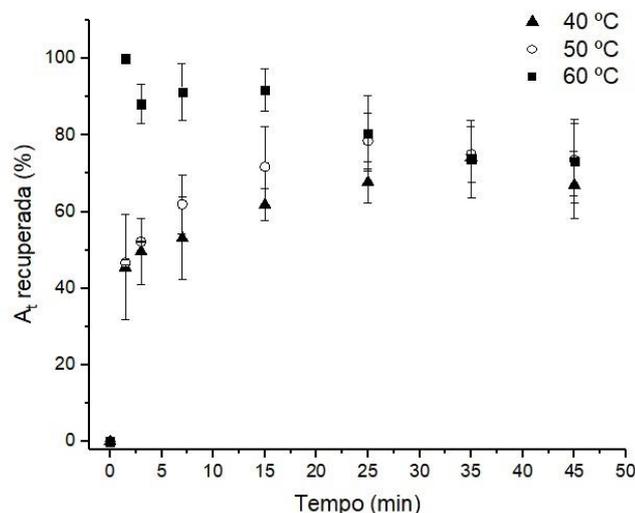
5.4 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM REATOR PBR

Com as condições de 5,0 cm de altura do leito e $3,0 \pm 0,2$ mm de diâmetro de esferas de biomassa, iniciaram-se os estudos da influência da temperatura do meio reacional, da concentração e da vazão de alimentação de solução reagente (substrato) nos perfis de atividade enzimática em reator PBR. Além disso, foram obtidos os parâmetros cinéticos mediante ajustes dos modelos enzimáticos reportados na literatura aos dados experimentais.

5.4.1 Efeitos da temperatura reacional sobre a atividade de transfrutossilção

Para avaliar o efeito da temperatura do meio reacional na atividade enzimática de transfrutossilção, foi realizado o procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.5.1. Os perfis obtidos foram apresentados pela Figura 19.

Figura 19 - Perfis de atividade enzimática em função da temperatura do meio reacional: 40 °C, 50 °C e 60 °C. Condições operacionais – altura do leito catalítico 5,0 cm, diâmetro de partícula $3,0 \pm 0,1$ mm, concentração de solução reagente 473 g.L^{-1} , pH 5,5 e vazão de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Observou-se que o perfil obtido para a temperatura de 60 °C sofreu um decréscimo da atividade de transfrutossiliação ao decorrer da reação. O decréscimo pode estar relacionado à baixa estabilidade da enzima à 60 °C, por ser uma temperatura compreendida entre a faixa ótima de temperatura da FFase (60 °C – 65 °C) (SCHUURMANN et al. 2014). Além disso, a desativação enzimática da FTase também é um fator que resulta no decréscimo da atividade relativa de transfrutossiliação ao longo do tempo, conforme sugere Silva (2009) que, em seu estudo, mostrou que ocorreu desativação da FTase de *Penicillium sp.* a partir de 10 min de reação à 50 °C.

Os perfis de atividade para as temperaturas de 40 °C e 50 °C atingiram o estado estacionário aos 25 minutos de reação, mantendo suas atividades constantes ao longo da reação. No estado estacionário (25 min – 45 min), os intervalos das A_t recuperadas foram de 67 % a 74 % e 74 % a 79 % para as temperaturas de 40 °C e 50 °C, respectivamente. Diante do exposto, a temperatura de 50 °C foi a que apresentou maior atividade recuperada de transfrutossiliação para o processo contínuo em PBR. A mesma temperatura também resultou na maior atividade de transfrutossiliação para a reação em batelada, obtida nos estudos de Cunha et al. (2019) e Garcia (2018).

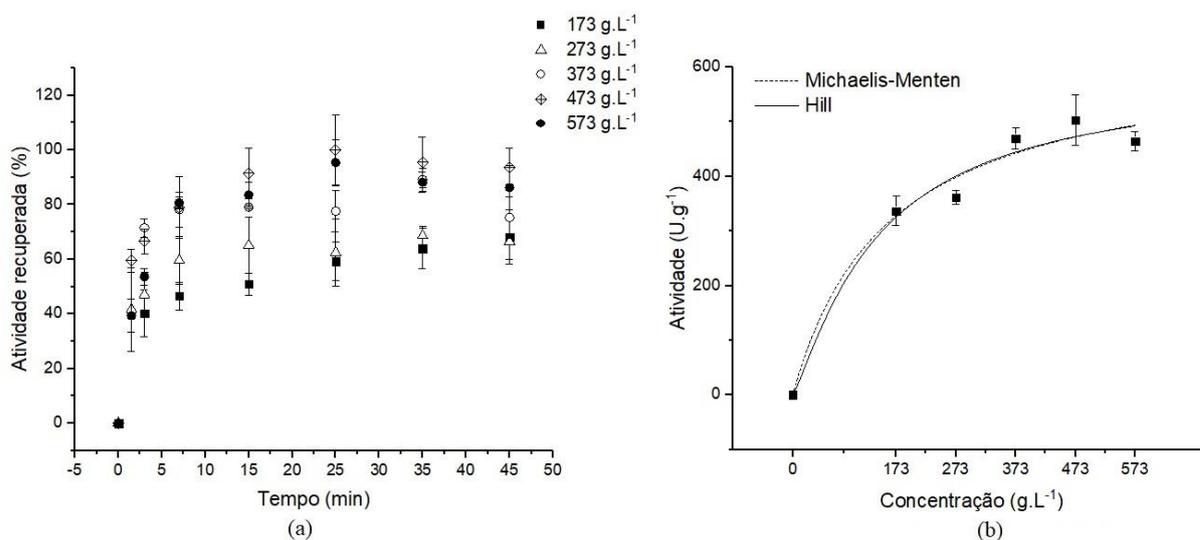
5.4.2 Efeitos da concentração de solução reagente na atividade de transfrutossiliação e obtenção dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato (solução reagente) na atividade de transfrutossiliação foi avaliado mediante procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.5.2. As Figuras 20 (a) e (b) mostram, respectivamente, os perfis de atividade enzimática obtidos para a biomassa catalítica e os ajustes dos dados aos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill para um tempo de 35 minutos de reação (estado estacionário).

De acordo com a Figura 20 (a), observou-se que o aumento da concentração de substrato (sacarose) alimentada no reator, até o limite de 473 g L⁻¹, levou ao aumento da atividade de transfrutossiliação, obtendo, nesta condição, a atividade máxima recuperada de 100 ± 13 % aos 25 min de reação. Porém, para a concentração de 573 g L⁻¹, no mesmo tempo de reação, verificou-se um decréscimo da atividade enzimática recuperada para 95,4 ± 8,4 %; confirmando, então, a concentração de 473 g L⁻¹ como a concentração de substrato que resulta na maior atividade de transfrutossiliação para o processo contínuo. Aos 35 min e 45 min de

reação, a concentração de substrato de 573 g L^{-1} apresentou uma queda de 7 % da atividade recuperada em relação à concentração de 473 g L^{-1} .

Figura 20 - Perfis de atividade enzimática para diferentes concentrações de substrato e ajustes dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten e Hill aos dados experimentais no tempo de 35 minutos de reação. Condições operacionais – altura do leito catalítico $5,0 \text{ cm}$, diâmetro de partícula $3,0 \pm 0,1 \text{ mm}$, temperatura da solução reagente $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Perfis cinéticos de atividade enzimática.

(b) Ajuste dos modelos de Hill e Michaelis-Menten.

No estudo, em batelada, de Cunha et al. (2019), a FTase micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresentou valor máximo de transfrutoseilação ($282,57 \pm 27,33 \text{ U.g}^{-1}$) em $470,6 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose com pH de 5,5 e temperatura reacional de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, decrescendo para maiores concentrações de sacarose (aproximadamente 220 U.g^{-1} para concentração de sacarose de 592 g.L^{-1}). No trabalho de Garcia (2018), variou-se - para o mesmo microrganismo, pH e temperatura - a concentração de sacarose de $75,5 \text{ g L}^{-1}$ a 604 g L^{-1} . Nessas condições, a atividade máxima de transfrutoseilação (aproximadamente 600 U g^{-1}) se deu em $480,2 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose, que também diminuiu quando a reação foi conduzida com concentração de 600 g L^{-1} para, aproximadamente, 550 U g^{-1} .

Dessa maneira, nota-se que o comportamento obtido pelo processo contínuo em PBR assemelha-se ao obtido nos estudos em batelada, com valores muito próximos de concentração de substrato que resulta na maior atividade recuperada, assim como o decréscimo para concentrações mais elevadas. Segundo Antošová e Polakovič (2001), tal decréscimo pode estar relacionado à inibição pelo substrato ou por algum dos produtos formados. Segundo Jung et al. (2011), o acúmulo dos produtos no meio reacional é reduzido quando a reação de

transfrutossilacão é conduzida em reator contínuo. Sendo assim, infere-se que a inibição, observada na reação contínua para elevadas concentrações de sacarose (573 g.L^{-1}), pode ter ocorrido pelo substrato.

A maior atividade de transfrutossilacão, para a condição de 473 g L^{-1} , foi de $526,6 \pm 68,2 \text{ U g}^{-1}$, valor próximo ao obtido por Garcia (2018). Entretanto, para comparar os da atividade enzimática em reação contínua com a reação em batelada, deve-se analisar a relação entre o tempo de residência e reação empregados no processo contínuo e em batelada, respectivamente. No estudo de Garcia (2018), a reação ocorreu por um período de 60 min. Por outro lado, o tempo médio de residência para o processo contínuo foi de 1,27 min. Logo, ao operar o PBR por 60 min, estima-se um rendimento 40 vezes maior quando comparado ao processo em batelada. Essa diferença pode estar relacionada ao acúmulo do inibidor enzimático (glicose) que ocorre no meio reacional para o processo em batelada. Ainda, ao operar com um PBR, evita-se a necessidade da constante substituição do biocatalisador, que ocorre no processo em batelada, elevando o tempo de produção, uma vez que se devem considerar os tempos de carregamento e limpeza do reator.

Ainda de acordo com a Figura 20 (a), observa-se que, para todas as concentrações estudadas, a partir de 35 minutos, o estado estacionário foi alcançado; sendo, assim, o tempo no qual os modelos cinéticos foram ajustados (FIGURA 20 (b)).

Os parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste do modelo de Andrews indicaram que não houve inibição pelo substrato e seus valores coincidiram com o modelo de Michaelis-Menten. Isso pode ter ocorrido devido ao baixo valor da queda de atividade recuperada para a concentração de 573 g.L^{-1} aos 35 min de reação (7 %), sendo que para verificar uma inibição, seria necessário aumentar, ainda mais, a concentração de substrato (sacarose). A Tabela 6 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos e dos coeficientes de determinação R^2 obtidos pelos ajustes dos modelos de Hill e de Michaelis-Menten.

Tabela 6 - R^2 e parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten e Hill

Parâmetros cinéticos	Modelo de Michaelis-Menten	Modelo de Hill
$V_{\text{máx}} (\text{U.g}^{-1})$	$632,8 \pm 78,2$	$585,1 \pm 306,5$
$K_m, K_{0,5} (\text{g.L}^{-1})$	$160,7 \pm 63,6$	$143,6 \pm 98,8$
n	-	$1,2 \pm 1,6$
R^2	0,98	0,98

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

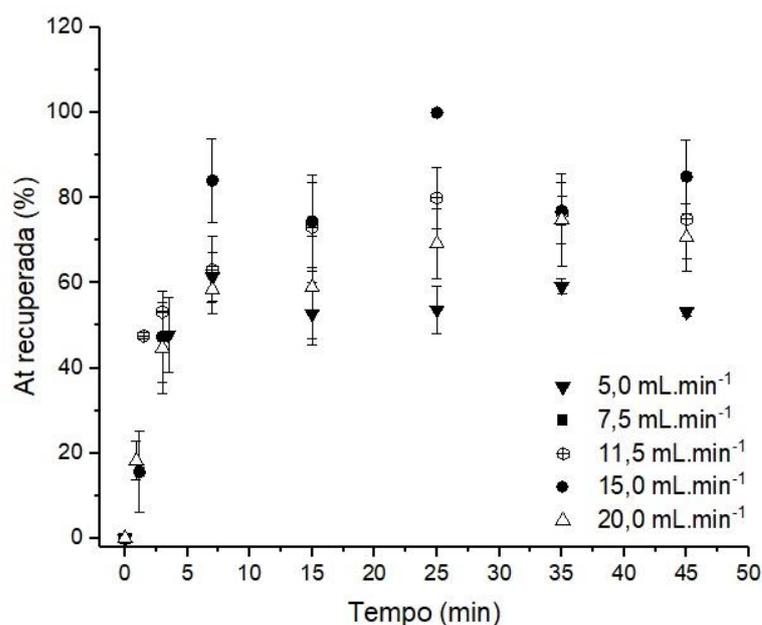
De acordo com a Tabela 6, o ajuste de ambos modelos cinéticos apresentou elevados valores de coeficiente de determinação (0,98) e parâmetros cinéticos semelhantes. Entretanto, por apresentar menores desvios, o modelo de Michaelis-Menten melhor se ajustou aos dados experimentais com parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ iguais a $160,7 \text{ g L}^{-1}$ e $632,8 \text{ U g}^{-1}$, respectivamente.

No processo em batelada, estudado por Garcia (2018), a cinética enzimática da FTase micelial, com um coeficiente de determinação de 96 %, melhor se ajustou ao modelo de Hill, com $V_{m\acute{a}x}$ e $K_{0,5}$ iguais a $833,1 \text{ U g}^{-1}$ e $85,9 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. A comparação entre as constantes de Michaelis-Menten ($160,7 \text{ g L}^{-1}$) e Hill ($85,9 \text{ g L}^{-1}$) indica que houve uma queda da afinidade entre a enzima e o substrato para o processo contínuo.

5.4.3 Efeitos da vazão volumétrica de alimentação na atividade de transfrutossilação

O efeito da vazão do substrato na atividade de transfrutossilação foi avaliado mediante procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.5.3 e a Figura 21 mostra os perfis de atividade enzimática obtidos para a biomassa catalítica.

Figura 21 - Perfis cinéticos da atividade de transfrutossilação em função da vazão de sacarose à 5 mL min^{-1} , $7,5 \text{ mL min}^{-1}$, $11,5 \text{ mL min}^{-1}$, 15 mL min^{-1} e 20 mL min^{-1} . Condições operacionais: concentração de sacarose de 473 g L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Ao avaliar o estado estacionário dos perfis apresentados pela Figura 21 (15 min a 45 min de reação), nota-se que a vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi a que apresentou menor atividade

recuperada, com intervalo de 53 % a 59 %. As vazões de 7,5 mL min⁻¹ e 11,5 mL min⁻¹ tiveram intervalos muito próximos de atividade recuperada, sendo estes iguais a 73 % a 79 % e 73 % a 80 %, respectivamente. A vazão de 15,0 mL min⁻¹ foi a que apresentou a maior atividade recuperada (100 %), aos 25 minutos de reação. Entretanto, o seu intervalo de atividade recuperada para os demais tempos de reação, variou entre 74 % e 84 %, valor próximo do obtido para as vazões de 7,5 mL min⁻¹ e 11,5 mL min⁻¹. Por outro lado, ao aumentar a vazão para 20 mL min⁻¹, houve um decréscimo da atividade recuperada, com intervalo de 59 % a 74 %.

Baixas vazões volumétricas contribuem para a formação de uma camada limite difusional (presente no entorno da partícula de biocatalisador) de maior espessura, fazendo com que o processo seja limitado pela transferência externa de massa. À medida que se aumenta a vazão volumétrica, a espessura da camada limite diminui, favorecendo a transferência de massa externa, ou seja, o acesso do substrato à superfície do biocatalisador, onde ocorre a reação (FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2000).

Dessa forma, os menores valores de atividade recuperada (5 mL min⁻¹), podem estar atribuídos à formação, no entorno da partícula de biocatalisador, de uma camada limite difusional espessa, tornando a reação limitada pela transferência de massa externa. Isso corrobora com o aumento da atividade recuperada para maiores vazões, pois a camada limite difusional no entorno da partícula de biocatalisador tem sua espessura reduzida e os efeitos da transferência de massa externa tornam-se desprezíveis. Posto isso, acredita-se que, para as vazões entre 7,5 mL min⁻¹ e 15,0 mL min⁻¹, a reação não é mais limitada pela transferência de massa externa, prevalecendo os efeitos de escoamento e da reação. Entretanto, o aumento demasiado da vazão pode fazer com que o tempo de contato entre a molécula de substrato e o sítio ativo da enzima não seja suficiente para ocorrer a reação de transfrutossilação, diminuindo a atividade enzimática. Além disso, elevadas vazões também podem provocar a remoção de enzima superficial do micélio, diminuindo a atividade enzimática. Isso justifica o decréscimo de atividade observado para a vazão para 20 mL min⁻¹. Diante do exposto, a vazão de 11,5 mL min⁻¹ se viabiliza entre as demais, por reduzir os efeitos difusionais ao mesmo tempo em que, comparado com as vazões superiores, diminui a probabilidade de arraste de enzima do biocatalisador e aumenta o tempo de contato entre a molécula de sacarose e o sítio ativo da enzima, favorecendo a reação de transfrutossilação.

5.5 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS COEFICIENTES DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA E INTERNA

Muitos parâmetros que envolvem o cálculo dos coeficientes de TME e TMI dependem das propriedades físicas das substâncias presentes na solução reagente. Sendo assim, a Tabela 7 apresenta, à 50 °C, as propriedades físicas da água e da solução aquosa de sacarose 50 % (m m⁻¹).

Tabela 7 - Propriedades físicas da água e da solução aquosa de sacarose 50 % (m/m) à 50 °C

Propriedades Físicas	Água líquida	Solução aquosa de sacarose (50 % m m ⁻¹)
ρ (kg m ⁻³)	988,1	1214,5
μ (cP)	0,5494	6,18
ν (m ² s ⁻¹)	$5,6 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-6}$
MM (g mol ⁻¹)	18,01	342,3

Fonte: Adaptada de GEANKOPLIS (1993, p. 855) e MATHLOUTH; REISER (1995, p. 200 - 217).

Na Tabela 7, o valor da viscosidade dinâmica da solução de sacarose foi obtido por meio do procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.7.1, cujos dados estão dispostos na Figura 28 do Apêndice B. O valor reportado por Mathlouth e Reiser (1995) para a viscosidade dinâmica da solução aquosa de sacarose 50 % m m⁻¹ a 50 °C (5,07 cP) é próximo ao valor obtido por meio do procedimento experimental (TABELA 7). A diferença observada pode estar relacionada aos problemas de calibração do viscosímetro, preparo da solução de sacarose, controle de temperatura, entre outros. Posto isso, o valor experimental (TABELA 7) foi utilizado para os cálculos dos coeficientes de TMI e TME.

5.5.1 Coeficiente de transferência de massa externa

Para se obter o coeficiente de transferência de massa externo (k_c), é necessário que se conheça os números adimensionais de Reynolds de partícula (Re_p), Schmidt (Sc) e Sherwood (Sh) assim como o coeficiente de difusão da sacarose (A) em água (B) (D_{AB}). Seguindo os métodos descritos no Tópico 4.7, calcularam-se os valores dos adimensionais mencionados, dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores dos números adimensionais de Sherwood (Sh), Schmidt (Sc) e Reynolds de partícula (Re_p)

Número adimensional	Valor
<i>Reynolds de partícula - Re_p</i>	0,59
<i>Schmidt - Sc</i>	$6,6 \times 10^6$
<i>Sherwood - Sh</i>	$8,8 \times 10^1$

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

O Re_p apresentado na Tabela 8 indica que o fluxo é laminar com um valor relativamente baixo, quando comparado ao limite para que haja a transição entre o regime laminar e o turbulento em leitos empacotados (40) (HILL; ROOT, 2014). Isso evidencia que as forças viscosas ainda são muito predominantes no escoamento. Por outro lado, quando comparado a outros trabalhos de produção contínua de FOS, seu valor é relativamente elevado como, por exemplo, no estudo de Zambelli et al. (2016) cujo Re_p foi de 0,0042.

O número de Schmidt representa a relação entre a quantidade de movimento e a difusividade mássica, ou seja, uma relação entre a espessura relativa da camada limite hidrodinâmica com a espessura da camada limite de transferência de massa (FOGLER, 2012). Segundo Levenspiel (2011), valores típicos de Sc, para líquidos, são da ordem de 10^3 . Dessa forma, seu elevado valor (TABELA 8) aponta que a espessura da camada limite de transferência de massa é muito pequena, fazendo com que o processo seja governado pela reação.

O número de Sherwood representa a relação entre a transferência de massa por convecção e por difusão (FOGLER, 2012). Operar o reator sob elevadas vazões ($11,5 \text{ mL min}^{-1}$) resultaram em seu elevado valor (TABELA 8), mostrando que a transferência de massa por convecção se sobrepõe à difusão.

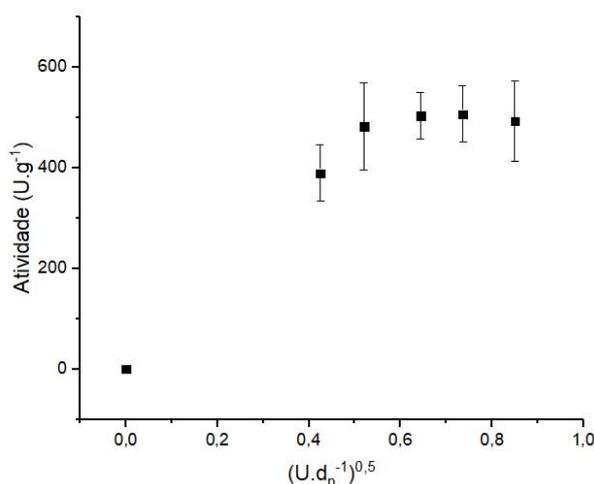
Para determinar o D_{AB} , foi necessário verificar se a solução de sacarose poderia ser considerada uma solução diluída, validando o uso das Equações (27) e (28). Dessa forma, deve-se analisar o coeficiente de atividade de um dos componentes da mistura (γ), pois seu valor indica se uma solução binária pode ou não ser considerada ideal. Vale ressaltar que uma solução é considerada ideal quando as forças intermoleculares são iguais. Isso ocorre, entre outros casos, para uma mistura binária diluída, pois a fração molar do solvente tende a 1 e a solução se comporta como se fosse pura, ou seja, com as mesmas forças intermoleculares. Neste caso, considera-se o estado de referência de Lewis/Randall e o valor do γ do solvente tende a 1 (KORETSKY, 2007).

Starzak e Peacock (1997) avaliaram a relação entre o coeficiente de atividade da água (γ_B) e o teor de substância seca de sacarose (TS) e concluíram que, para um TS entre 0 % e 50 %, o γ_B se aproxima da unidade e, conseqüentemente, a solução aquosa de sacarose se comporta como uma solução ideal (diluída). O TS pode ser obtido por meio de tabelas, desde que se conheça a fração molar de sacarose na solução (MATHLOUTH; REISER, 1995). Com a concentração de sacarose em estudo ($473,0 \text{ g.L}^{-1}$) e os dados da Tabela 7, foi possível determinar a fração molar de sacarose presente na solução; correspondendo esta, de acordo com as tabelas disponíveis na literatura, a 32,7 % de TS. Portanto, segundo os estudos de Starzak e Peacock (1997), o γ_B aproxima-se da unidade e a solução de sacarose $473,0 \text{ g.L}^{-1}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ comporta-se como uma solução ideal (diluída) (MATHLOUTH; REISER, 1995).

Uma vez que a solução aquosa de sacarose pode ser considerada uma solução diluída, com os dados da Tabela 7 e o método descrito pelo Tópico 4.8, determinaram-se os valores dos coeficientes de difusão mássica (D_{AB}) e transferência de massa externa (k_c), sendo estes iguais a $7,7 \times 10^{-13} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ e $2,3 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$, respectivamente.

Segundo Fogler (2012), para avaliar se um processo é limitado ou não pela TME, deve-se comparar o coeficiente de transferência de massa externo (k_c) com a constante de reação (k_r). Entretanto, os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Michaelis-Menten não permitiram determinar um valor exato de k_r , uma vez que não pôde ser aproximado como um modelo de primeira ordem ou ordem zero. Sendo assim, a verificação da influência da TME foi realizada pela construção do gráfico mostrado na Figura 22.

Figura 22 – Regiões de limitação pela TME e pela velocidade de reação



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Observa-se que o perfil obtido na Figura 22 se assemelha ao exemplificado pela Figura 6. Logo, à vazão de 5 mL min^{-1} , a reação é limitada pela TME, ou seja, a velocidade de reação

é mais elevada que a taxa de difusão do substrato pela camada limite externa, prevalecendo os efeitos difusionais. Isso resulta em sítios ativos livres, reduzindo a atividade de transfrutossilacção. A partir de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$, o aumento da vazão não contribui para o acréscimo da atividade enzimática, mostrando que, nessa condição, a reação passa a ser limitada pela velocidade de reação, ou seja, prevalece os efeitos de escoamento e a taxa de difusão do substrato através da camada limite externa é capaz de preencher os sítios ativos da enzima, favorecendo a reação. Sendo assim, não se justifica o acréscimo da vazão além de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$; pois, nesta condição, os efeitos difusionais já são desprezíveis e o acréscimo da vazão pode remover a enzima presente na superfície da biomassa, assim como não permitir o tempo de contato suficiente entre a enzima e o substrato para uma eficiente conversão de sacarose em frutooligossacarídeos.

5.5.2 Coeficiente de transferência de massa interna

Utilizando os dados de BET e porosidade e sabendo que o *Aspergillus oryzae* IPT-301 trata-se de um fungo filamentoso (Tópico 5.1), o *módulo de Thiele* (ϕ_m) e o fator de efetividade interna (η_{im}) para a cinética de Michaelis-Menten puderam ser calculados segundo o método descrito pelo Tópico 4.7. A Tabela 9 apresenta os valores da difusividade efetiva (D_{Ae}), da concentração de sacarose na superfície do biocatalisador (C_{As}) e do *módulo de Thiele* para a cinética de Michaelis-Menten obtidos.

Tabela 9 - Valores do coeficiente de difusão efetiva (D_{Ae}), concentração de sacarose na superfície do biocatalisador (C_{As}) e *módulo de Thiele* para a cinética de Michaelis-Menten (ϕ_m)

$D_{Ae} \text{ (m}^2\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$	$C_{As} \text{ (mol}\cdot\text{m}^{-3}\text{)}$	ϕ_m
$9,3 \times 10^{-17}$	1104,2	2,1

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Freitas (2007) estudou a transferência de massa interna da lactose na enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em alginato de sódio. A cinética enzimática desse microrganismo também seguiu o modelo de Michaelis-Menten e a transferência de massa interna não foi a etapa limitante do processo, com um valor de 3,18 para o *módulo de Thiele*.

O valor do ϕ_m (TABELA 9) mostra que, nas condições avaliadas, a velocidade de difusão da sacarose para o interior da biomassa catalítica é maior que a velocidade de reação na superfície do biocatalisador. Logo, a reação é limitada pela velocidade de reação na superfície do biocatalisador e não pela TMI (FOGLER, 2012). Entretanto, devido à escassez de dados na

literatura referentes aos parâmetros de TMI para a FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301, também foi avaliado o fator de efetividade interna, a fim de verificar a influência da TMI.

O fator de efetividade interna para a cinética de Michaelis-Menten (η_{im}) e os demais parâmetros obtidos estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores do módulo de Thiele para cinética de reação de ordem zero (ϕ_0) e um (ϕ_1) e fatores de efetividade interna para as cinéticas de reação de ordem zero (η_{i0}), um (η_{i1}) e Michaelis-Menten (η_{im})

ϕ_0	ϕ_1	η_{i0}	η_{i1}	η_{im}
4,3	9,3	1,0	0,1	0,75

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

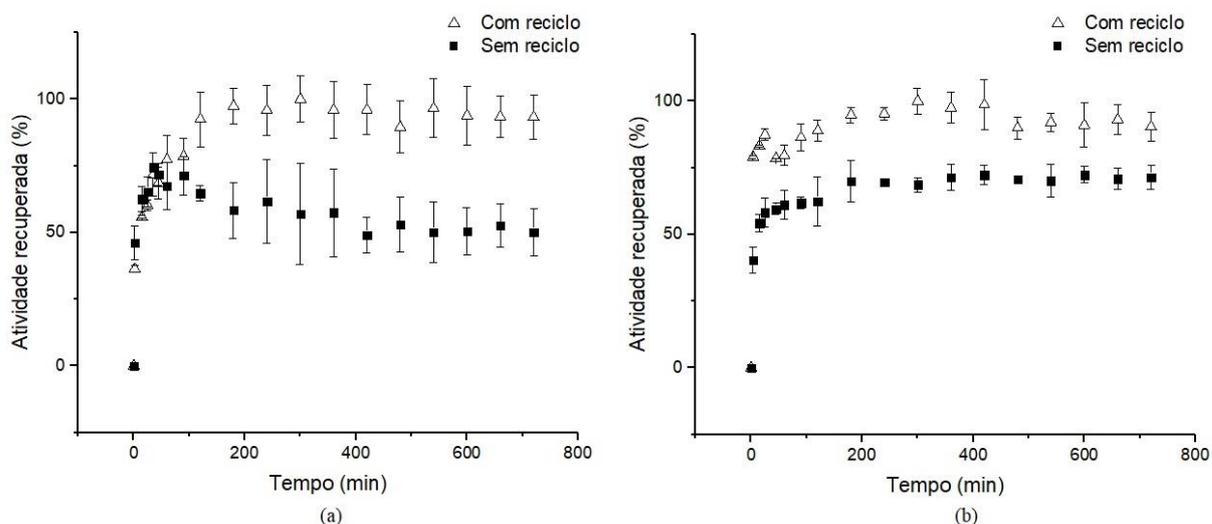
Observa-se, pela Tabela 10, que η_{im} foi igual a 0,75. Isso mostra que a $r_{A,obs}$ corresponde a 75 % de r_{AS}^* , que representa, em outras palavras, a velocidade de reação se a partícula de biocatalisador não fosse porosa e toda a enzima, presente no interior de seus poros, fosse exposta à superfície externa do biocatalisador (DORAN, 1995; FOGLER, 2012). Dessa forma, compreende-se que, de fato, a velocidade da TMI, em relação a velocidade de reação na superfície do biocatalisador, é maior, fazendo com que a concentração de sacarose no interior da partícula permaneça constante e que a velocidade de reação seja a etapa limitante.

5.6 ENSAIOS DE ESTABILIDADE OPERACIONAL

A estabilidade operacional foi avaliada conforme o procedimento experimental descrito pelo Tópico 4.5.4 e as Figuras 23 (a) e (b) mostram os perfis de atividade enzimática recuperada obtidos.

A Figura 23 (a) exibe a comparação entre a atividade de transfrutossilacção com e sem reciclo para a vazão de 11,5 mL min⁻¹. A Figura 23 (b) faz a mesma comparação, porém, para a vazão de 5,0 mL min⁻¹. Ambas figuras mostram que o reciclo aumentou a atividade recuperada em, aproximadamente, 35 %. Isso ocorre porque o reciclo permite que a sacarose residual, presente na saída do reator, retorne e, novamente, o percorra, aumentando a atividade de transfrutossilacção.

Figura 23 - Estabilidade operacional com e sem reciclo para as vazões de substrato de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Condições operacionais: concentração de sacarose de 473 g L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Legenda: (a) Estabilidade operacional à $11,5 \text{ mL min}^{-1}$.

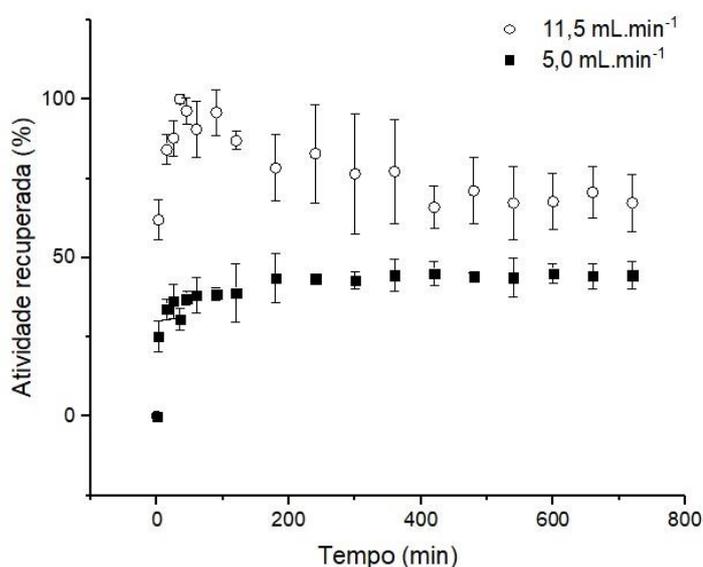
(b) Estabilidade operacional à $5,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Na Figura 23 (a), foi possível observar que a reação sem reciclo apresentou atividade de transfrutoseilação máxima recuperada (74 %) aos 35 minutos de reação e, em seguida, sofreu um decréscimo até os 420 minutos, momento no qual se manteve constante em 50 % de atividade recuperada. Ao analisar a reação com reciclo, não se nota a presença do decréscimo de atividade recuperada, sendo que a atividade máxima recuperada foi de 94 % aos 120 minutos de reação e se manteve constante ao longo dos 720 minutos. Essa diferença, observada entre os perfis com e sem reciclo da Figura 23 (a), pode estar relacionada com a remoção da enzima superficial da partícula de biomassa, pois, após o decréscimo, a atividade recuperada se manteve constante por mais 5 horas de reação, indicando que não houve perda de atividade enzimática da FTase. Além disso, o fato do perfil com reciclo não apresentar o decréscimo de atividade recuperada sugere que, com o reciclo, a enzima superficial removida ainda estava presente no sistema reacional, realizando a reação de transfrutoseilação mesmo sem estar aderida à biomassa, evitando a queda de atividade recuperada.

Na Figura 23 (b), tanto a reação sem reciclo quanto a reação com reciclo atingiram o estado estacionário aos 180 minutos de reação com, respectivamente, 70 % e 95 % de atividade recuperada e se mantiveram constante ao longo da reação. Diferentemente do perfil sem reciclo da Figura 23 (a), a Figura 23 (b) não apresentou qualquer decréscimo da atividade recuperada. Isso mostra que a vazão de 5 mL min^{-1} pode não remover a enzima superficial da partícula de biocatalisador.

Além da análise realizada, é importante avaliar qual condição de vazão ($11,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$) resulta na maior atividade recuperada. Embora a vazão de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ possa estar removendo a FTase aderida à superfície do biocatalisador, foi observado, na Figura 22, que a vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ é limitada pela transferência de massa externa, o que não é desejável. Sendo assim, a Figura 24 apresenta a comparação entre os perfis de atividade recuperada para a reação sem reciclo à $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 24 - Perfil de atividade recuperada para a reação sem reciclo com vazão de solução aquosa de sacarose de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Condições operacionais: concentração 473 g L^{-1} , pH 5,5 e temperatura de 50°C



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

De acordo com os perfis observados na Figura 24, nota-se que, mesmo se a remoção da FTase superficial estiver ocorrendo pela vazão de $11,5 \text{ mL min}^{-1}$, sua atividade recuperada é, a partir dos 420 minutos, 20 % maior que a $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Isso evidencia a necessidade em se operar um PBR sob condições que eliminem os problemas de transferência de massa (FOGLER, 2012).

A estabilidade operacional da reação em batelada mostrou que, em 12 ciclos de 60 min, a atividade recuperada para a biomassa livre caiu de 100 % para 50 % e, ao final de cada ciclo, foi necessário remover e lavar o biocatalisador para o próximo ciclo, demandando maior tempo de produção e aumentando o risco de perda de massa ao longo do processo (GARCIA, 2018). Conforme já discutido, a atividade de transfrutossilacção se manteve constante ao longo de 12 horas de reação, com 75 % de atividade recuperada. Por esse e pelos demais fatos já mencionados no decorrer da discussão desse trabalho, fica explícito as vantagens em se produzir de forma contínua em detrimento da produção em batelada.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu constatar que o processo de adsorção *in situ*, quando comparado à adsorção em batelada, apresenta melhores resultados, sendo escolhido para ser aplicado previamente aos estudos de DTR.

Quanto a aplicação da medida de DTR, a injeção do tipo degrau se mostrou mais eficiente que a injeção do tipo pulso. A análise de seus momentos resultou na escolha da altura do leito catalítico de 13,0 cm e diâmetro de partícula de $6,0 \pm 0,4$ mm como sendo as melhores condições do leito catalítico, pois seu tempo médio de residência (1,05 min) foi o que mais se aproximou do tempo espacial (0,67 min) com menores valores de variância ($1,00 \text{ min}^2$) e assimetria ($12,8 \text{ min}^3$).

A comparação entre o tempo médio de residência e o tempo espacial para esta condição de leito catalítico permitiu constatar a presença de regiões de resistência ao escoamento. Além disso, o tempo médio de residência obtido para o leito catalítico composto por esferas de vidro, sob as mesmas condições operacionais para o leito formado por esferas de biomassa, foi de 2,4 min. Tal valor indicou a presença de caminhos preferenciais no leito catalítico, formados pela compactação do leito, quando este foi submetido ao fluxo descendente de sacarose.

Nos estudos dos perfis de atividade enzimática no reator PBR, avaliaram-se a influência da temperatura na atividade de transfrutossilação, a influência da concentração de substrato e, posteriormente, a influência da vazão da solução reagente (substrato). Esses estudos mostraram que a temperatura de 50 °C e a concentração de 473 g L⁻¹ de substrato proporcionaram as maiores atividades enzimáticas relativas. A vazão de substrato de 11,5 mL min⁻¹ foi a mais vantajosa dentre as avaliadas. Para a cinética enzimática, o modelo de Michaelis-Menten foi o que melhor se ajustou aos dados com $V_{\text{máx}}$ igual a 632,8 U g⁻¹ e K_m igual a 160,7 g L⁻¹. Por fim, quando comparado ao processo em batelada em termos do tempo de residência e tempo de reação, a produção contínua obteve um rendimento 40 vezes maior.

Os estudos de TMI e TME demonstraram que, sob as condições operacionais utilizadas neste trabalho, a reação não é limitada pelos efeitos de transferência de massa interna e externa.

O reciclo total empregado no ensaio de estabilidade operacional revelou que, a partir da vazão de 11,5 mL min⁻¹ de substrato, pode estar ocorrendo o arraste da enzima presente na superfície da biomassa. Com a estabilidade operacional sem reciclo, foi possível observar que, mesmo que haja o arraste a 11,5 mL min⁻¹, a atividade de transfrutossilação é maior quando comparado à vazão a 5 mL min⁻¹, que é limitada pela difusão de massa externa. Quando

comparado com a reação em batelada no mesmo período, a estabilidade da reação contínua apresentou maior atividade recuperada (75 %), sem a necessidade de remoção do biocatalisador ao final de cada ciclo.

Por fim, pode-se afirmar que o processo contínuo, utilizando biomassa livre como recheio do reator PBR, foi capaz de gerar, nas mesmas condições de temperatura e concentração de substrato do processo em batelada, perfis expressivos de atividade enzimática de transfrutoseilação, assim como constante estabilidade operacional, revelando-se um potencial para produção futura de frutooligossacarídeos (FOS).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões, propõe-se, para a continuação do trabalho, as seguintes sugestões:

- a-) Implementar sistema reacional em reator PBR recheado com biomassa catalítica reticulada com glutaraldeído e/ou encapsulada em gel de alginato (baixa e média viscosidades);
- b-) Quantificar e analisar a conversão de FOS em função das vazões de substrato e, se for o caso, propor novas vazões para serem avaliada;
- c-) Realizar estudos de modelagem matemática e simulação do reator a fim de predizer a conversão teórica de sacarose e a formação de produto (FOS);
- d-) Aumentar o tempo reacional durante ensaios de estabilidade operacional com o intuito de quantificar a perda da atividade enzimática ao longo do processo contínuo;
- e-) Estudar os efeitos de inibição enzimática em processos contínuos durante a produção de FOS.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MAUGERI, F. Characterization of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 3, 2010.
- ALFREDO, A. P. C. *et al.* Adsorção de azul de metileno em casca de batata utilizando sistemas em batelada e coluna de leito fixo. **Revista Virtual de Química**, Apucarana, v. 7, n. 6, p. 1909-1920, jul. 2015.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350–358, 2001.
- AYAWEI, N.; EBELEGI, A. N.; WANKASI, D. Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms. **Journal of Chemistry**, v. 2017, p. 1-11, 2017.
- BATISTA, V. G. *et al.* Caracterização hidrodinâmica de reator enzimático de leito fixo visando à aplicação na síntese de lipídeos estruturados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 40, p.1, 2019.
- BECKER, J. *et al.* A multi-scale approach to material modeling of fuel cell diffusion media. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 54, n. 7-8, p. 1360-1368, mar. 2011.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BORGES, A. C. *et al.* Uso de traçadores para avaliação da hidrodinâmica de sistemas alagados construídos operando sob condições climáticas tropicais. **Engenharia Agrícola**, v. 29, n. 2, p. 301-310, jun. 2009.
- BRUCH, L. W.; COLE M. W.; ZAREMBA E. **Physical Adsorption: Forces and Phenomena**. New York: Dover, 2007.
- BURLEIGH, T. *et al.* Copper Tube Pitting in Santa Fe Municipal Water Caused by Microbial Induced Corrosion. **Materials**, v. 7, n. 6, p. 4321-4334, jun. 2014.
- CARABIM, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Toxicol Pharmacol**, v.30, p. 268-282, 1999.
- 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, fev. 2017.
- CHAPLIN, M; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.

CHOI, B.; REMPALA, G. A.; KIM, J. K. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, dez. 2017.

COKER, A. K. **Modeling of Chemical Kinetics and Reactor Design**. Boston: Gulf Professional Publishing, 2001.

CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**. São Paulo: Blucher, 2012.

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

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

CUI, Y. Q.; LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. A. M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 57, n. 4, p.409-419, 20 fev. 1998.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal Of Nutrition**, v.87, n. 6, p. 145-151, 2002.

CUNHA, Josivan de Souza. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de fructooligossacarídeos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

CUNHA, J. S. et al. Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 657-668, 2019.

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

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. San Diego: Academic, 1995.

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 Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 1003–1009, 2006.

EGGLESTON, G., CÔTÉ, G.L. Oligosaccharides in food and agriculture. **ACS Symposium Series**, p. 1-14, abr. 2003.

ELIZEI, V. G. *et al.* Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 165-172, abr. 2014.

FARIA, Larissa Lemos. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica-gel para produção de fructooligossacarídeos**. 2019.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2019.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I. et al. Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. **Food Science And Technology**, v. 39, n. 3, p. 747-753, 2019.

FOGLER, S. C. **Elements of chemical engineering reactions**, 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

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.

FREITAS, Fernanda Ferreira. **Otimização do processo de imobilização de B-galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído**. 2007. 219 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2007.

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, 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. 12-17, 2013.

GARCIA, Rogério Lopes. **Imobilização da biomassa catalítica 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.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport Processes and Unit Operations**, 3. ed. Englewood Cliffs: Simon & Schuster, 1993.

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

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

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

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

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

HILL, C. G.; ROOT, T. W. **Introduction to Chemical Engineering Kinetics and Reactor Design**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2014.

HOMAEI, A. A. *et al.* Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185-205, ago. 2013.

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.

JAKOBSEN, H. A. **Chemical Reactor Modeling: Multiphase Reactive Flows**. 2. ed. Cham: Springer International Publishing, 2014.

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

JUNG, K. H. *et al.* Industrial production of fructooligosaccharides by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a packed bed reactor. **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 1621-1624, abr. 2011.

JUNIOR, A. C. B.; CRUZ, A. J. G. **Reatores Químicos e Bioquímicos: um texto introdutório**. São Carlos: 2012.

KIM, D. J. *et al.* Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas* sp. during benzene degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 456-462, 23 abr. 2005.

KORETSKY, M. D. **Termodinâmica para Engenharia Química**. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

KORIR, A. K.; LARIVE, C. K. Online NMR detection of microgram quantities of heparin derived oligosaccharides and their structure elucidation by microcoil NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1707–1716, 2007.

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

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 557-566, set. 2009.

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

LIMA, Lícia Maria Ribeiro. **Avaliação da adsorção de contaminantes orgânicos presentes em efluentes aquosos mediante leito fixo de biomassa em escala ampliada**. 2010. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2010.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2011.

LORENZONI, A. S. G. *et al.* Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 51-55, jan. 2015

MAIORANO, A. E. *et al.* Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of prebiotics. **Biotechnology Letters**, v. 30. p. 1867-1877, 2008.

MASEL, R. I. **Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces**. New York: Wiley, 1996.

MATHLOUTH, M.; REISER, P. **Sucrose: Properties and Applications**. Boston: Springer, 1995.

MEDEIROS, Sandra Helena Westrupp. **Estudo da cinética de adsorção de SO₂ em sistema de leito fluidizado**. 2001. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001.

MICHEL, M. R. *et al.* Fructosyltransferase Sources, Production, and Applications for Prebiotics Production. **Probiotics and Prebiotics In Human Nutrition And Health**, p. 327-345, 13 jul. 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORDOR INTELIGENCE. **Global nutraceuticals market - growth, trends and forecasts. 2017-2022**. 2017. Disponível em:

<https://www.mordorintelligence.com/industryreports/global-nutraceuticals-marketindustry?gclid=CjsKDwjw6qnJBRDpoonDwLSeZhIkAIpTR8Lv0JOUzcsFD-TDSowPYe15cIf2l1hTNGZ5NW-D1GLKGgJKzPD_BwE>. Acesso em 20 de setembro de 2019.

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

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

NASCIMENTO, R. F. *et al.* **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

NETHAJI, S.; SIVASAMY, A.; MANDAL, A. B. Adsorption isotherms, kinetics and mechanism for the adsorption of cationic and anionic dyes onto carbonaceous particles prepared from *Juglans regia* shell biomass. **International Journal of Environmental Science And Technology**, v. 10, n. 2, p. 231-242, nov. 2012.

NIELSEN, J. Modelling the growth of filamentous fungi. **Biochemical Engineering**, v. 46, p. 188-223, 1992.

NOBRE, C. *et al.* Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 58–64, 2018.

NORTHROP, J. H. The influence of the substrate concentration on the rate of hydrolysis of proteins by pepsin. **The Journal of General Physiology**, v. 2, n. 6, p. 595-611, 1920.

OLIVEIRA, Elizama Aguiar de. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

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

PARK, J.P.; OH, T.K.; YUN, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochem**, v. 37, n. 5, p. 471–476, 2001.

PERNA, R. F. *et al.* Microbial Fructosyltransferase: Production by Submerged Fermentation and Evaluation of pH and Temperature Effects on Transfructosylation and Hydrolytic Enzymatic Activities. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, n. 3, p. 43-50, 2018.

REGINATTO, V. *et al.* Avaliação de um reator de lodo ativado aplicado à nitrificação utilizando ensaios cinéticos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 49-55, 2008.

RICO, Ana Letícia de Lima. **Produção enzimática de biodiesel etílico em *Mucor de leito fixo e regime de fluxo contínuo* utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano**. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2015.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, 2007.

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

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochem**, v. 40, n. 3-4, p. 1085–1088, 2005.

SANTANA, J. L. *et al.* Analysis of the performance of a packed bed reactor to production ethyl esters from crude vegetable oil using lipase immobilized in silica modified with protic ionic liquid. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 8, p. 891-898, 2018.

SCHMIDEDER, S. *et al.* From three-dimensional morphology to effective diffusivity in filamentous fungal pellets. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 12, p. 3360-3371, 8 out. 2019.

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

SFREDO, Marília Assunta. **Estudo da dispersão na secagem de frutos de café em secador de bandejas vibradas**. 2006. 338 f. Tese (Doutorado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2006.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Endoinulinase production by a new endoinulinase producer *Aspergillus tritici* BGPUP6 using a low cost substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1113-1122, 2016.

SILVA, Júnio Cota. **Seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium sp.*** 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

SILVA, J. E. *et al.* Estudo de Cinética e Equilíbrio de Adsorção Empregando a Casca do Coco Modificada Quimicamente para a Remoção de Pb(II) de Banho Sintético. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1248-1262, 2018.

SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, set. 2010.

SPARKS, D. L. **Environmental Soil Chemistry**. 2. ed. Delaware: Elsevier Science, 2013.

STANISLAUS, A.; MARAFI, A.; RANA, M. S. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. **Catalysis Today**, v. 153, p. 1–68, 2010.

STARZAK, M.; PEACOCK, S. Water activity coefficient in aqueous solutions of sucrose - A comprehensive data analysis. **Sugar industry**, v. 122, n. 5, p. 380-387, 1997.

TAVARES, Jucelio Kilinski. **Remoção de Compostos BTEX de Soluções Aquosas por Adsorção**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

TZABAR, N.; BRAKE, H. J. M. T. Adsorption isotherms and Sips models of nitrogen, methane, ethane, and propane on commercial activated carbons and polyvinylidene chloride. **Adsorption**, v. 22, n. 7, p. 901-914, 2016.

VANDÁKOVÁ, M. *et al.* Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. **Chem Pap**, v. 58, n. 1, p. 15–22, 2004.

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

VASCONCELOS, N. M. ; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. **Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa**, p. 1–59, 2013.

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

ZAMBELLI, P. *et al.* An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 607-613, 2016.

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

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

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.

WU, Y. *et al.* Comparison of Upflow and Downflow Two-Phase Flow Packed-Bed Reactors with and without Fines: Experimental Observations. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, n. 2, p. 397-405, 1996.

YANG, X.; WILD, G.; EUZEN, J. A comparison of the hydrodynamics of packed-bed reactors with cocurrent upflow and downflow of gas and liquid. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 5, p. 1323-1325, abr. 1992.

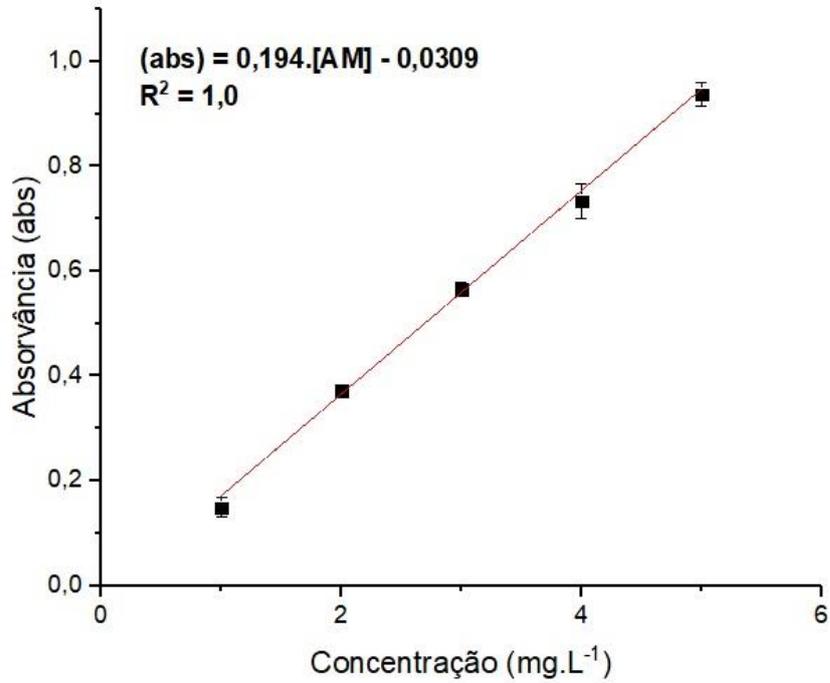
YUN, J. W. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107- 117, 1996.

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

YUN, J. W. *et al.* Continuous Production of Fructo-oligosaccharides by Immobilized Cells of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 98-101, 1992.

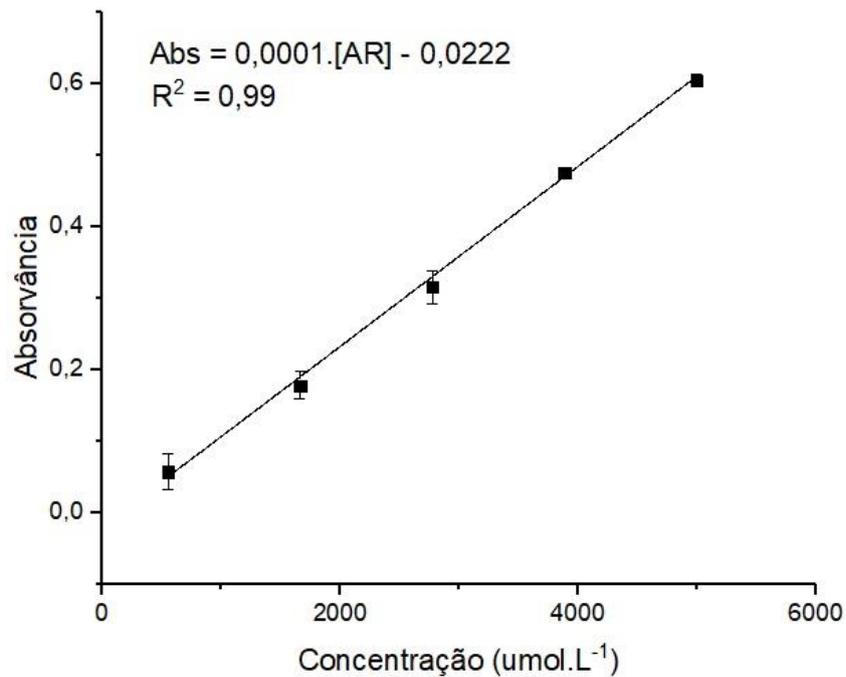
APÊNDICE A - Curvas analíticas

Figura 25 - Curva analítica para a determinação das concentrações de azul de metileno



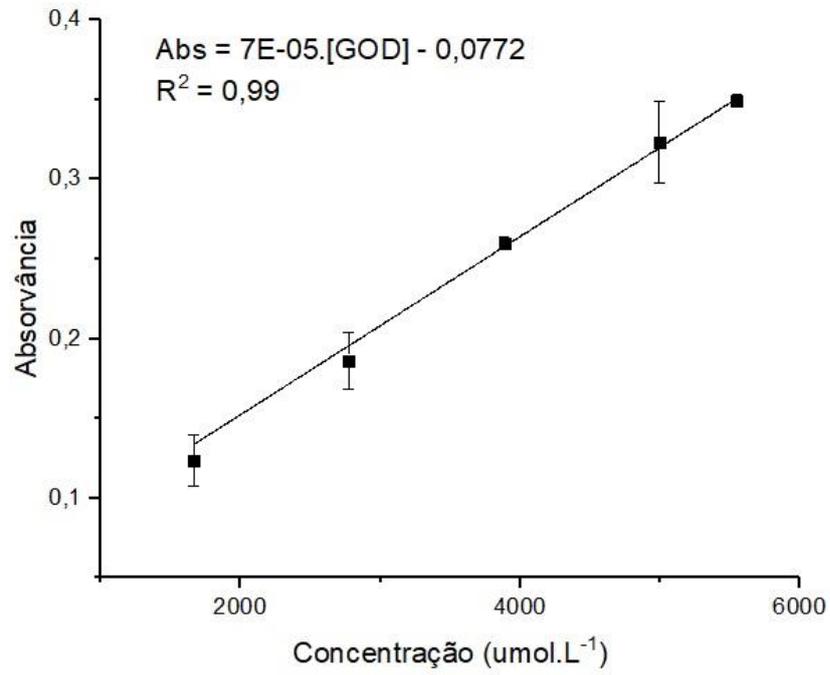
Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Figura 26 - Curva analítica obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosilicílico) para a determinação das concentrações de açúcares redutores (AR)



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

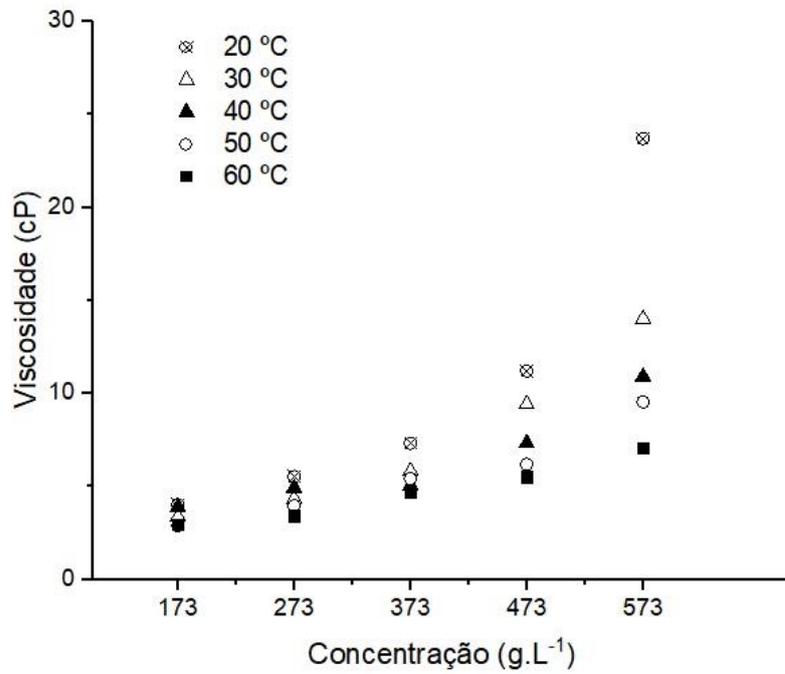
Figura 27 - Curva analítica obtida pelo método GOD-PAP para a determinação das concentrações de glicose (G)



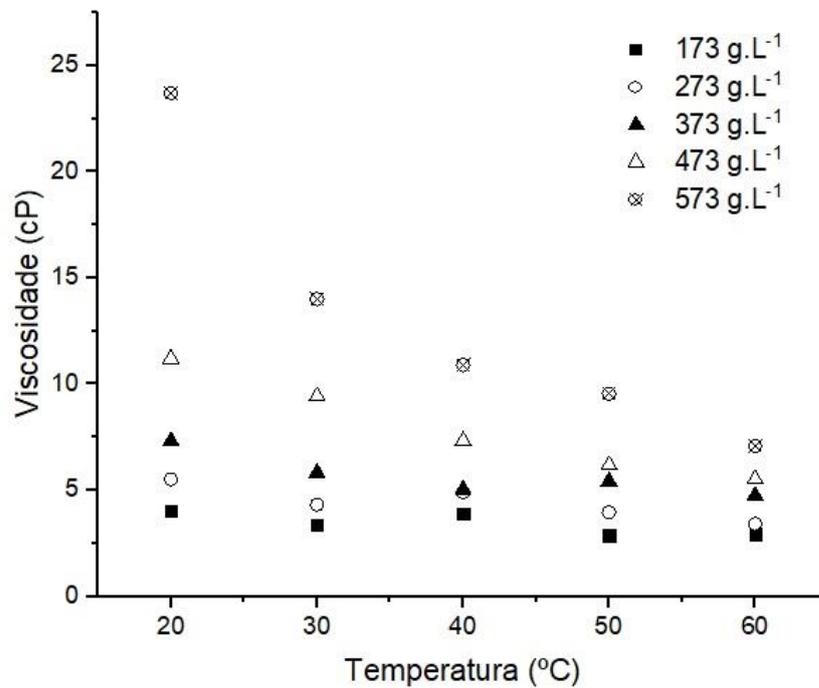
Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

APÊNDICE B – Perfis de viscosidade dinâmica da solução aquosa de sacarose

Figura 28 - Perfis de viscosidade dinâmica em função da concentração da solução aquosa de sacarose e em função da temperatura do meio reacional



(a)



(b)

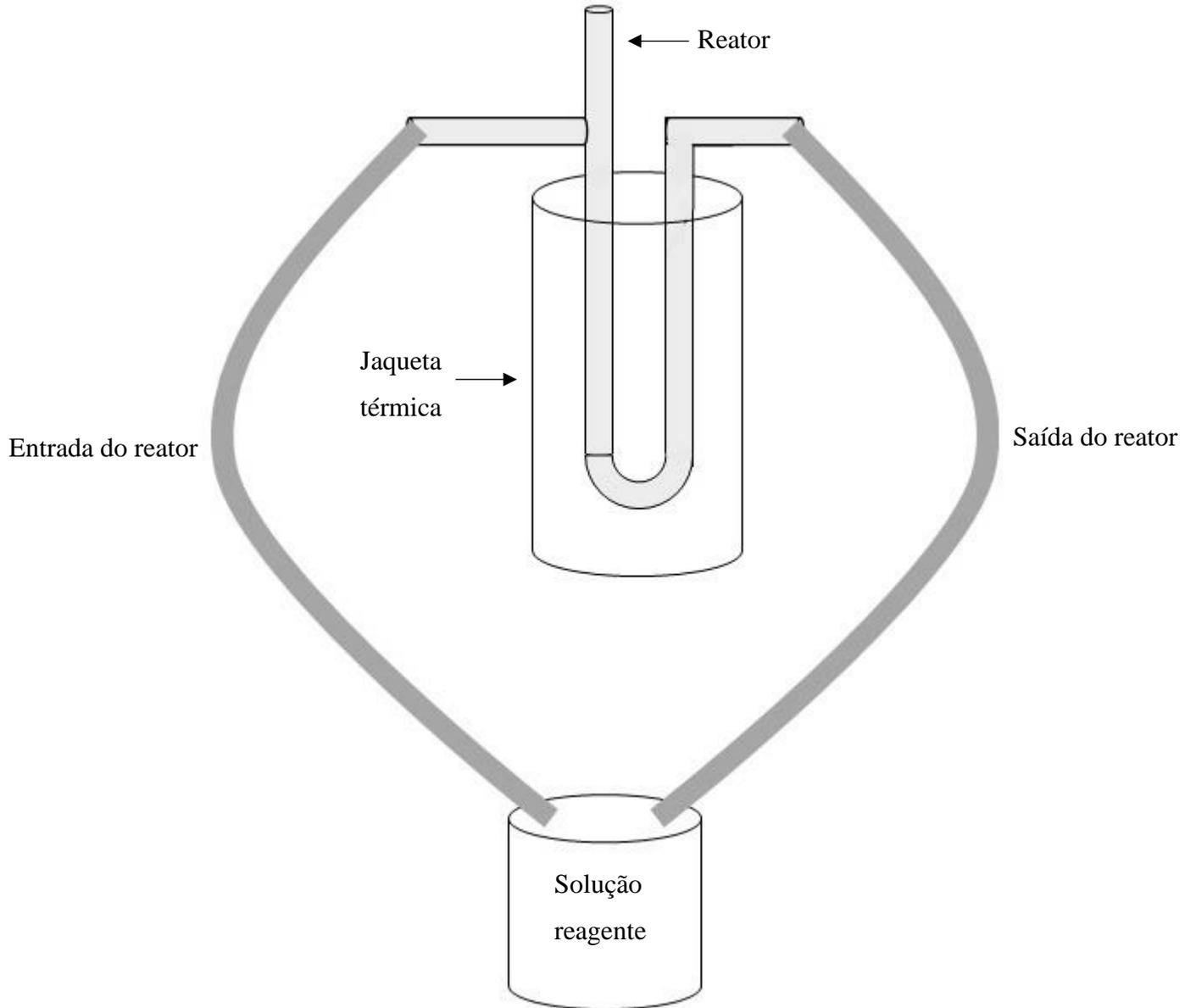
Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Viscosidade dinâmica em função da concentração da solução.

(b) Viscosidade dinâmica em função da temperatura da solução.

APÊNDICE C – Reator operando com o reciclo total

Figura 29 - Reator operando com reciclo total



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).